

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

БАРЫШНИКОВА
Виктория Сергеевна

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СЕРОДИАГНОСТИКА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА
ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА E**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Тучинская Ксения Константиновна

Москва – 2026 г.

Оглавление

Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1 Филогения ортофлавивирусов.....	13
1.2 Геном ортофлавивирусов	15
1.3 Структурные белки ортофлавивирусов	16
1.3.1 Белок С	16
1.3.2 Белок ргМ.....	17
1.3.3 Белок М	18
1.3.4 Белок Е	18
1.4 Неструктурные белки ортофлавивирусов	23
1.5 Строение вириона ортофлавивирусов	23
1.6 Цикл репродукции ортофлавивирусов	24
1.7 Распространение вируса клещевого энцефалита и других ортофлавивирусов.....	26
1.8 Клинические проявления при заражении вирусом клещевого энцефалита	28
1.9 Иммунный ответ при клещевом энцефалите.....	29
1.10 Антителозависимое усиление инфекции	30
1.11 Основные подходы в диагностике клещевого энцефалита	31
1.11.1 Обнаружение генома вируса клещевого энцефалита с помощью полимеразной цепной реакции.....	32
1.11.2 Обнаружение антител в клиническом материале	33
1.11.2.1 Иммуноферментный анализ на основе рекомбинантных белков вируса клещевого энцефалита	35
1.11.2.2 Системы латерально-проточных анализов.....	37
1.11.3 Биосенсоры для выявления ортофлавивирусов.....	37
1.12 Заключение по разделу	38
Глава 2. Материалы и методы	40

2.1	Материалы	40
2.1.1	Вирусы.....	40
2.1.2	Бактерии и плазмиды	41
2.1.3	Культуры клеток	41
2.1.4	Используемые в работе сыворотки людей	42
2.2	Методы	44
2.2.1	Выделение тотальной РНК.....	44
2.2.2	Обратная транскрипция	45
2.2.3	Полимеразная цепная реакция	45
2.2.4	Аналитический и препаративный гель-электрофорез ДНК.....	45
2.2.5	Выделение ДНК из агарозного геля после препаративного гель-электрофореза	46
2.2.6	Секвенирование и анализ последовательностей	46
2.2.7	Филогенетический анализ штаммов	47
2.2.8	Анализ последовательностей	47
2.2.9	Рестрикция	47
2.2.10	Лигирование.....	48
2.2.11	Трансформация бактериальных клеток.....	48
2.2.12	Выделение плазмидной ДНК малого и большого объема.....	48
2.2.13	Индукция клеток <i>E. coli</i> для получения рекомбинантных белков	49
2.2.14	Ультразвуковая обработка бактериальных клеток	49
2.2.15	Аффинная хроматография с использованием никелевого сорбента	50
2.2.16	Обессоливание и рефолдинг рекомбинантных белков	50
2.2.17	Электрофорез в полиакриламидном геле и измерение концентрации белков	51
2.2.18	Вестерн-блот	51
2.2.19	Получение сывороток и иммуноасцитных жидкостей мышей.....	51
2.2.20	Реакция нейтрализации 50% бляшек в культуре клеток	53
2.2.21	Иммуноферментный анализ.....	53

Глава 3. Результаты и обсуждение	55
3.1 Особенности структуры рекомбинантных белков sE и dI+II штамма Сухар	56
3.2 Получение целевых участков генов и конструкций, кодирующих рекомбинантные белки ...	57
3.3 Оптимизация условий получения рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII штамма Сухар и sE штамма Софьин	62
3.3.1 Подбор среды для экспрессии целевых белков	62
3.3.2 Подбор условий индукции синтеза белка	64
3.3.3 Подбор условий солюбилизации	66
3.3.4 Подбор концентрации имидазола для выделения рекомбинантных белков с помощью аффинной хроматографии	67
3.3.5 Рефолдинг белка sE штамма Сухар	69
3.3.6 Измерение концентрации белков	70
3.3.7 Первичный анализ способности связывания полученных рекомбинантных белков с антителами против вируса клещевого энцефалита	70
3.4 Выявление антител против вируса клещевого энцефалита с помощью диагностической методики иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII штамма Сухар	74
3.4.1 Определение порогового значения и коэффициента порогового значения для диагностической методики иммуноферментного анализа	74
3.4.2 Филогенетический анализ штаммов ортофлавириусов, используемых для получения иммунных сывороток лабораторных животных	77
3.4.3 Анализ мышинных иммуноасцитных жидкостей мышей и кроличьих сывороток, содержащих антитела к разным штаммам вируса клещевого энцефалита, в иммуноферментном анализе с белками sE, dI+II и dIII	79
3.4.4 Выявление антител против разных штаммов вируса клещевого энцефалита в сыворотке крови мышей при экспериментальном заражении	80
3.4.5 Оценка спектра антител против вируса клещевого энцефалита в сыворотках крови обезьян после экспериментальной инфекции вирусом клещевого энцефалита или иммунизации вакциной против клещевого энцефалита	82

3.4.6 Выявление антител против вируса клещевого энцефалита в сыворотках крови обезьян после инфекции вирусом Повассан и после иммунизации вакциной против клещевого энцефалита с последующим заражением вирусом Повассан	83
3.4.7 Исследование клинического материала от людей в иммуноферментном анализе на основе рекомбинантных белков.....	85
3.5 Изучение взаимодействия рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII с антителами к другим ортофлавирусам в иммуноферментном анализе	87
3.5.1 Анализ мышинных гипериммунных асцитных жидкостей, содержащих антитела к различным ортофлавирусам	87
3.5.2 Исследование специфичности полученных рекомбинантных белков в иммуноферментном анализе с использованием сывороток людей.....	88
3.5.3 Влияние последующей вакцинации против вируса желтой лихорадки на обнаружение антител против вируса клещевого энцефалита у людей	90
3.5.4 Специфичность выявления антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках крови условно здоровых людей, содержащих антитела к вирусу Западного Нила	91
3.6 Сравнение разработанной методики иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков с коммерческими тест-системами на основе иммуноферментного анализа.....	93
Заключение	96
Выводы	100
Практические рекомендации.....	101
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	102
Благодарности.....	103
Список сокращений и условных обозначений	104
Список литературы	106
Приложение 1	135

Введение

Актуальность темы исследования

Клещевой энцефалит (КЭ) – это вирусная трансмиссивная инфекция, переносимая преимущественно клещами рода *Ixodes*, вызванная вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), который принадлежит к роду *Orthoflavivirus* семейства *Flaviviridae*. Ежегодно в мире регистрируется около 10-15 тысяч случаев заболевания КЭ [1]. ВКЭ эндемичен для регионов Европы и Азии, в том числе и России, и представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Выделяют три основных подтипа ВКЭ: европейский, сибирский и дальневосточный – все они циркулируют на территории России. Серодиагностика играет решающее значение в постановке диагноза КЭ на разных стадиях инфекции и для дифференцирования этиологического агента от других ортофлавивирусов [2].

Клинически острая инфекция ВКЭ имеет монофазное или двухфазное течение [3]. Начальная вирусемическая фаза проявляется лихорадкой, головной болью и гриппоподобными симптомами, которые часто ошибочно диагностируются как легкое вирусное заболевание. В 20-30% случаев развивается вторая фаза, характеризующаяся поражением центральной нервной системы (ЦНС), в форме менингита, энцефалита или менингоэнцефаломиелита. Заболевание особенно опасно тяжелыми неврологическими осложнениями, которые могут сохраняться длительное время [4]. Смертность от КЭ варьируется в зависимости от подтипа вируса и составляет примерно 2%. Сибирский и дальневосточный подтипы ассоциируют с более высокой частотой тяжелых форм заболевания и большей вероятностью долгосрочных осложнений по сравнению с европейским подтипом [5].

Вакцинация против КЭ является эффективной профилактикой заболевания. Во всём мире для борьбы с этой вирусной инфекцией были разработаны и применяются различные вакцины: Клещ-Э-Вак и ЭнцеВир, FSME-IMMUN (TicoVac), Encerpur, SenTaiBao, производимые в России, Австрии, Германии и Китае, соответственно [6]. Все используемые вакцины основаны на инактивированных частицах цельного вируса [7]. Зарубежные вакцины основаны на штаммах Neudörfl (Австрия), K23 (Германия) и Sen-Zhang (Китай) [8–10]. Российские вакцины получены на основе штаммов Софьин (Клещ-Э-Вак) и 205 (ЭнцеВир) ВКЭ, которые являются высоковирулентными и относятся к дальневосточному подтипу вируса. За длительное время применения вакцины против КЭ продемонстрировали высокую сероконверсию и иммуногенность, доказали безопасность и эффективность для всех возрастных групп, включая детей и пожилых людей [11–15]. Несмотря на это, случаи заболевания среди вакцинированных также встречаются [16; 17].

Регулярное исследование сывороток населения на наличие антител к ВКЭ в эндемичных регионах помогает отслеживать распространенность ВКЭ и заболеваемость КЭ, выявлять вспышки и оценивать эффективность программ вакцинации [18].

В рутинной диагностике ключевую роль в выявлении острого КЭ играет обнаружение антител класса IgM и/или IgG в сыворотках крови или спинномозговой жидкости (СМЖ) с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), особенно на стадиях инфекции, когда вирусная РНК или вирусный антиген в сыворотках крови уже не обнаруживаются. Наличие IgM антител может указывать на свежую инфекцию. Наличие низких титров IgG антител может свидетельствовать о прошлом контакте с возбудителем или о предшествующей вакцинации, а повышение титров IgG антител – о свежей инфекции [5]. Кроме того, на уровень IgG антител могут влиять такие факторы, как особенности иммунного ответа человека и время, прошедшее с момента заражения [19]. Коммерческие наборы для серодиагностики, используемые в России, способны выявить и подтвердить КЭ на ранней стадии, позволяя вовремя принять верную стратегию лечения, снижая риск развития неврологических осложнений [20]. ИФА для выявления IgG антител к ВКЭ широко используется благодаря своей простоте, масштабируемости и отсутствию дополнительных требований к безопасности во время анализа. В настоящее время большинство ИФА тест-систем используют в качестве антигена инактивированные цельные вирионы. Во всем мире в ряде исследований были отмечены проблемы, связанные с чувствительностью и специфичностью таких тест-систем [21; 22].

В последние годы отмечается расширение ареала ВКЭ как в Европе, так и в России. При этом всё чаще ареал ВКЭ пересекается с ареалом других ортофлавивирусов, таких как вирус Западного Нила (ВЗН), вирус японского энцефалита (ВЯЭ), вирус Омской геморрагической лихорадки (ВОГЛ). Кроме того, развитие туризма способствует увеличению количества завозных случаев ортофлавивирусных инфекций: лихорадка денге, Зика и других, не характерных для РФ ортофлавивирусов. Перекрёстная реактивность постинфекционных антител к другим ортофлавивирусам часто приводит к ложноположительным результатам в коммерческих ИФА, усложняя дифференциальную серодиагностику КЭ, а также может приводить к постановке ложноположительного диагноза КЭ у пациентов, ранее перенесших инаппарантную форму ортофлавивирусной инфекции или вакцинированных против других ортофлавивирусов [23–25]. Все вышеперечисленное указывает на необходимость проведения более специфических диагностических анализов, таких как реакция нейтрализации (РН) в культуре клеток, в специализированных лабораториях.

Вариабельность циркулирующих вариантов ВКЭ ещё больше усугубляет проблему специфичности серодиагностики. Коммерческие ИФА наборы могут быть неодинаково эффективны в разных регионах, где циркулируют разные подтипы ВКЭ. Например, исследования

в Центральной Европе показали различную эффективность используемых коммерческих тест-систем, особенно в отношении вариантов, не относящихся к европейскому подтипу [21; 22; 24].

Таким образом, коммерческие диагностические ИФА для выявления антител к ВКЭ, которые используются в данный момент, имеют ряд недостатков и требуют значительного повышения специфичности и чувствительности для выявления анти-ВКЭ антител [21; 22; 24]. Для повышения точности диагностики, выбора тактики лечения КЭ во всем мире необходимы детальные исследования и разработка новых подходов к дифференциальной серодиагностике ВКЭ.

Степень разработанности темы исследования

Существующие коммерческие ИФА наборы, такие как Вектор-Бест (Россия), Euroimmun (Германия) и др. успешно используются для выявления IgM и IgG антител к ВКЭ при диагностике заболевания и оценке иммунной прослойки. В настоящее время подавляющее большинство таких тест-систем основаны на использовании инактивированного цельновирионного антигена ВКЭ [22; 24]. Сравнительные исследования показали, что ИФА на основе инактивированных вирусов может обладать хорошей чувствительностью, но при этом страдать от проблем перекрестной реактивности. Например, оценка ИФА Immunozyum, в котором используются инактивированные антигены ВКЭ, показала чувствительность 83% и специфичность 49% при исследовании человеческих сывороток, при этом низкая специфичность обусловлена перекрестными реакциями с другими ортофлавивирусами [26]. Таким образом, основным недостатком таких тест-систем является низкая специфичность ввиду их перекрестной реактивности с антителами к другим ортофлавивирусам, таким как ВЗН, ВОГЛ, вирусу желтой лихорадки (ВЖЛ), ВЯЭ, вирусу денге (ДЕНВ), вирусу Зика и другим [27]. Сравнительные исследования показывают противоречивые результаты при использовании коммерческих наборов ИФА даже при тестировании одних и тех же образцов [28].

На решение проблемы низкой специфичности существующих ИФА-наборов для выявления антител к ВКЭ направлены многие исследования по всему миру. Большинство из них в качестве антигена используют рекомбинантные домены белка Е либо субвирусные частицы ВКЭ. В Европе существует коммерчески доступный рекомбинантный белок Е ВКЭ штамма Neudoerfl европейского подтипа, который может быть использован в ИФА тест-системах. Однако его специфичность была проверена только при использовании сывороток пациентов из Европы, что не дает представление о спектре выявляемых антител против ВКЭ [29]. Было показано, что рекомбинантные субвирусные частицы (prM/E-SP), включающие белок Е, могут успешно использоваться в качестве антигена в ИФА для выявления IgG и IgM антител к ВКЭ, однако такая система была проверена на кросс-реактивность только с сыворотками, содержащими антитела к ВЯЭ [30]. Аналогично, ИФА на основе рекомбинантных prM/E частиц, экспрессированных в

клетках млекопитающих, продемонстрировали хорошие результаты при исследовании сывороток, содержащих антитела к ВКЭ, в сравнении с сыворотками, содержащими антитела к ВЯЭ или вирусу Семлики Форест [31; 32]. Также исследователями был изучен диагностический потенциал домена III белка E (rE-D3) ВКЭ как более специфичного антигена для дифференциации антител к ВКЭ от антител против ортофлавивирусов, переносимых комарами. Тем не менее, нет данных, что полученный антиген смог специфично выявлять антитела к ВКЭ среди антител к другим ортофлавивирусам, переносимым клещами [33]. В дополнение к этому, в другом исследовании был получен белок E ВКЭ соединенный с Fc-доменом кроличьего IgG в качестве антигена для ИФА. Такая система ИФА показала специфичность при выявлении анти-ВКЭ антител в сыворотках грызунов и людей в сравнении с сыворотками, содержащими антитела к ВЯЭ [34]. Эти разработки демонстрируют растущий интерес к использованию различных форм белка E в качестве антигена для ИФА, однако многие из них остаются на уровне исследовательских наборов и требуют дальнейшей валидации на больших клинических панелях. Всё это подчеркивает необходимость разработки подходов к созданию диагностических систем и их проверки на большом материале для эффективного и специфичного обнаружения антител ко всем подтипам ВКЭ.

Целью данной работы является создание диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных доменов белка E ВКЭ для дифференциальной серодиагностики.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**

1. Получение рекомбинантных доменов (sE, dI+II, dIII) белка E вируса клещевого энцефалита, создание диагностической методики иммуноферментного анализа на основе полученных антигенов для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита.
2. Изучение способности полученных рекомбинантных доменов белка E связываться с антителами к широкому набору штаммов вируса клещевого энцефалита, относящихся к разным подтипам, изолированным в разное время из разных источников и регионов с использованием сывороток лабораторных животных.
3. Оценка специфичности разработанной диагностической методики иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII с использованием сывороток лабораторных животных, содержащих антитела к различным ортофлавивирусам.
4. Оценка чувствительности и специфичности полученной диагностической методики иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках пациентов с диагнозами клещевой энцефалит, японский энцефалит, лихорадка Западного Нила, лихорадка Зика, лихорадка денге и реципиентов, вакцинированных против клещевого энцефалита и желтой лихорадки.

Научная новизна

Впервые были получены рекомбинантные белки sE, dI+II и dIII на основе штамма Сухар ВКЭ сибирского подтипа, широко распространенного на территории РФ, и sE вакцинного штамма Софьин дальневосточного подтипа и отработаны условия их получения. Впервые с использованием большого набора сывороток крови людей и лабораторных животных показана способность диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII выявлять антитела против широкого спектра штаммов ВКЭ, изолированных в разных регионах РФ и Европы. Впервые для рекомбинантного белка sE ВКЭ (штамм Сухар) как антигена для ИФА показана высокая чувствительность без потери специфичности. Рекомбинантный белок sE ВКЭ штамма Сухар позволяет дифференцировать антитела к ВКЭ от антител к ортофлавивирусам: ВЗН, вирусу Лангат, ДЕНВ, вирусу Повассан (ВПОВ), ВЖЛ, вирусу Зика, ВЯЭ. Впервые разработана диагностическая методика ИФА на основе рекомбинантных белков ВКЭ (sE, dIII, штамм Сухар), способная специфично выявлять антитела к ВКЭ в сыворотках людей на фоне уже имеющихся антител к другим ортофлавивирусам. Впервые на наборе сывороток, полученных от разных организмов, показана диагностическая значимость разных доменов белка E ВКЭ.

Теоретическая и практическая значимость

Разработан протокол очистки рекомбинантных белков ВКЭ, обеспечивающий высокую чувствительность и специфичность при использовании их в качестве антигенов в ИФА. Отработана схема проведения ИФА для выявления антител к ВКЭ на основе рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII ВКЭ. Показано, что диагностическая методика ИФА на основе рекомбинантного белка sE способна специфично дифференцировать антитела к ВКЭ от антител к ортофлавивирусам переносимых как клещами, так и комарами. Разработанный диагностический метод ИФА может быть основой при создании коммерческого набора для дифференциальной серодиагностики ВКЭ.

Методология и методы исследования

Решение задач опиралось на обширную теоретическую базу и современные практические вирусологические, молекулярные, молекулярно-генетические, иммунологические и иммунохимические методы. Основным научный подход состоял в получении рекомбинантных антигенов sE, dI+II, dIII белка E ВКЭ для последующей разработки диагностической методики ИФА по дифференциальной серодиагностике КЭ. Валидация специфичности разработанной тест-системы проведена с использованием широкого набора сывороток лабораторных животных и людей, содержащих антитела к ВКЭ, ВЗН, ВОГЛ, ВЯЭ, ВЖЛ, ДЕНВ, вирусу Зика, ВПОВ, вирусу Лангат и вирусу Чикунгунья. Проведена оценка диагностической значимости полученной

лабораторной ИФА тест-системы в качестве альтернативы используемым методикам ИФА на основе цельновирионного антигена.

Положения, выносимые на защиту

1. Схема получения рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII штамма Сухар вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа, включающая экспрессию в бактериальной системе с 0,5 мМ индуктором (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид), солюбилизацию с 6 М мочевиной, выделение на никелевом сорбенте с концентрацией имидазола 150 мМ и обессоливание, обеспечивает синтез белков в количестве и качестве, пригодном для иммуноферментного анализа.
2. Использование рекомбинантных белков sE и dIII штамма Сухар вируса клещевого энцефалита в качестве антигенов для иммуноферментного анализа обеспечивает высокую чувствительность при выявлении антител к широкому спектру штаммов, принадлежащих к основным подтипам вируса клещевого энцефалита (европейский, дальневосточный, сибирский, байкальский-1, байкальский-2) в сыворотках лабораторных животных.
3. Разработанная диагностическая методика иммуноферментного анализа на основе доменов sE и dIII белка E штамма Сухар вируса клещевого энцефалита позволяет дифференцировать антитела к вирусу клещевого энцефалита от антител к другим ортофлавивирусам: в сыворотках лабораторных животных – от антител к вирусу Западного Нила, вирусу Омской геморрагической лихорадки, вирусу японского энцефалита, вирусу Повассан, вирусу Лангат; в сыворотках людей – от антител к вирусу японского энцефалита, вирусу Западного Нила, вирусу Зика, вирусу денге, а также от антител, индуцированных вакциной против вируса желтой лихорадки.
4. Антитела к dI+II белка E вируса клещевого энцефалита выявляются в сыворотках обезьян и людей и не выявляются в сыворотках мышей и кроликов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенной работы соответствуют областям исследований: пунктам 7 и 10 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов в ходе работы подкрепляется теоретической базой, достаточным числом проведенных исследований, выполненных с использованием современных методов, и статистической обработкой результатов. Все выводы диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы. Материалы исследования были представлены на российских и международных конференциях:

XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», Москва, Россия, ноябрь 2020; XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2021», Москва, Россия, апрель 2021; XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2022», Москва, Россия, апрель 2022; Конгресс «Молекулярная диагностика и биобезопасность 2023», Москва, апрель 2023; Международное научно-практическое мероприятие «OpenBio - 2023», Кольцово, Россия, сентябрь 2023; Международная конференция «WSV 2025 The virosphere of our cellular world» Малайзия, Куала-Лумпур, май 2025.

Личное участие автора в получении результатов

Автором была проведена работа по изучению литературы, поставлены цель и задачи исследования, построен дизайн экспериментов. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Разработка праймеров и получение конструкций, кодирующих целевой ген, выполнены в сотрудничестве с младшим научным сотрудником лаборатории биохимии Турченко Юрием Владиславовичем. Реакцию секвенирования проводил научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов к.б.н. Холодилов Иван Сергеевич. Культуру эмбриональных клеток почки свиньи (СПЭВ) культивировала и любезно предоставила научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов Рогова Анастасия Андреевна.

Автор лично сформулировал основные положения и выводы диссертации. С участием автора подготовлены основные публикации по материалам исследования.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах данных – Web of Science, Scopus, RSCI, PubMed, соответствующих требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 137 страницах и состоит из введения, 3-х глав основной части диссертации: обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, благодарности, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа содержит 295 источников, иллюстрирована 18 таблицами и 43 рисунками.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Филогения ортофлавивирусов

Семейство *Flaviviridae* охватывает обширную группу оболочечных РНК-вирусов. Представители этого семейства делятся на четыре рода: *Orthoflavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* и *Pegivirus*. Род *Orthoflavivirus* наиболее многочисленный в данном семействе и включает 53 вида [35]. В него входит обширный ряд вирусов с трансмиссивным типом передачи, патогенных для животных и человека, в том числе такие важные с медицинской точки зрения возбудители, как вирус Зика, ДЕНВ, ВЗН, ВКЭ и другие [36]. Кроме того, есть большая группа неклассифицированных вирусов в семействе, которые значительно отличаются строением генома [35; 37].

Филогенетический анализ ортофлавивирусов показывает их разделение в зависимости от основных видов переносчиков: вирусы, переносимые клещами, комарами и вирусы, для которых переносчики в настоящее время не идентифицированы. Отдельно выделяют специфическую для насекомых подгруппу вирусов членистоногих [38]. Филогенетическое дерево, построенное на основе полных аминокислотных последовательностей ортофлавивирусов, представлено на Рисунке 1 [39; 40].

Переносимые комарами ортофлавивирусы, включая ДЕНВ, вирус Зика, ВЖЛ, ВЗН и другие, распространены на обширных территориях и представляют серьезную угрозу для общественного здравоохранения. Основными переносчиками этих вирусов являются комары рода *Aedes* и *Culex* [41].

Ортофлавивирусы, переносимые клещами, включают такие вирусы, как ВКЭ, ВОГЛ, вирус Лангат и другие. В основном они передаются клещами рода *Ixodes* и *Dermacentor* [40]. Эти вирусы способны вызывать у человека лихорадку, геморрагическую лихорадку и энцефалиты.

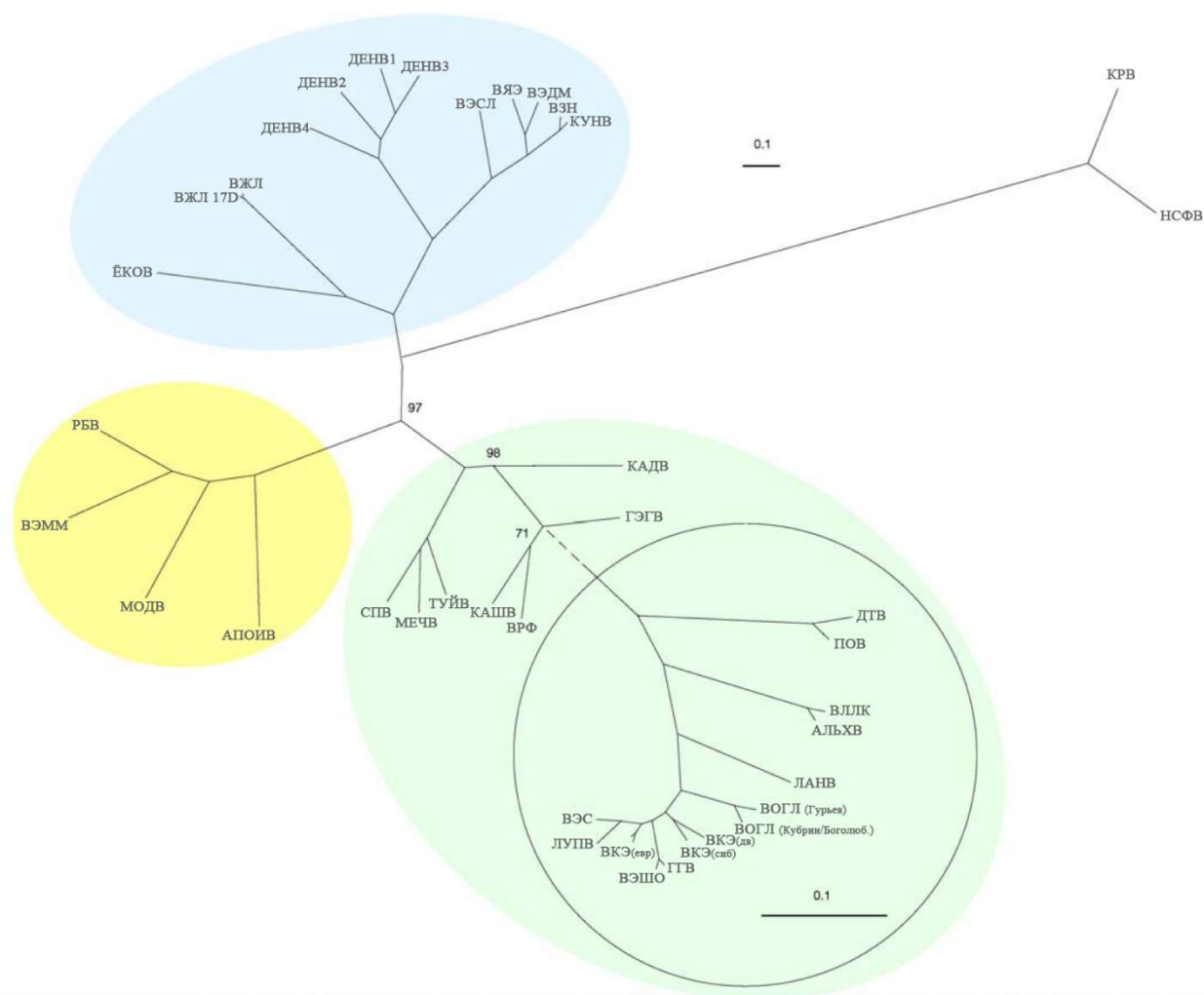


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево построено на основе полных аминокислотных последовательностей полипротеинов с применением метода максимального правдоподобия. Поддержка ветвей подтверждена квартетным анализом с частотами 99–100 %, если не указано иное. Ортофлавирусы, переносимые клещами обозначены зелёным цветом, комарами — синим, а вирусы с неизвестным вектором — жёлтым. (Адаптировано по: Grard G. и др., 2017 [40])

На данный момент для ВКЭ описано 7 подтипов: европейский (ВКЭ-Евр), сибирский (ВКЭ-Сиб), дальневосточный (ВКЭ-ДВ), обский (ВКЭ-2871, или ВКЭ-Об), гималайский (ВКЭ-Гим), байкальский-1 (ВКЭ-178-79, или ВКЭ-Бкл-1) и байкальский-2 (ВКЭ-886-84, или ВКЭ-Бкл-2). Наиболее распространенными по-прежнему являются первые три. На территории России самый распространенный подтип – сибирский [42].

Разнообразие подтипов ВКЭ связано с наличием различных видов клещей переносчиков, в первую очередь *Ixodes persulcatus* в Сибири и на Дальнем Востоке и *Ixodes ricinus* в Европе, а также различных хозяев мелких млекопитающих, которые поддерживают долгосрочную циркуляцию вируса [43; 44].

1.2 Геном ортофлавириусов

Впервые геномная последовательность ортофлавириусов была определена для ВЖЛ в 1985 году [45]. Вскоре после этого стали появляться публикации нуклеотидных последовательностей других ортофлавириусов. Геном ВКЭ также впервые был опубликован в 1985 году [46]. До сих пор учёные со всего мира пополняют информацию о последовательностях ортофлавириусов, что позволяет более точно классифицировать их внутри рода.

ВКЭ имеет геном, представленный одноцепочечной РНК положительной полярности длиной около 11 тысяч нуклеотидов (нт). Геном кодирует один полипротеиновый предшественник, который впоследствии расщепляется на структурные белки: капсидный белок (С), мембранный белок (prM) и белок оболочки (Е); и неструктурные белки: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 [47]. Белки образуются за счёт котрансляционного и посттрансляционного процессинга полипротеина с помощью клеточных ферментов и специфической вирусной протеазы NS2B-3 (Рисунок 2) [48].

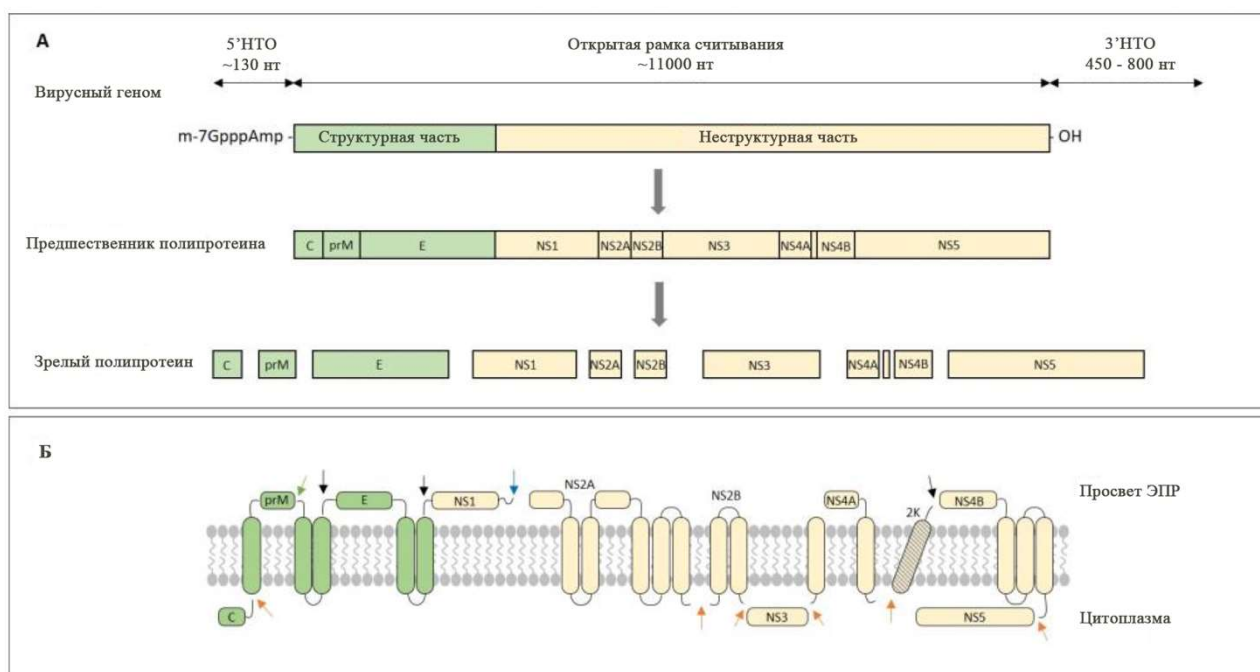


Рисунок 2 – Схема организации генома ВКЭ (А) и схематическое изображение продуцируемого полипротеина с продуктами расщепления (Б). Структурные белки представлены зеленым цветом, неструктурные – желтым. Сайты расщепления вирусной сериновой протеазой обозначены черными стрелками, сайты расщепления сигнальной пептидазой клетки хозяина – оранжевыми стрелками, сайт расщепления неизвестной протеазой хозяина – синей стрелкой, а сайт расщепления фурином – зеленой стрелкой. (Адаптировано по: Pustijanac E. и др., 2023 [49])

Геном ортофлавириусов содержит 5'-нетранслируемую область (5'НТО) длиной около 100 нт и 3'-нетранслируемую область – около 500 нт [50]. На 5'-конце генома ортофлавириусов находится кэп первого типа, который необходим для стабилизации РНК генома, инициации

трансляции, а также противодействию защитным механизмам клетки [51]. На 3'-конце, в отличие от клеточных мРНК, у вирусного РНК генома отсутствует поли-А хвост [52].

1.3 Структурные белки ортофлавириусов

1.3.1 Белок С

Капсидный белок С (Рисунок 3) находится внутри вирусной частицы и образует нуклеокапсид, в который упакована вирусная РНК. Рентгеновская кристаллография и крио-ЭМ показали, что белок С образует нуклеокапсидное ядро, которое окружено липидной мембраной, со встроенными в неё структурными белками Е и рМ [53]. Он взаимодействует с РНК геномом и играет решающую роль в сборке новых вирионов [54; 55].

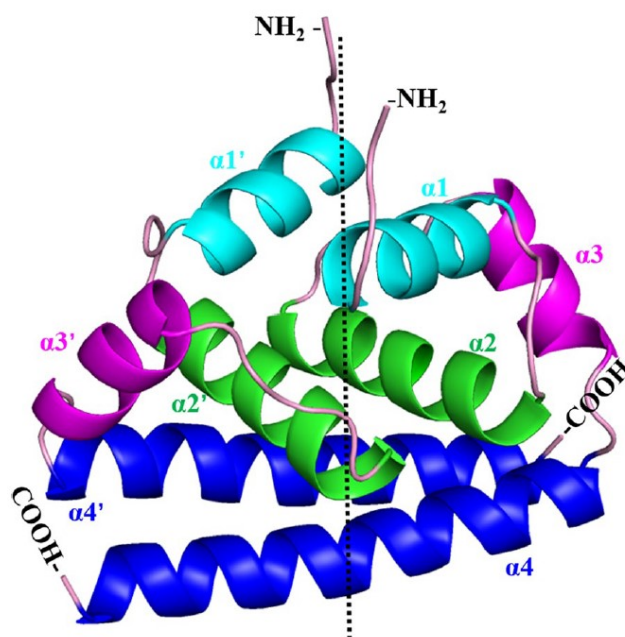


Рисунок 3 – Трёхмерная структура капсидного белка ортофлавириусов. Топологическая схема гомодимера белка С: α -спирали 1–4 каждого мономера С показаны светло-голубым, зеленым, фиолетовым и темно-синим цветами, соответственно. Спираль $\alpha 1$ – $\alpha 1'$ и $\alpha 2$ – $\alpha 2'$ расположены на противоположной стороне спиралей $\alpha 4$ – $\alpha 4'$, а спираль $\alpha 3$ – $\alpha 3'$ параллельна $\alpha 4$ – $\alpha 4'$. (Адаптировано по: Zhang X. и др., 2021 [56])

Белок С состоит из 122 аминокислотных остатков (около 100 в зрелом белке за счет удаления С-концевого трансмембранного якоря) и имеет исключительно α -спиральную структуру [57]. В процессе сборки вируса этот С-концевой домен обеспечивает закоривание белка в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Положительные заряды на белке С взаимодействуют с отрицательно заряженной фосфатной группой, обеспечивая связывание с вирусной РНК [58]. Кроме того, белок С взаимодействует с факторами клетки-хозяина, которые способствуют сборке вируса и его отпочковыванию от мембраны ЭПР. Эти взаимодействия необходимы для производства инфекционных вирионов [59; 60].

1.3.2 Белок ргМ

Гликопротеин ргМ является предшественником мембранного белка М ортофлавириусов и выполняет в основном функцию шаперона для белка оболочки Е во время сборки вириона. Структурно ргМ состоит из двух основных доменов: глобулярного β -складчатого домена и трансмембранного домена, представленного двойной α -спиралью. Они соединены длинным гибким линкером, известным как «стебель» белка ргМ. Этот белок состоит примерно из 168 аминокислот в зависимости от конкретного анализируемого ортофлавириуса [61]. Белок ргМ имеет важное значение для образования гетеродимеров ргМ-Е и для формирования и созревания вирионов ортофлавириусов (Рисунок 4) [62]. Глобулярный домен отвечает за защиту петли слияния белка Е, предотвращая преждевременное слияние вирусной и клеточной мембран во время экзоцитоза вириона [63]. Во время созревания ргМ расщепляется с образованием мембранного (М) белка, который остается связанным со зрелым вирионом [64; 65]. Исследования ВКЭ показали, что отщепление рг-домена необходимо для будущей инфекционности вируса [64].

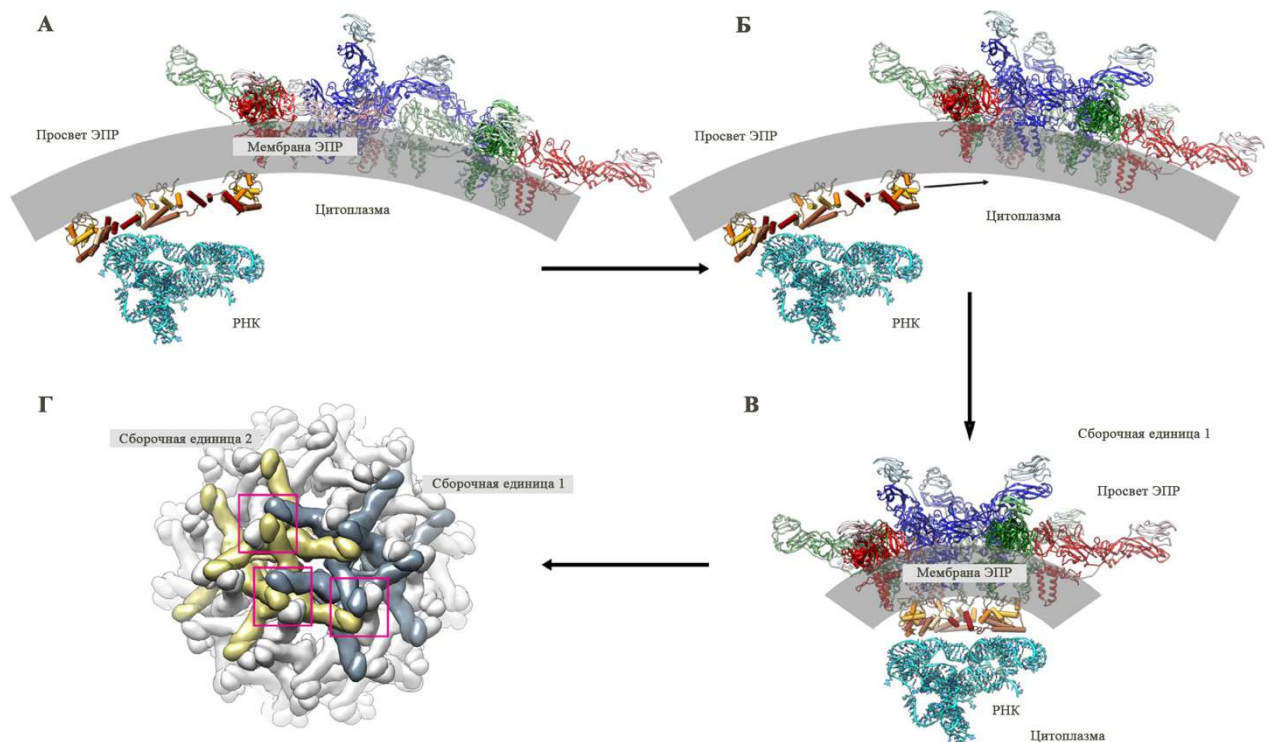


Рисунок 4 – Предполагаемый процесс сборки вирусной частицы. (А) Капсидные белки экспрессируются на цитоплазматической стороне мембраны ЭПР, где они образуют гомодимеры. Одна сторона гомодимера взаимодействует с мембраной ЭПР, а другая – с вирусной РНК. Одновременно на люминальной стороне ЭПР белки ргМ и Е образуют гетеродимеры, а затем три из этих гетеродимеров связываются друг с другом, образуя перевернутый тример. (Б) Перевернутые триподы взаимодействуют друг с другом. Капсидные димеры присоединяются к трансмембранным областям триподов ргМ-Е. (В) Димеры капсидных белков взаимодействуют с другими близлежащими капсидными димерами через спираль $\alpha 5$. Таким образом, устанавливается расстояние между инвертированными триподами. Три инвертированных трипода ргМ-Е с димерами капсидных белков, связывающимися под ними, образуют сборочную единицу. (Г) Концы этих сборочных единиц (розовые квадраты) затем взаимодействуют, образуя решетку вирусной поверхности на стороне просвета мембраны ЭПР. Одна сборочная единица окрашена серым цветом, другая – желтым. (Адаптировано по: Тап Т.У. и др., 2014 [66])

1.3.3 Белок М

Мембранный белок (М) играет критически важную роль в сборке и созревании вирусов. Являясь структурным компонентом зрелого вириона, белок М, как описано выше, образуется из мембранного белка-предшественника (prM) путем протеолитического расщепления фуриновой протеазой клетки хозяина в процессе созревания [67].

Зрелый белок М представляет собой небольшой трансмембранный белок (около 75 аминокислот, в зависимости от вируса), встроенный в вирусную липидную оболочку. Он состоит из короткого N-концевого домена и трансмембранного домена, который прикрепляет его к липидному бислою. Такое структурное расположение стабилизирует зрелый вирион и поддерживает его общую архитектуру. Белок М способствует организации димеров белка Е на вирусной поверхности, влияя на стабильность и инфекционность вириона [68]. В то время как белок Е опосредует связывание с рецептором и слияние мембран, белок М обеспечивает физическую целостность вириона во время этих процессов [69].

1.3.4 Белок Е

Белок Е представлен на поверхности вириона и является основным антигеном, к которому вырабатываются антитела в процессе ортофлавирусной инфекции. Этот белок играет ключевую роль в проникновении вируса в клетку хозяина и в индукции иммунного ответа, что делает его важным объектом для разработки вакцин и экстренных терапевтических средств против ортофлавирусов, а также главной мишенью при создании диагностических тест-систем [70].

Первая рентгеновская структура белка Е ВКЭ была опубликована в 1995 году с разрешением 2 Å. Она раскрыла трехдоменную архитектуру эктодомена белка, что заложило основу для понимания взаимодействия антител с различными областями белка [71]. В течение последних 30 лет знания о структуре белка Е ортофлавирусов значительно расширились. Гликопротеин Е содержит четыре отдельных домена: домен I (dI), который служит структурным каркасом; домен II (dII), который содержит петлю слияния; домен III (dIII), который имеет иммуноглобулиноподобную структуру и служит мишенью для многих нейтрализующих антител; домен IV (dIV) – заякорен в мембране и имеет решающее значение в процессе слияния вирусной и клеточной мембран (Рисунок 5). Домены, расположенные на поверхности (dI-III), представляют собой растворимую часть белка Е (sE) и являются основными мишенями для нейтрализующих антител, что учитывается при разработке тест-систем для серодиагностики и разработке вакцинных препаратов [71–73].

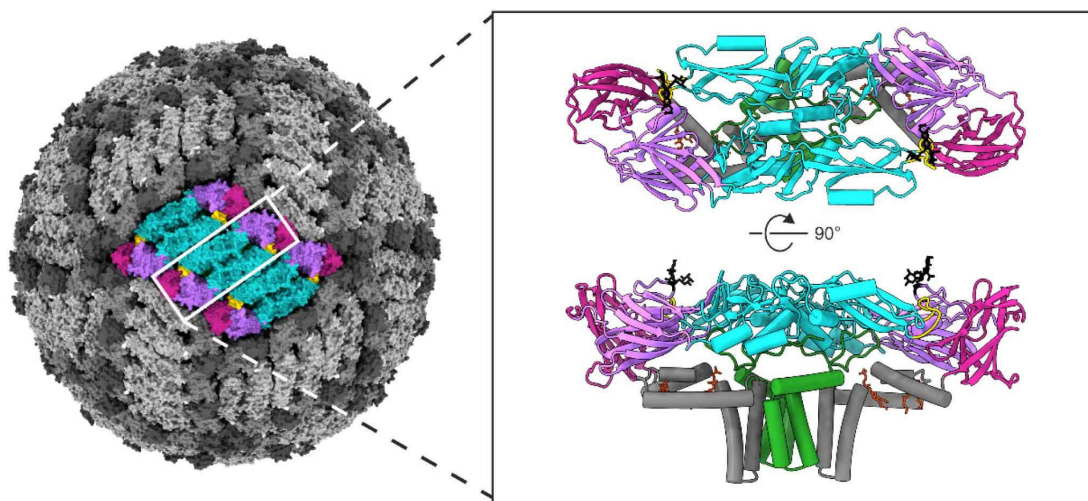


Рисунок 5 – Реконструированная модель расположения структурных белков на поверхности вириона. Домены белка E окрашены: фиолетовый – домен I, бирюзовый – домен II, пурпурный – домен III, серый – домен IV. Петля слияния белка E окрашена в золотой, белок M – в зеленый. (Адаптировано по: Pulkkinen L.I.A. и др., 2022 [53])

Сравнительный анализ структур белка E различных ортофлавивирусов, включая ВКЭ, ДЕНВ, вирус Зика, ВЗН, ВЯЭ и ВЖЛ, показывает высокую степень консервативности пространственной архитектуры при умеренной аминокислотной идентичности (около 40–60%). Кристаллографические и крио-ЭМ структуры растворимого эктодомена белка E (sE) демонстрируют, что мономер имеет вытянутую форму и состоит из трёх доменов, организованных в конфигурации «голова–хвост». Среднеквадратичное отклонение (Root Mean Square Deviation, RMSD) при наложении $C\alpha$ -атомов белков E различных ортофлавивирусов, как правило, не превышает $\sim 2 \text{ \AA}$, что свидетельствует о жёстко консервативной трёхмерной организации белка (Рисунок 6) [74; 75]. В последнее время метод крио-ЭМ дополняет рентгеновскую кристаллографию, позволяя понять динамические структурные изменения в белках, происходящие в процессе проникновения вируса в клетку. Исследования на основе крио-ЭМ позволили зафиксировать белок E в его префузионной и постфузионной конформациях, показав, как нейтрализующие антитела могут стабилизировать префузионное состояние или блокировать постфузионное состояние, не позволяя вирусу завершить проникновение в клетку хозяина [71; 76; 77].

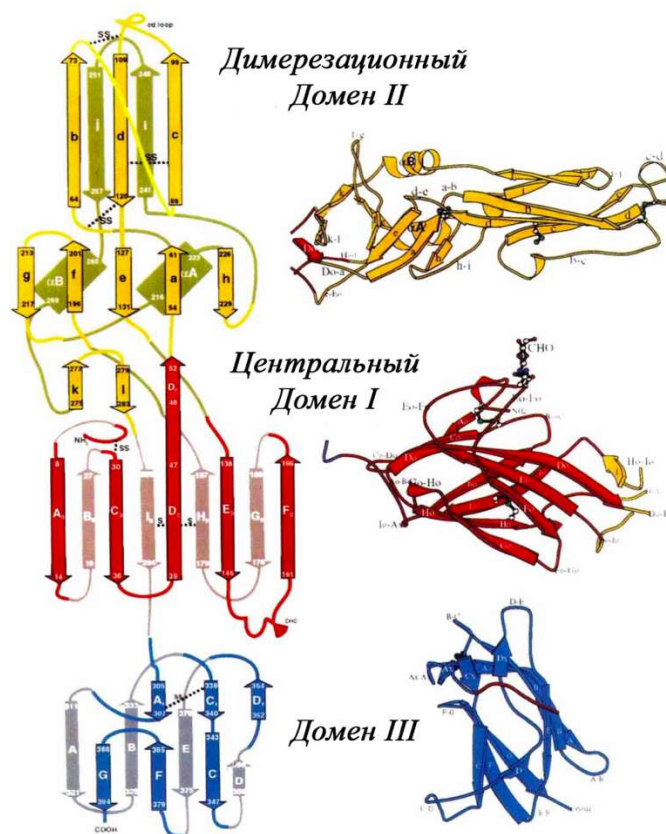


Рисунок 6 – Схематичное изображение сворачивания доменов белка Е ВКЭ и изображение отдельных доменов в виде лент. Дисульфидные мостики показаны прерывистыми черными линиями на диаграмме сворачивания. (Адаптировано по: Rey F.A. и др., 1995 [71])

Домен I включает около 120 аминокислот и представляет собой компактную β -бочковидную структуру, сформированную восемью антипараллельными β -нитями. Он выполняет роль центрального структурного ядра белка Е и участвует в обеспечении конформационной стабильности всей молекулы. В DI локализован консервативный сайт N-гликозилирования по остатку Asn154 (мотив N-X-S/T), характерный для большинства клещевых ортофлавириусов [78]. В белке Е ВКЭ идентифицировано множество потенциальных сайтов O-связанного гликозилирования, из которых экспериментально подтверждено наличие по меньшей мере трёх O-гликанов. Из нескольких потенциальных сайтов O-гликозилирования, остатки T147 и S158, представляют наибольший интерес. Эти остатки находятся в области петли E150 и предполагаемое O-гликозилирование этого участка может влиять на рН-зависимые структурные перестройки белка Е и, как следствие, изменять доступность отдельных эпитопов для антител [79]. Домен I (DI) играет важную структурную роль, обеспечивая корректное расположение доменов II и III [73].

Домен II (DII) включает примерно 170 аминокислотных остатков и является наиболее протяжённой частью белка Е. В нем находится петля слияния, которая необходима для слияния вирусной оболочки с мембраной эндосомы после проникновения вируса в клетку. В нейтральной

среде этот участок скрыт внутри димера белка E, однако при подкислении эндосомы происходит конформационная перестройка белка и образование тримерной структуры, в результате чего петля становится доступной и функционально активной [75; 80].

Домен III (DIII) представляет собой иммуноглобулинподобную структуру длиной около 100 аминокислотных остатков и рассматривается как основной участок, участвующий в связывании вируса с клеточными рецепторами. Он характеризуется наибольшей вариабельностью аминокислотной последовательности по сравнению с другими доменами белка E. Изменения в его поверхностных петлях связывают с различиями в клеточном тропизме вирусов и особенностями их взаимодействия с переносчиками, такими как комары и клещи [23; 55; 71]. DIII считается перспективной мишенью для дифференциальной диагностики и разработки серологических тестов, способных различать близкородственные ортофлавирусы (Рисунок 7) [81; 82].

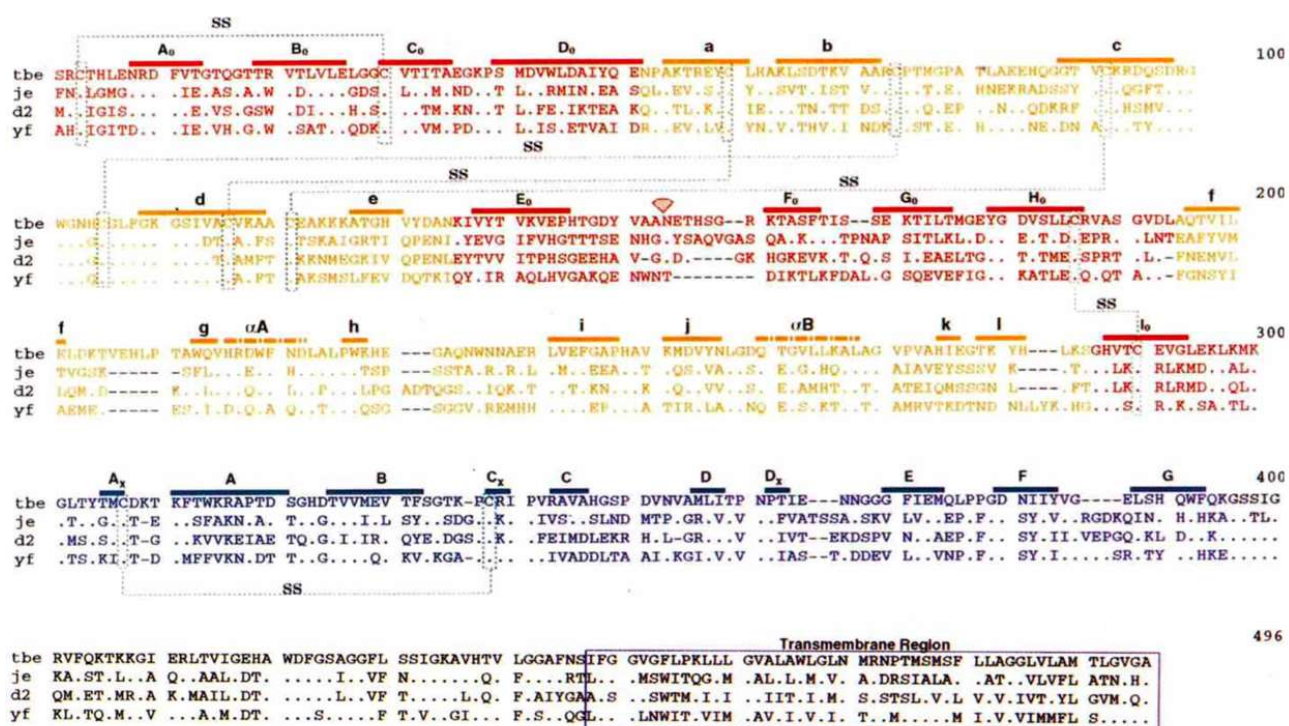


Рисунок 7 – Выравнивание аминокислотных последовательностей белка E ВКЭ, ВЯЭ, ДЕНВ, ВЖЛ. Цветами выделены: красный – домен I, желтый – домен II, синий – домен III, черный – домен IV. (Адаптировано по: Rey F.A. и др., 1995 [71])

Эпитопы для антител на поверхности целевых белков можно разделить на линейные и нелинейные. У ортофлавирусов исследователи выявили В-клеточные линейные эпитопы как в структурных, так и в неструктурных белках. Для вируса клещевого энцефалита такие эпитопы описаны в белках E и NS5, причём некоторые из них позволяют различать инфекции, вызванные близкородственными вирусами [83]. У ортофлавирусов, переносимых комарами, охарактеризовано более 150 линейных В-клеточных эпитопов, часть которых рассматривается

как перспективная основа для серологических тест-систем. Кроме того, для вирусов денге и Зика были выявлены эпитопы, позволяющие дифференцировать антительный ответ к этим близкородственным возбудителям [84; 85].

Конформационные эпитопы, в отличие от линейных, формируются только после укладки белка в трёхмерную структуру и не редко являются основными мишенями нейтрализующих антител. Исследователи показали, что человеческое моноклональное антитело С10 распознает участки белка Е, расположенные на границе двух соседних протомеров вирусной частицы. Такая организация эпитопа обеспечила эффективное связывание с вирусом денге разных серотипов и вирусом Зика, что определяет широкий спектр нейтрализующей активности антитела [86; 87]. Сравнительный анализ линейных и конформационных эпитопов подчёркивает, что, хотя линейные последовательности удобны для диагностики или создания антител в лабораторных тестах, именно конформационные эпитопы чаще определяют защитную нейтрализующую активность антител.

Антитела к белку Е ортофлавириусов можно условно разделить на нейтрализующие, слабонейтрализующие и ненейтрализующие. Нейтрализующие антитела способны блокировать инфекцию, препятствуя прикреплению вируса к клетке или процессу мембранного слияния, тогда как ненейтрализующие антитела могут участвовать в формировании иммунных комплексов и, в случае комариных ортофлавириусов, могут быть вовлечены в антителозависимое усиление инфекции (АТЗУИ) [88; 89].

Нейтрализующие антитела могут быть направлены против всех трёх доменов белка Е, однако наиболее эффективные и вирусспецифичные из них, как правило, распознают эпитопы домена III. Такие антитела блокируют взаимодействие вируса с клеточными рецепторами и обладают высокой специфичностью к отдельным видам или подтипам ортофлавириусов [90–92].

Антитела, направленные против доменов I и II, чаще распознают консервативные эпитопы, включая петлю слияния и латеральный гребень DII. Эти антитела могут нейтрализовать вирус за счёт блокирования конформационных перестроек, необходимых для слияния мембран, однако они, как правило, обладают широкой кросс-реактивностью между различными ортофлавириусами [92; 93]. Именно такие антитела чаще всего ассоциированы с феноменом АТЗУИ для комариных флавириусов [94; 95].

Гуморальный иммунный ответ на белок Е зависит от вида хозяина и характера антигенной стимуляции. У человека после естественной инфекции формируется широкий спектр антител ко всем трём доменам белка Е, тогда как после вакцинации наблюдается смещение иммунного ответа в сторону домена III [96; 97]. У мышей, напротив, даже после инфекции может наблюдаться преобладание антител к DIII, что указывает на видоспецифические различия в

формировании гуморального иммунитета и требует осторожности при экстраполяции данных животных моделей на человека [72; 73; 98].

1.4 Неструктурные белки ортофлавивирусов

Неструктурные белки (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5) отвечают за вирусную репликацию, сборку вирионов и модуляцию иммунного ответа хозяина [99].

Гликопротеин NS1 выполняет разнообразные функции в ходе вирусной инфекции, включая участие в вирусной репликации и уклонение от иммунного ответа, что в свою очередь влияет на тяжесть заболевания. Белок NS1 существует в двух основных формах: мембраноассоциированной и секретируемой. Мембраносвязанная форма NS1 задействована в формировании репликативного комплекса, а секретируемый NS1 участвует в модуляции и уклонении от иммунного ответа хозяина [100]. Также, секретируемый NS1 является ключевым биомаркером для ранней диагностики некоторых ортофлавивирусных инфекций [101; 102].

Роль других неструктурных белков различна: NS2A и NS2B участвуют в формировании репликативного комплекса и процессинге полипротеина [103; 104]. NS3 – это многофункциональный фермент с протеазным доменом, обеспечивающий репликацию РНК и процессинг полипротеина, а NS4A и NS4B играют важнейшую роль в ремоделировании мембран и уклонении от иммунитета [105; 106]. Наконец, NS5 является РНК-зависимой РНК-полимеразой и отвечает за репликацию и копирование РНК, обеспечивая эффективную транскрипцию и трансляцию вирусного генома [107]. Вместе эти неструктурные белки образуют высококоординированную сеть, которая позволяет ортофлавивирусам, включая ВКЭ, эффективно репродуцироваться в организме хозяина.

1.5 Строение вириона ортофлавивирусов

Вирионы ортофлавивирусов бывают нескольких форм: зрелые инфекционные, незрелые неинфекционные вирионы, частично зрелые вирионы и пустые формы, лишённые нуклеокапсида. Помимо этих форм в процессе репродукции за счет подвижности поверхностного Е белка при кислых рН вирионы ВКЭ преобразуются в фьюзогенную форму, способную к слиянию с мембраной эндосомы клетки [108].

Зрелые инфекционные вирионы ортофлавивирусов представляют собой сферические частицы диаметром около 50 нм (500 Å) (Рисунок 8). Они окружены липидной мембраной, заимствованной у клеток хозяина, в которую встроены 180 копий гетеродимеров, состоящих из мембранного белка (М) и белка оболочки (Е). Гетеродимеры образуют структуру, напоминающую икосаэдрическую, и прикреплены к липидной оболочке посредством гидрофобных мембранных якорей [63].

Структура нуклеокапсида играет важную роль в защите вирусной РНК. Нуклеокапсид ВКЭ состоит из вирусной РНК и С белка и обеспечивает структурную стабильность [57; 109].

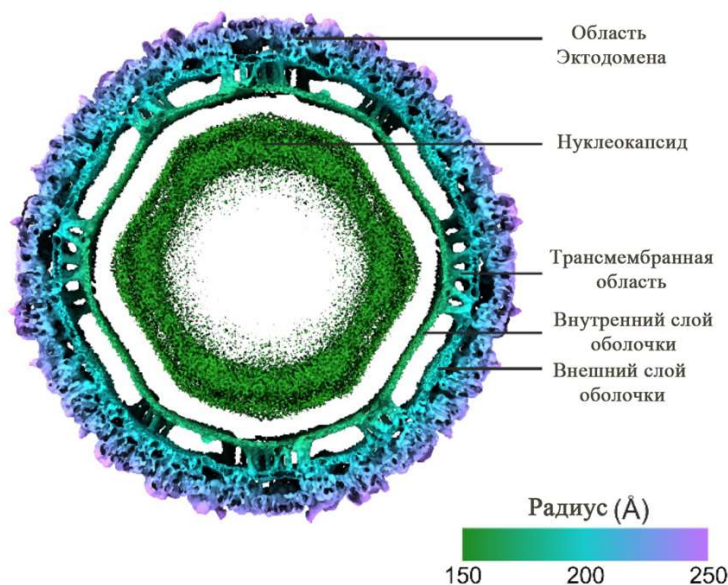


Рисунок 8 – Строение вириона ВКЭ, реконструированное с помощью криоэлектронной микроскопии на основе атомной модели. (Адаптировано по: Pulkkinen L.I.A. и др., 2022 [53])

1.6 Цикл репродукции ортофлавивирусов

Жизненный цикл ортофлавивирусов начинается с проникновения вируса в клетки хозяина путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Ортофлавивирусы используют для проникновения поверхностный гликопротеин Е, который связывается с молекулами адгезии и рецепторами на поверхности клетки. На данный момент известны рецепторы для ряда ортофлавивирусов [110]. В недавнем исследовании был открыт специфический рецептор для ВКЭ – LRP8 [111], предполагается существование ещё нескольких рецепторов, таких как ламинин-связывающий белок и интегрин [112].

При попадании в клетку-хозяина зрелого инфекционного вириона путем эндоцитоза кислая среда внутри эндосомы вызывает конформационные перестройки поверхностных белков ортофлавивирусов во фьюзогенную форму. На эффективность этого процесса влияют эндосомальный рН и специфическая конформация белка Е ортофлавивирусов [113].

Существует три класса вирусных белков слияния [114]. Белки слияния класса II встречаются у ортофлавивирусов и альфавирусов (например, вирус Семлики Форест). Эти белки имеют преимущественно структуру β -листа и существуют в виде димеров в префузионной форме и обычно активируются при низком значении рН в эндосоме (Рисунок 9 (Б)) [115]. После этого димеры белка Е ортофлавивирусов диссоциируют на мономеры, и каждый мономер затем подвергается перестройке с образованием тримеров (Рисунок 9 (В)). Этот переход делает петлю

слияния более доступной, и она встраивается в мембрану клетки-хозяина [113; 116]. Процесс слияния завершается, когда две мембраны полностью сливаются с образованием канала – поры, позволяя вирусному нуклеокапсиду высвободиться в цитоплазму хозяина (Рисунок 9 (Е)) [75].

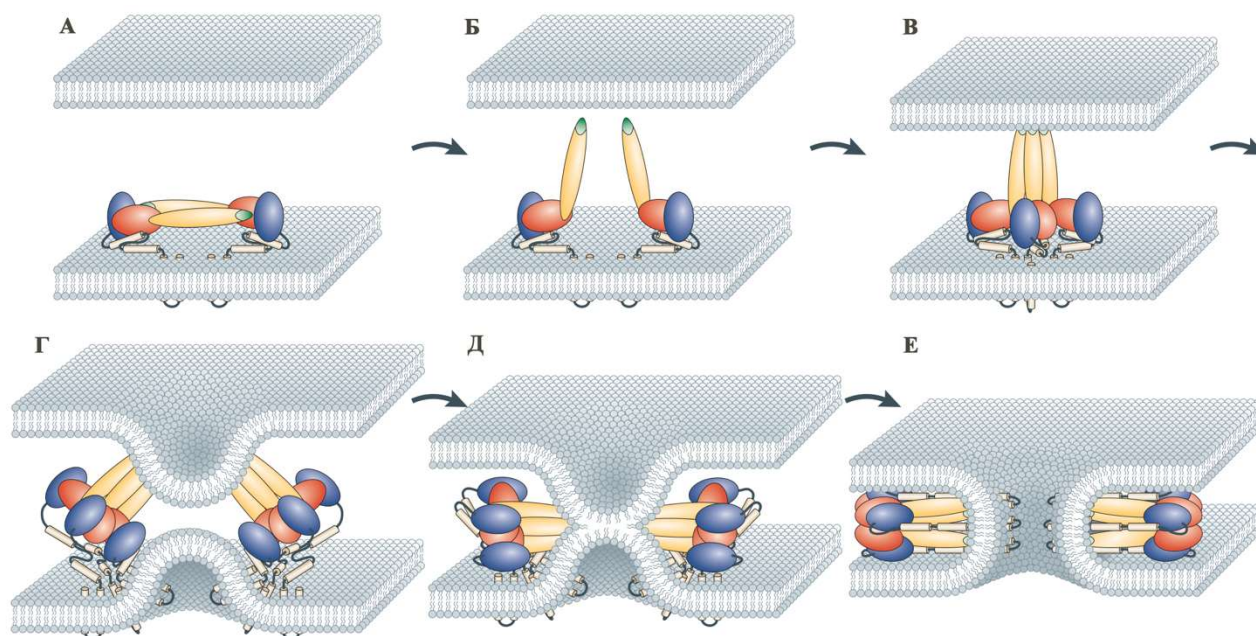


Рисунок 9 – Слияние мембран с помощью рецепторов слияния класса II (при проникновении ВКЭ). Димерная форма белка E находится на поверхности вируса, а пептид слияния (показан зеленым цветом) спрятан в димере (А). Белок связывается с рецептором и проникает в эндосому. В условиях низкого рН домен II разворачивается наружу по направлению к мембране клетки-хозяина, предположительно в области шарнира домена I-II (Б). Это конформационное изменение позволяет белкам E перестроиться латерально. Пептид слияния вставляется во внешний листок мембраны клетки-хозяина, обеспечивая образование тримеров белка E (В). Домен III белка E складывается обратно на себя и при этом приближает вирусную мембрану к пептиду слияния и мембране клетки-хозяина (Г). По мере продвижения домена III к домену II происходит гемифузия липидных мембран (Д), и в итоге образуется тример, в котором трансмембранные области и пептид слияния находятся в непосредственной близости друг от друга (Е). Для процессов слияния с белками слияния класса I и II с помощью рентгеновской кристаллографии наблюдали только первый и последний этапы, но биохимические анализы подтверждают наличие остальных этапов. (Адаптировано по: Mukhopadhyay S. и др., 2005 [55])

Вирусная РНК транслируется единым полипротеином, который подвергается совместному посттрансляционному расщеплению клеточными и вирусными протеазами на структурные и неструктурные белки. Репликация вирусного генома происходит в репликативных комплексах на внутриклеточных мембранах ЭПР. Эти мембранные структуры служат платформами для синтеза промежуточных РНК отрицательной полярности, которые, в свою очередь, служат матрицами для производства новой геномной РНК. Вновь синтезированная вирусная РНК упаковывается капсидным белком, и нуклеокапсид отпочковывается внутри цистерн ЭПР, приобретая липидную оболочку и формируя незрелые неинфекционные вирионы ортофлавириусов. Они содержат мембранный белок-предшественник рgМ, который образует гетеродимеры с оболочечным белком Е, создавая шипообразную, нерегулярную поверхность,

которая предотвращает преждевременное слияние с мембранами клеток-хозяев во время внутриклеточной транспортировки вируса по экзоцитозному пути [63; 117].

При прохождении через аппарат Гольджи незрелые вирионы подвергаются расщеплению белка ргМ фуриновой протеазой. Протеолиз запускает реорганизацию белков Е в димеры, которые укладываются на поверхности вириона, обнажая рецептор-связывающие сайты. Этот процесс, известный как созревание, приводит к образованию зрелых инфекционных вирионов [118]. Однако процесс расщепления ргМ в М эффективен не на 100%, в результате чего незрелые и частично зрелые формы также выходят из клетки вместе со зрелыми вирионами [5; 71; 119]. Строение зрелой и незрелой форм проиллюстрированы на Рисунке 10.

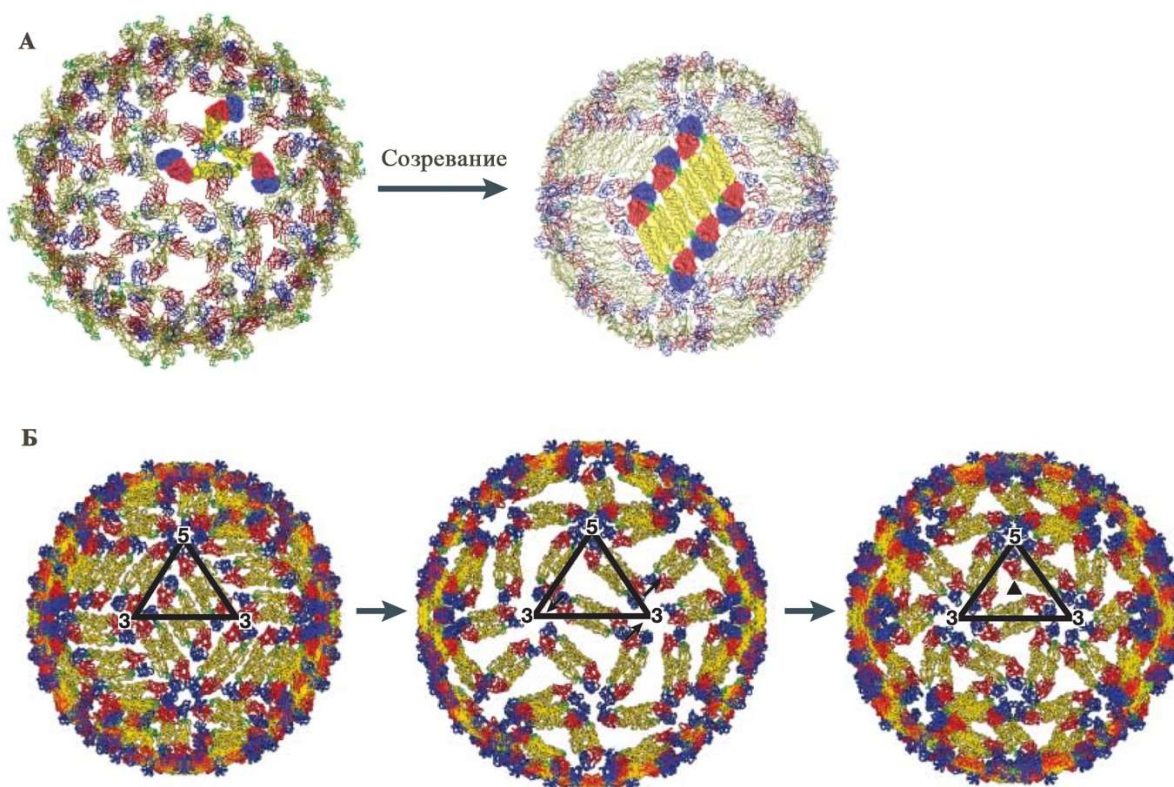


Рисунок 10 – (А) Димеры белков Е в незрелом вирусе (слева) перестраиваются, образуя зрелую вирусную частицу (справа). (Б) Димеры белков Е в зрелом вирусе (слева) подвергаются перестройке, образуя предполагаемую промежуточную структуру с симметрией псевдо $T=3$ фузогенного типа (справа) с возможным промежуточным звеном (в центре). Стрелки около треугольников указывают направление вращения белка Е. Треугольник указывает на положение оси квазисимметрии третьего порядка. Предполагаемая перестройка потребовала бы радиального расширения частицы на ~10% между промежуточной (в центре) и фузогенной формой (справа). (Адаптировано по: Mukhopadhyay S. и др., 2005 [55])

1.7 Распространение вируса клещевого энцефалита и других ортофлавириусов

Россия с ее обширной территорией и разнообразными климатическими зонами создает идеальные условия для коциркуляции ВКЭ с другими ортофлавириусами, переносимыми клещами, такими как ВОГЛ [120], ВПОВ [121] и переносимыми комарами – ВЗН [122], ВЯЭ [123]. Сочетаемые очаги ортофлавириусных инфекций располагаются в таких регионах России, как Западная Сибирь, Урал, Дальний Восток и на Европейской части территории, где

экологические условия позволяют сосуществовать клещам- и комарам-переносчикам и способствуют одновременной передаче нескольких патогенов [124].

В регионах Западной Сибири и Урала наблюдается совместная циркуляция сибирского подтипа ВКЭ и ВОГЛ, передаваемых преимущественно клещами родов *Ixodes* и *Dermacentor*. Не так давно ВОГЛ был выявлен в клещах в Казахстане и Кемеровской области России, где также зафиксирована его совместная циркуляция с ВКЭ [125–127]. Совместные очаги осложняют клиническую диагностику заболеваний, вызванных этими вирусами, из-за схожести симптомов, особенно на начальной стадии инфекции, что требует применения более точных лабораторных тестов для правильной постановки диагноза [128]. На данный момент не существует коммерческих ИФА тест-систем для выявления антител к ВОГЛ. Отсутствие зарегистрированных случаев заражения ВОГЛ в России в последние десятилетия может быть связано с недостаточной чувствительностью существующих диагностических ПЦР тестов или возможным защитным эффектом вакцины против КЭ, для которой в экспериментах *in vivo* была продемонстрирована частичная перекрёстная защита в отношении ВОГЛ. Однако клиническое значение вакцины КЭ против ВОГЛ остаётся недостаточно изученным [129; 130].

На юге России и в Западной Сибири циркулирует другой ортофлаivirus – ВЗН, переносимый в основном комарами рода *Culex*, которые распространены в этих регионах. Таким образом, здесь формируются сложные эпидемиологические условия, в которых могут совместно циркулировать ВКЭ и ВЗН. Согласно данным эпидемиологического мониторинга в последние годы отмечается постепенное расширение ареала ВЗН на север, что способствует увеличению территорий с потенциальной коциркуляцией этих ортофлаivirusов [131]. В 2021 году на территории Московской агломерации была зафиксирована вспышка ВЗН, подтвердившая проникновение вируса в регион, ранее считавшийся эндемичным [132]. Исследования показывают, что люди в эндемичных районах часто имеют антитела к обоим вирусам, что свидетельствует о необходимости более детальной серодиагностики для постановки дифференциального диагноза [133]. Эта проблема становится актуальной и для Европы, где коциркуляция ВЗН и ВКЭ была зарегистрирована в нескольких странах, включая Австрию, Венгрию и Италию. Как и в России, перекрывающиеся ареалы этих вирусов усложняют эпидемиологический мониторинг и дифференциальную диагностику, поскольку оба ортофлаivirusа могут вызывать сходные симптомы повреждения ЦНС, но передаются разными переносчиками [134; 135]. Несмотря на существование отдельных тест-систем для выявления антител к ВЗН и ВКЭ, проблему их кросс-реактивности отмечают многие исследователи [136–139].

На Дальнем Востоке России наиболее распространён дальневосточный подтип ВКЭ, способный вызывать наиболее тяжелое заболевание [140; 141]. Тут он сосуществует с ВПОВ.

Хотя коммерческие серодиагностические тесты на антитела к ВПОВ существуют, их доступность ограничена, а интерпретация результатов осложняется перекрестной реактивностью с другими ортофлавирусами [142]. В сочетании с тем фактом, что ВПОВ может вызывать быстро прогрессирующее заболевание с высокой смертностью или долгосрочными неврологическими последствиями, этот диагностический пробел представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения в эндемичных регионах [143]. В исследованиях сообщалось о значительных показателях распространенности антител сразу против нескольких ортофлавирусов, в том числе и ВПОВ, что подчеркивает существенный риск для здоровья населения, создаваемый сочетаемыми очагами [144].

ВЯЭ, хотя и менее распространен в России, представляет угрозу для здоровья населения. Современное распространение ВЯЭ в России не определено, поскольку не проводится соответствующего мониторинга. Завозные случаи инфекции ВЯЭ в значительной степени регистрируются благодаря массовому развитию туризма: в 2014 году в России был зарегистрирован завозной случай японского энцефалита у туриста, вернувшегося из Таиланда. У пациента развилась тяжелая форма заболевания с поражением ЦНС, что было подтверждено данными МРТ и лабораторными исследованиями [145]. Совместные очаги вызывают особую озабоченность в связи с нейровирулентностью обоих вирусов, что требует дополнительных инструментов для их дифференциальной диагностики и грамотного эпидемиологического надзора [146].

1.8 Клинические проявления при заражении вирусом клещевого энцефалита

Инфекция, вызванная ВКЭ, приводит к целому спектру клинических проявлений – от легкого лихорадочного состояния до тяжелых неврологических осложнений [4].

Ежегодно во всём мире регистрируется примерно 10 000-15 000 случаев заражения ВКЭ [147]. Случаи заражения ВКЭ ежегодно отмечают более чем в 25 странах Европы и 7 странах Азии [120]. Наиболее высокая заболеваемость регистрируется в Центральной и Восточной Европе, России, а также в некоторых частях Китая, где в эндемичных регионах показатели заболеваемости КЭ доходят до 2 случаев на 300 тысяч населения в год [150–152].

Заболевание КЭ может протекать двухфазно. Начальная фаза включает неспецифические симптомы, такие как лихорадка, головная боль, недомогание и миалгия, продолжающиеся в течение 2-7 дней. Затем заболевание может переходить во вторую фазу, характеризующуюся поражениями ЦНС и сопровождающуюся такими симптомами как менингит, энцефалит и менингоэнцефалит [4]. В редких случаях может возникнуть поражение спинного мозга – миелит, приводящий к острому вялому параличу, особенно у пожилых пациентов [153].

Тяжесть клинических проявлений клещевого энцефалита во многом зависит от возраста и иммунного статуса пациента. У детей заболевание часто протекает бессимптомно или в лёгкой форме, у взрослых может развиваться поражение центральной нервной системы. Клиническое течение инфекции может различаться в зависимости от подтипа вируса. Европейский подтип обычно ассоциирован со сравнительно низкой летальностью около 1–2 %. Для сибирского подтипа описаны более тяжёлые формы заболевания, летальность около 6–8 %, и возможно хроническое течение заболевания. Дальневосточный подтип связывают с наиболее тяжёлым течением и высокой летальностью, которая в отдельных исследованиях достигает 20–40 %. Несмотря на это, для каждого подтипа описаны разнообразные клинические проявления: от бессимптомных случаев до тяжелых форм энцефаломиелитов. Данные по смертности для каждого из подтипов не всегда учитывают различные социальные факторы [154–156]. Примерно у 30-50% переболевших тяжелой формой КЭ наблюдаются долгосрочные последствия, такие как когнитивные нарушения, усталость и двигательная дисфункция, что значительно сказывается на качестве жизни [153].

Наиболее эффективным способом защиты от КЭ является вакцинация [17]. В качестве экстренной профилактики на территории РФ применяется противовирусный иммуноглобулин, который имеет ряд недостатков [157].

1.9 Иммуный ответ при клещевом энцефалите

Иммунный ответ хозяина включает в себя как врожденные, так и адаптивные компоненты [158]. Центральной клеткой иммунной системы является лимфоцит, от функциональной активности которого зависит способность организма к полноценной реализации иммунного ответа. Было отмечено, что при КЭ возникают внутрипопуляционные изменения лимфоцитов. При остром КЭ относительное и абсолютное содержание Т-лимфоцитов в крови снижено. Функция В-лимфоцитов при острой инфекции не нарушена. Отмечены активная пролиферация В-клеток и двукратное повышение их содержания в периферической крови с нормализацией числа лимфоцитов к концу третьего месяца с момента инфицирования [159]. Иммунный ответ при КЭ формируется за счёт взаимодействия Th1- и Th2-лимфоцитов и во многом определяется балансом продуцируемых ими цитокинов. ВКЭ вызывает сильный провоспалительный ответ с подъемом уровня таких цитокинов, как фактор TNF- α (некроза опухоли α), IL-6 и IFN- γ , которые предположительно способствуют повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера. Это может облегчать вирусную инвазию в ЦНС, что приводит к апоптозу нейронов и нейровоспалению [160].

В-клеточный иммунный ответ при инфекции ВКЭ является определяющим фактором защиты и основывается на многоуровневой активации гуморального иммунитета. На ранних

этапах инфекции, через 4–10 дней после заражения, выявляются иммуноглобулины М (IgM), направленные главным образом против белка Е, который служит ключевым диагностическим маркером и отражает первичный контакт с антигеном [161].

Важную роль в В-клеточном иммунном ответе играют долгоживущие плазматические клетки костного мозга, которые поддерживают стабильный уровень циркулирующих IgG в течение десятилетий, а также клетки памяти, быстро активирующиеся при повторном контакте с антигеном [162]. Показано, что у вакцинированных лиц уровень нейтрализующих антител может снижаться через 5–10 лет, но при этом сохраняется пул В-клеток памяти, обеспечивающий эффективный бустерный ответ [163; 164].

Заболевание, вызванное ВКЭ, остается серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Более глубокое понимание механизмов патогенеза заболевания, а также своевременная специфическая диагностика необходимы для разработки целевой терапии и улучшения результатов лечения пациентов.

1.10 Антителозависимое усиление инфекции

АТЗУИ – это иммунологическое явление, при котором уже существующие антитела к одному вирусу способствуют проникновению близкородственного вируса в фагоцитирующие клетки хозяина, что приводит к увеличению вирусной нагрузки, быстрому распространению вируса по организму и усугублению тяжести заболевания. Этот механизм особенно актуален в контексте переносимых комарами ортофлавивирусов. Феномен АТЗУИ характерен для нескольких ортофлавивирусов, включая ДЕНВ и вирус Зика, и подтвержден как экспериментальными (*in vitro* и *in vivo*), так и клиническими данными. Для переносимых клещами ортофлавивирусов АТЗУИ показано только в экспериментах *in vitro*. Изучение данного феномена легло в основу разработки безопасных вакцин, новых методов лечения и подчеркнуло важность качественной диагностики этих инфекций [165–167].

ДЕНВ имеет четыре серотипа (ДЕНВ-1, ДЕНВ-2, ДЕНВ-3 и ДЕНВ-4). Первичное заражение одним серотипом обычно приводит к выработке нейтрализующих антител и, в большинстве случаев, легкой или бессимптомной форме заболевания. Однако при вторичном заражении другим серотипом, ранее синтезированные антитела могут усилить проникновение и репликацию другого серотипа посредством механизма АТЗУИ (Рисунок 11) [168; 169].

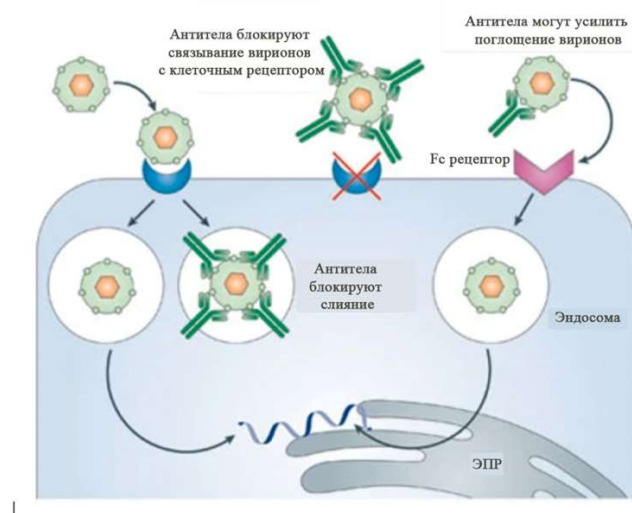


Рисунок 11 – Механизм нейтрализации и АТЗУИ на примере ДЕНВ: при высокой степени связывания с эпитопами антитела блокируют способность вируса к прикреплению к клетке и проникновению в неё; при низкой — некоторые антитела способствуют проникновению вируса через Fc-рецепторы. (Адаптировано по: Rothman A.L. и др., 2011 [170])

Антитела к домену III белка E более специфичны и зачастую хорошо нейтрализуют вирус, однако они составляют лишь часть популяции антител, вырабатываемых у людей в процессе ортофлавивирусной инфекции, тогда как за АТЗУИ ответственны в основном не-нейтрализующие антитела или антитела в субнейтрализующих концентрациях, которые в основном вырабатываются к домену I и II. Было показано, что моноклональные антитела, реагирующие с доменами I и II или rgM, слабо нейтрализовали вирус и имели широкую перекрестную реактивность с четырьмя серотипами ДЕНВ, а также усиливали инфекцию в субнейтрализующих концентрациях [171]. На данный момент времени нет данных о значении перекрестных реакций между ортофлавивирусами переносимыми комарами и клещами.

Феномен АТЗУИ подчеркивает критическую важность оценки не только наличия анти-ВКЭ-антител, но и их специфичности – особенно соотношения антител, нацеленных на домены I и II, и домена III [172; 173].

Измерение соотношения антител к различным доменам белка E после инфицирования или вакцинации может помочь определить соотношение иммунной защиты и потенциального риска, а также подчеркивает важность разработки более специфической диагностики. Поэтому детальное профилирование домен-специфических ответов антител необходимо для оценки риска АТЗУИ и функционального качества гуморального ответа.

1.11 Основные подходы в диагностике клещевого энцефалита

Диагностика клещевого энцефалита основывается на комплексе лабораторных методов, таких как серологические тесты, например, ИФА для выявления специфических антител к

ортофлавивирусам, и ПЦР, позволяющую обнаруживать вирусную РНК в крови или СМЖ. Также в некоторых случаях применяются современные подходы, такие как мультиплексные панели для выявления нескольких патогенов одновременно и секвенирование нового поколения (NGS). Наряду с этим используются методы иммунофлуоресценции и иммуногистохимии, позволяющие выявлять вирусные антигены в тканях с высокой специфичностью благодаря применению моноклональных антител [174–177].

Выбор метода зависит от стадии инфекции, типа имеющегося клинического материала и целей диагностики. ПЦР незаменим для ранней диагностики на виремической стадии, а ИФА, направленный на выявление антител к вирусу, - для подтверждения диагноза на более поздних стадиях (Таблица 1). Интеграция этих методов с применением подтверждающих тестов, таких как РН, обеспечивает точную диагностику и эффективное лечение пациентов [178; 179].

Таблица 1 – Методы выявления ВКЭ или антител к нему на разных стадиях инфекции

Стадия инфекции	Диагностический метод	Клинический материал
1 – 7 день (виремическая фаза)	ПЦР / изоляция вируса	Кровь / сыворотка
4 – 10 день	ИФА (выявление IgM антител) / ПЦР	Кровь / СМЖ
2 – 4 неделя (фаза выздоровления)	ИФА (выявление IgG антител) / тест нейтрализации	Кровь / сыворотка
Посмертное исследование	Иммунофлуоресценция / иммуногистохимия	Образцы тканей

1.11.1 Обнаружение генома вируса клещевого энцефалита с помощью полимеразной цепной реакции

В то время как обнаружение антител имеет решающее значение для установления контакта с ВКЭ, обнаружение вирусной РНК является подтверждением продуктивной инфекции на ранних этапах заболевания. ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ), направленная на консервативные участки генома, является высокочувствительным и специфичным методом обнаружения РНК ВКЭ в клинических образцах [180]. Лабораторные анализы ПЦР-РВ обеспечивают широкое обнаружение различных вариантов ВКЭ. Такие системы крайне необходимы в эпидемиологических и исследовательских целях [181].

Несмотря на свою чувствительность и специфичность, ПЦР имеет ряд ограничений, обусловленных природой вируса, клиническим течением заболевания, а также техническими и логистическими проблемами. Так, метод ПЦР наиболее эффективен в течение первых 7 дней после заражения, когда еще нет характерных неврологических проявлений. В этот период

вирусная РНК может быть обнаружена в образцах крови или сыворотки, однако процент ее выявления у больных довольно низок, т.к. вирус циркулирует в крови кратковременно. Отрицательный результат при поиске вирусных генов в СМЖ и крови не является достаточным основанием для исключения диагноза и не может служить единственным критерием его постановки. Время появления и длительность циркуляции вируса в крови зависит от многих факторов: индивидуальных особенностей пациента, дозы вируса при инфицировании, свойств вируса и др. [182]. При этом низкая вирусная нагрузка снижает эффективность ПЦР [20], [183–186].

Другой проблемой при исследовании материала с помощью ПЦР является генетическая изменчивость подтипов ВКЭ. Праймеры и зонды для ПЦР разработаны с учетом консервативных областей вирусного генома, мутации в этих областях могут снижать чувствительность анализа [187]. Даже в эндемичных регионах диагностические возможности могут различаться, при этом небольшие или сельские лаборатории часто не имеют доступа к передовым технологиям ПЦР [188].

Ограничения ПЦР указывают на необходимость использования дополнительных диагностических подходов. Сочетание ПЦР с серологическими методами повышает точность диагностики и дает более полное представление об инфекционном статусе пациента [189].

1.11.2 Обнаружение антител в клиническом материале

Исторически при исследовании биологических жидкостей для выявления поликлональных антител различных классов использовали ИФА на основе инактивированного ВКЭ [190–192]. В дальнейшем использование инактивированного ВКЭ в качестве основы для ИФА стало стандартом, именно на этом основано подавляющее большинство коммерчески доступных тест-систем [193; 194]. Кросс-реактивность антител к различным ортофлавивирусам ведёт к проблемам со специфичностью таких ИФА тест-систем [21; 22], [24]. Эта проблема широко распространена в регионах, где совместно циркулируют несколько ортофлавивирусов, что приводит к ложноположительным результатам и снижению диагностической специфичности [195].

В большинстве коммерческих ИФА-наборов для диагностики ВКЭ в качестве антигена используется инактивированный цельный вирус, полученный из культур клеток. Такие как, применяемые в Европе наборы серии SERION ELISA classic (Virion/Serion), RIDASCREEN (R-Biopharm) и Euroimmun Anti-TBEV ELISA [196]. Коммерческие наборы могут отличаться по используемому в качестве антигена штамму. Европейский набор Immunozyum FSME (Progen) основан на штамме Neudorfl, наборы Euroimmun Anti-TBEV ELISA и Enzygnost (Siemens) используют антиген штамма K23, набор Reagent TBE основан на штамме Kumlinge A52. Все эти наборы основаны на штаммах европейского подтипа ВКЭ, которые несмотря на различия,

демонстрируют высокую гомологию (около 94% по аминокислотной последовательности), что может снижать точность диагностики в регионах, где циркулируют другие подтипы ВКЭ [24; 28; 196; 197].

В России преимущественно используются наборы, основанные на дальневосточном подтипе ВКЭ [198]. Географические особенности, не учтенные преимущественно в конструкции европейских наборов, могут привести к ложноотрицательным результатам или к ошибкам при оценке распространенности заболевания [11; 21].

ИФА широко используются для выявления специфических IgM и IgG к ВКЭ, но при их интерпретации необходимо учитывать временную динамику выработки антител. На кинетику появления антител влияют такие факторы, как возраст пациента, иммунный статус и подтип ВКЭ, при этом более тяжелые инфекции (например, вызванные сибирским и дальневосточным подтипами) часто приводят к более высоким титрам и длительной циркуляции IgG антител [187; 199].

Как было описано ранее после инфицирования ВКЭ у человека начинает формироваться гуморальный иммунный ответ, который характеризуется последовательным появлением антител – IgM и IgG (Рисунок 12). Антитела IgM обычно появляются в сыворотке крови и СМЖ через 4-10 дней после начала проявления первых симптомов КЭ, что знаменует собой острую фазу инфекции. Уровень IgM антител достигает максимума на ранних стадиях инфекции, а затем снижается к 2-3 месяцам после заражения, хотя в некоторых случаях низкие уровни антител могут сохраняться до 6 месяцев [5; 153; 200]. Антитела IgG, напротив, появляются позже – обычно, примерно, на второй неделе после заражения – и их уровень постоянно увеличивается в период выздоровления, сохраняясь в течение многих лет или даже десятилетий, поэтому они служат маркером перенесенной инфекции или успешной вакцинации [4]. Антитела IgG, особенно таких подклассов, как IgG1 и IgG3, обладают выраженной нейтрализующей способностью и имеют решающее значение для долгосрочной защиты [201]. Таким образом, положительный результат выявления IgM у пациента с недавним появлением симптомов указывает на острую инфекцию, в то время как положительный результат выявления IgG антител может отражать прошлый контакт или вакцинацию [150]. Диагноз КЭ обычно подтверждается при обнаружении в крови антител класса IgM (IgM) и/или при четырехкратном и более увеличении титров IgG антител при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом в 2–4 недели [202–205].

Хотя длительное присутствие IgG в сыворотке крови ценно для ретроспективной эпидемиологии и оценки протективного иммунитета, в эндемичных очагах оно осложняет разграничение острой и перенесенных в прошлом ортофлавирусных инфекций, что требует постановки более сложных тестов, таких как РН.

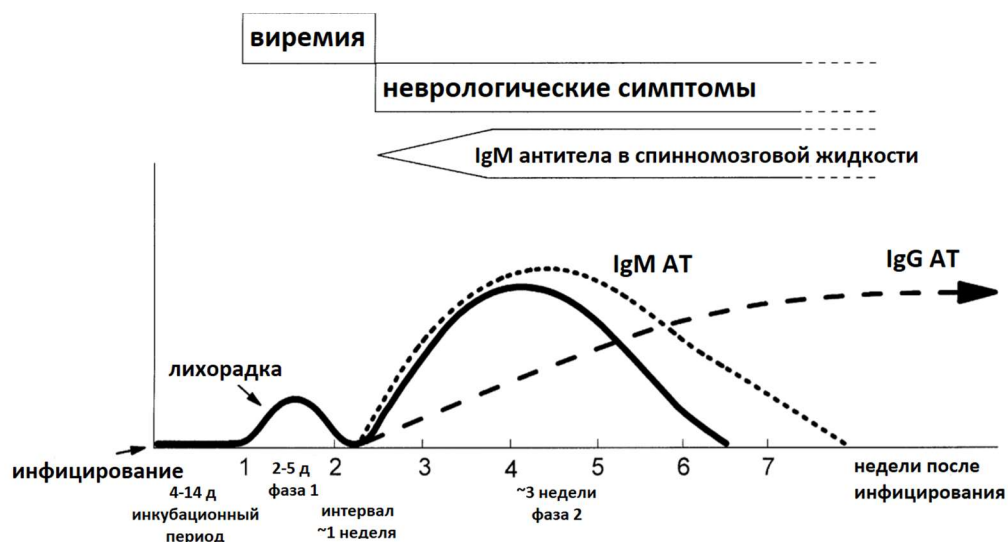


Рисунок 12 – Динамика появления специфических IgM и IgG антител в сыворотке крови и СМЖ при двухфазном течении инфекции КЭ. (Адаптировано по: Н. Holzmann, 2003 [206])

Вакцинация, как правило, индуцирует выработку IgG антител и обеспечивает их длительную персистенцию, что гарантирует защиту от заболевания на протяжении нескольких лет. Однако, с течением времени наблюдается постепенное снижение титра антител [207]. Это обуславливает необходимость проведения ревакцинации для поддержания иммунитета. Мониторинг динамики поствакцинального иммунного ответа крайне важен для оптимизации схем иммунизации и анализа причин редких случаев заболевания среди вакцинированных [97; 206; 208].

Таким образом, сохраняется потребность в совершенствовании методов диагностики антительного иммунного ответа к ВКЭ, обладающих повышенной специфичностью и чувствительностью.

1.11.2.1 Иммуноферментный анализ на основе рекомбинантных белков вируса клещевого энцефалита

Исследования показывают, что использование в качестве антигенов рекомбинантных белков E или отдельных его доменов, может значительно повысить специфичность и чувствительность ИФА при диагностике КЭ [209]. В частности, как было сказано ранее, домены I и II имеют в своём составе кросс-реактивные эпитопы, что свидетельствует о возможности их использования в качестве основы для пан-флавивирусной тест-системы [210]. В свою очередь, иммуноглобулиноподобный домен III содержит дифференцирующие эпитопы и может быть использован как основа для создания специфической тест-системы [73; 211]. Таким образом рекомбинантные домены белка E являются перспективными кандидатами для разработки новых диагностических тестов.

В одном из первых исследований по использованию рекомбинантных белков в качестве антигенов для ИФА для диагностики ортофлавирусных инфекций, был получен рекомбинантный домен III белка E ВКЭ. Для тестирования главным образом были взяты иммунные сыворотки лабораторных животных, предварительно охарактеризованные в РН. ИФА тест-система на основе рекомбинантного домена III белка E вируса клещевого энцефалита (штамм Kumlinge) продемонстрировала высокую специфичность при исследовании сывороток, содержащих антитела как к клещевым, так и к комариным ортофлавирусам. Однако она не позволила чётко дифференцировать антитела внутри группы вирусов, переносимых клещами (в частности, ВКЭ и вирус Лангат) [212]. Было проведено сравнение использования в качестве антигена в ИФА домена III белка E штамма Oshima, дальневосточного подтипа ВКЭ, и субвирусных частиц (СЧ), содержащих белки рМ и Е, совместно экспрессированные в клетках Vero. В этом исследовании использовали сыворотки диких грызунов (вида *Myodes rufocanus bedfordiae* и *Apodemus speciosus*), отловленных в эндемичных районах Хоккайдо в Японии. Чувствительность СЧ оказалась выше, чем при использовании домена III. Стоит отметить, что кросс-реактивность антител в этом исследовании была изучена только с ВЯЭ [213].

Отдельным направлением исследований является применение домен-специфического ИФА для дифференциации антител к ВКЭ и ВЗН. Показано, что рекомбинантные белки Е, в которых была удалена или модифицирована петля слияния в домене dIII обоих вирусов, значительно снижают перекрестную реактивность. Это было продемонстрировано при тестировании сывороток людей с диагнозами КЭ и лихорадкой Западного Нила (ЛЗН), собранных во время вспышек на территории северо-востока Италии, а также при анализе сывороток лошадей с антителами к ВЗН, выявленных в ходе рутинной диагностики коммерческими наборами (ID Screen West Nile IgM Capture и ID Screen West Nile Competition, IDVet, Монпелье, Франция) на территории Австрии. Исследование подчеркнуло важность использования менее консервативных участков белка Е для повышения диагностической специфичности [135].

В последнее время в литературе появляется всё больше сообщений о том, что использование белка NS1 совместно с белком Е в ИФА повышает диагностическую чувствительность и специфичность анализов [179; 214]. Кроме того, недавние исследования показали, что ИФА на основе NS1 позволил выявить КЭ на более ранних сроках по сравнению с ИФА, основанном только на белке Е. Использование рекомбинантных антигенов (домен III белка Е и NS1) ВКЭ, ВЗН, вируса Зика и ДЕНВ в мультиантигенном ИФА позволило эффективнее дифференцировать ортофлавирусные инфекции. Такой подход может обеспечить более четкую диагностическую картину [215]. Исследования, направленные на улучшение диагностических тест-систем, являются перспективным направлением, но требуют дальнейшего

изучения эффективности, чувствительности выявления антител к ВКЭ и специфичности относительно антител к другим ортофлавирусам [216; 217].

Таким образом, использование доменов белка Е в качестве антигенов для ИФА может обеспечивать высокую эффективность выявления антител к ВКЭ. Применение различных доменов белка Е ВКЭ формирует комплексный диагностический профиль, что дает возможность детально охарактеризовать динамику иммунного ответа.

1.11.2.2 Системы латерально-проточных анализов

Латерально-проточный анализ (ЛПА) – один из самых удобных и быстрых методов диагностики, подходящий для проведения анализов в любом месте. Он основан на комплексах, образованных рекомбинантным антигеном и мечеными антителами, расположенных на нитроцеллюлозной мембране. Присутствие специфических антител или антигенов в образце приводит к появлению видимой линии на тест-полоске. ЛПА на основе поверхностного гликопротеина Е для ВКЭ благодаря простоте использования является ценным инструментом для быстрой диагностики в полевых условиях [20]. Проточные анализы, предназначенные для выявления специфических ВКЭ антител, обычно выявляют IgM антитела в сыворотках пациентов. Одним из ярких примеров является коммерчески доступный ЛПА экспресс-тест «ReaScan TBE IgM», который занимает всего 20 минут. В исследовании, проводимом с использованием 172 образцов сыворотки крови пациентов, находящихся в острой фазе КЭ, и 306 отрицательных образцов, тест-система продемонстрировала высокую чувствительность (99%) и специфичность (97%) при выявлении IgM антител против ВКЭ. Однако, несмотря на довольно высокие показатели, такой анализ имеет и ряд недостатков. ЛПА дает качественные результаты, только указывая на наличие или отсутствие антител без количественного определения их концентрации. В отличие от ЛПА, ИФА может предоставить количественные данные, что очень важно для мониторинга развития болезни при оценке парных сывороток. Ко всему прочему, разработчики «ReaScan TBE IgM» отмечают, что существует вероятность получения ложноположительных результатов при использовании ЛПА у людей с инфекциями, вызывающими перекрестные серологические реакции [218].

Таким образом экспресс-тесты на основе ЛПА, в частности, «ReaScan TBE IgM» представляют собой быстрый и удобный метод предварительного выявления IgM антител к ВКЭ. Однако, при проведении тестов сотрудники лабораторий и исследователи, зная о недостатках таких анализов, проводят дополнительные анализы для обеспечения точной диагностики.

1.11.3 Биосенсоры для выявления ортофлавирусов

В последние годы активно развиваются биосенсорные методы диагностики, предназначенные для быстрого выявления вирусной РНК или специфических антител к

ортофлавивирусам. Наибольшее внимание уделяется электрохимическим и безмаркерным платформам, которые сочетают высокую чувствительность, специфичность и возможность проведения анализа вне специализированной лаборатории. В таких системах в качестве распознающих элементов используют антитела, олигонуклеотиды или пептиды, а регистрацию сигнала осуществляют методами импедиметрии, вольтамперометрии и другими электроаналитическими подходами. Это делает биосенсоры перспективным инструментом для быстрой и портативной диагностики [219; 220].

Несмотря на успехи и растущий интерес, значительная часть исследований сосредоточена на ортофлавивирусах, переносимых комарами, в то время как биосенсорных систем, специально разработанных для детекции антител к ортофлавивирусам, переносимым клещами, не существует. Например, была разработана платформа для выявления антител к ВЗН, ДЕНВ, вирусам Зика и Усутсу с помощью электрохимических изменений при связывании белка E или его домена III. Эта платформа не проявляла кросс-реактивности по отношению к неродственным вирусам [221; 222]. В анализе на основе частиц золота антитела к вирусу Зика удалось отличить от антител к ДЕНВ, однако описанная платформа также требует получения рекомбинантных белков [223]. Кроме того, были разработаны биосенсоры на основе локализованного поверхностного плазмонного резонанса золотых частиц, которые успешно обнаруживали ортофлавивирусы в образцах насекомых [224]. Адаптация существующих платформ, снижение перекрёстной реактивности, обеспечение стабильности и стандартизация – всё это остаётся важной задачей для дальнейшего развития биосенсорных методов диагностики ортофлавирусных инфекций.

1.12 Заключение по разделу

Дифференциальная диагностика КЭ имеет принципиальное клиническое значение, поскольку при подтверждённом диагнозе применяется специфический иммуноглобулин, содержащий антитела к ВКЭ [225; 226]. В то же время для ортофлавивирусов, переносимых комарами, таких как ДЕНВ, вирус Зика, перекрёстно-реактивные, но слабо нейтрализующие антитела могут приводить к АТЗУИ, способствуя проникновению вируса в Fc-рецептор-положительные клетки, способствуя более тяжелому течению заболевания [227]. Надёжная серологическая идентификация антител к ВКЭ играет ключевую роль в корректной интерпретации лабораторных данных и обеспечивает основу для обоснованных клинических и диагностических решений [228].

Данные, полученные в результате серологических исследований, могут служить руководством для проведения мероприятий в области общественного здравоохранения, таких

как кампании по вакцинации, программы по борьбе с переносчиками и инициативы по повышению осведомленности общественности, направленные на снижение заболеваемости КЭ.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует проводить рутинное серологическое тестирование в эндемичных по КЭ районах для предотвращения крупномасштабных вспышек и оценки эффективности вакцин [229; 230]. Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости КЭ варьируется по всему миру, при этом наибольшее число случаев приходится на страны Восточной Европы и Россию. В России КЭ остается значительной угрозой для здоровья населения [151; 231; 232].

Исследования показали, что лабораторные тест-системы на основе рекомбинантных белков могут достигать лучшей диагностической точности с чувствительностью и специфичностью, сопоставимыми с коммерческими наборами [233; 234]. Кроме того, наличие лабораторных тест-систем позволяет более гибко адаптировать анализы для выявления новых вариантов ВКЭ. Также одним из преимуществ таких диагностических методов является их экономическая эффективность. Производство рекомбинантных белков и использование их в качестве антигенов в диагностических наборах могут быть выполнены в лабораториях без специально оборудованных помещений для работы со второй группой патогенности, что значительно сокращает расходы. Это делает тест-системы на основе рекомбинантных белков особенно перспективными. Тем не менее, эффективность лабораторных тест-систем для выявления анти-ВКЭ антител на основе рекомбинантных белков должна быть тщательно проверена в сравнении с коммерческими анализами, особенно в регионах, где наблюдается коциркуляция нескольких ортофлавивирусов. Дальнейшее развитие и валидация таких наборов для диагностики КЭ расширит возможности по мониторингу и контролю заболевания, что в конечном итоге будет способствовать улучшению здоровья населения.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Вирусы

Для получения рекомбинантных белков в работе использовали ВКЭ сибирского подтипа штамм Сухар (GenBank: OP185392) и дальневосточного подтипа штамм Софьин (GenBank: GU121963). Штаммы всех используемых в работе вирусов из коллекции лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) указаны в Таблице 2. Вирусы хранились при -80°C в виде аликвот 10% мозговой суспензии от инфицированных мышей или культуральной жидкости (КЖ) после размножения вируса в культуре клеток СПЭВ.

Таблица 2 – Штаммы ортофлавирусов, используемых в работе [235]

Штамм	Регион и год получения	Откуда выделен	Номер в GenBank
ВКЭ дальневосточного подтипа			
SofjinKGG	Приморский край, СССР, 1937	Мозг пациента умершего от ВКЭ	GU121963
205	Хабаровский край, СССР, 1973	<i>I. persulcatus</i>	GU121964
DV-936k	Приморский край, СССР, 1975	<i>I. persulcatus</i>	GU125722
ВКЭ сибирского подтипа			
Sukhar	Ярославская область, Россия, 2016	Мозг пациента, умершего от ВКЭ	OP185392
EK-328	СССР (совр. терр. Эстонская Республика), 1972	<i>I. persulcatus</i>	DQ486861
Kurg-59	Курганская область, СССР, 1989	<i>I. persulcatus</i>	
ZauPVV	Неизвестно, до 2000	Неизвестно	OQ673266
VK476	Волгоградская область, СССР, 1975	<i>I. ricinus</i>	OQ673268
Karl14-T20468	Республика Карелия, Россия, 2014	<i>I. persulcatus</i>	MT424738
Yuk 4/13	Кемеровская область, СССР, 1969	<i>I. persulcatus</i>	GU125721
Ya-10/89	Ярославская область, СССР, 1989	<i>I. persulcatus</i>	GU125719
ВКЭ европейского подтипа			
256	СССР (совр. терр. Республика Беларусь), 1940	<i>I. ricinus</i>	AF091014
Absettarov	Ленинградская область, СССР, 1951	Кровь пациента с КЭ	KU885457
MOS-152-N-2017	Город Москва, Россия, 2017	<i>I. ricinus</i>	OQ673267
LK-138	СССР (совр. терр. Литовская Республика), 1972	<i>I. ricinus</i>	GU125720
ВКЭ подтип Байкальский-1			
178-79	Иркутская область, СССР, 1979	<i>I. persulcatus</i>	EF469661

Продолжение Таблицы 2

ВКЭ подтип Байкальский-2			
886–84	Иркутская область, СССР, 1984	Мозг красно-серой полёвки	EF469662
ВПОВ			
Pow-24	Приморский край, СССР, 1976	<i>I. persulcatus</i>	MG652438
ВОГЛ, подтип 1			
Nikitina	Омская область, СССР, 1948	Кровь пациента с ОГЛ	GU290187
Вирус Лангат			
TP-21 (Elantsev)	Малайя, 1956	<i>Ixodes granulatus</i>	M73835
ВЗН линия 1			
Hp-90	Астраханская область, СССР, 1963	<i>Hyalomma marginatum</i>	JX041633.1
ВЗН линия 2			
B958	Неизвестно, до 1980	Неизвестно	OQ673269
ВЯЭ			
Jagar	Неизвестно, до 1975	Неизвестно	-

Совр.терр. – современная территория

2.1.2 Бактерии и плазмиды

Escherichia coli (*E.coli*) TOP10 (Invitrogen, США). Генотип: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-

E. coli JM109 (Promega, США). Генотип: endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+).

Плазмиды семейства pQE: pQE-60, pQE-30 (Qiagen, Германия) – были любезно предоставлены сотрудниками Учебно-научного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (УНЦ ИБХ РАН).

2.1.3 Культуры клеток

Перевиваемую культуру клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) культивировали при 37°C в среде, состоящей из смеси из среды 199 на растворе Хенкса и растворе Эрла (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия), в соотношении 2:1 в присутствии 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Invitrogen, США). Культуру клеток СПЭВ любезно предоставила научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Рогова Анастасия Андреевна.

Перевиваемую культуру клеток эпителия почки зелёной мартышки (Vero) культивировали в питательной среде ДМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита), Россия), содержащей 0,5 мг/мл канамицина (Serva, Германия) и 10% ФБС (Gibco, США) при 37°C в 5% CO₂ в инкубаторе.

2.1.4 Используемые в работе сыворотки людей

В работе использовали шесть наборов человеческих сывороток, полученных из разных источников.

Первые три набора были получены от пациентов ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы». Первый и второй наборы сывороток были получены из ретроспективных исследований за последние 20 лет. Диагноз КЭ был подтвержден на основании клинических симптомов и серологического тестирования с помощью набора «Вектор-Бест ВКЭ IgG» или набора «Вектор-Бест ВКЭ IgM» (оба набора – Вектор-Бест, Новосибирск). Набор сывороток любезно предоставили д.м.н. Бутенко Александр Михайлович и д.м.н. Ларичев Виктор Филиппович из лаборатории биологии и индикации арбовирусов, отдела арбовирусов в ФГБУ «Национальный научный центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (Таблица 3).

Второй набор сывороток также был предоставлен д.м.н. Бутенко Александром Михайловичем и д.м.н. Ларичевым Виктором Филипповичем из лаборатории биологии и индикации арбовирусов, отдела арбовирусов в ФГБУ «Национальный научный центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, полученный при проведении ретроспективного анализа сывороток пациентов с диагнозом КЭ за последние 25 лет.

Третий набор сывороток был получен от пациентов, поступивших в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 2017 по 2023 год. Все пациенты дали добровольное информированное согласие на использование сывороток в диагностических целях. Диагноз КЭ был поставлен на основании клинической картины и серодиагностики. Характеристика первого и третьего наборов сывороток указана в Таблице 3.

Таблица 3 – Описание набора сывороток №1 и №3

Название	Диагноз	Пол	Возраст	Вероятное место заражения	День заболевания
ВКЭ (набор №1)					
ТВЕ1	КЭ	Ж	12	Красноярск	21
ТВЕ2		М	36	Уфа	180
ТВЕ3		Ж	44	Чита	>365
ТВЕ4		М	47	Республика Крым	>180
ТВЕ5		М	38	Челябинск	28
ТВЕ6		М	Неизвестно	Вологда	6
ТВЕvac *		Ж	26	Москва	-
ВКЭ (набор №3)					
ТВЕ7	КЭ	М	2,5	Неизвестно	Неизвестно
ТВЕ8		М	Неизвестно	Неизвестно	Неизвестно
ТВЕ9		М	Неизвестно	Неизвестно	Неизвестно
ТВЕ10		Ж	29	Алтайский край	7
ТВЕ11		М	Неизвестно	Неизвестно	Неизвестно
ТВЕ12		М	50	Челябинская область	47
ТВЕ13		М	42	Тверская область	5
ТВЕ14		М	19	Новосибирская область	9
ТВЕ15		М	36	Пермский край	26
ТВЕ16		М	Неизвестно	Неизвестно	Неизвестно
ТВЕ17		М	45	Пермский край	13
ТВЕ18		М	42	Неизвестно	11
ТВЕ19		М	42	Неизвестно	14
ТВЕ20		М	42	Неизвестно	15
ТВЕ21		М	Неизвестно	Республика Карелия	14
ТВЕ22		Ж	50	Костромская область	22
ТВЕ23		Ж	5	Республика Хакасия	Неизвестно
ТВЕ24		М	52	Неизвестно	27
ТВЕ25		М	42	Тверская область	14
ТВЕ26		М	19	Новосибирская область	16
ЯЭ (набор №1)					
JE **	ЯЭ	М	53	Королевство Таиланд	18
Лихорадка Зика (набор №1)					
Zika1	Вирус Зика	Ж	35	Королевство Таиланд	37
Zika2		М	Неизвестно	Доминиканская республика	14
ЛЗН (Набор №1)					
WN1	ВЗН	Ж	32	Москва	14
WN2		Ж	63	Волгоград	7
WN3		М	43	Индия	15
WN4		М	32	Индия	21
WN5		Ж	24	Волгоград	>180
WN6		М	Неизвестно	Астрахань	Неизвестно
Лихорадка денге (Набор №1)					
D1	ДЕНВ	Ж	56	Мальдивская Республика	7
D2		М	45	Шри-Ланка	6
D3		Ж	29	Мальдивская Республика	7
D4		М	28	Вьетнам	14
D5		Ж	40	Королевство Таиланд	9
D6		М	Неизвестно	Вьетнам	8

* Пациент был дважды привит вакциной Клещ-Э-Вак.

** Пациент был привит против ВКЭ 30 лет назад и неоднократно посещал эндемичные по КЭ районы.

Четвертый набор человеческих сывороток, содержащих антитела против различных ортофлавириусов, получен от д.м.н. Игнатъева Георгия Михайловича, ранее охарактеризованных в [236]. Сыворотки были получены в ходе двойного слепого клинического исследования. Все сыворотки были протестированы на наличие антител к вирусам Зика, Чикунгунья, ДЕНВ и ВЖЛ с помощью коммерческих наборов ИФА (Биоскрин-Чикунгунья (IgG) и Биоскрин-Денге (IgG), Биосервис, Россия), набора Anti-Zika Virus ELISA (IgG) (Euroimmun AG, Lübeck, Германия) и набора Qualitative Human Yellow Fever Virus Antibody IgG (YFV-IgG) ELISA Kit (MyBioSource Inc, США) (последний набор предназначен только для исследовательских целей).

Пятый набор сывороток от вакцинированных и невакцинированных от КЭ реципиентов до и после вакцинации от желтой лихорадки (ЖЛ) был ранее получен в ходе клинического сравнительного исследования вакцинации от ЖЛ (протокол ЛН-III-01/20). Людей иммунизировали вакциной SinSaVac (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). Ранее вакцинированные участники исследования получали вакцину EnceVir (Микроген, Москва, Россия). Наличие анти-ВКЭ антител в сыворотках вакцинированных людей подтверждали с помощью ИФА набора «Вектор-Бест ВКЭ IgG» (Вектор-Бест, Новосибирск). Набор любезно предоставил заведующий отделом вирусологии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) д.б.н. Игнатъев Георгий Михайлович.

Шестой набор сывороток был получен от условно здорового населения из Московской области, предоставлен Центром гигиены и эпидемиологии Московской области. Доноры подписали информированное согласие на использование сыворотки при донорстве. Они были положительны на анти-ВКЭ IgG антитела в ИФА «Вектор-Бест ВКЭ IgG» ("Вектор-Бест", Новосибирск, Россия). Набор любезно предоставил сотрудник лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) к.м.н. Холодилов Иван Сергеевич [235].

2.2 Методы

2.2.1 Выделение тотальной РНК

Тотальную вирусную РНК из КЖ или 10% мозговой суспензии выделяли при помощи реагента TRI Reagent LS (Sigma, США). К 125 мкл пробы добавляли 375 мкл TRI Reagent, перемешивали и инкубировали 4 мин при комнатной температуре, добавляли 100 мкл хлороформа (Ленреактив, Россия), перемешивали и снова инкубировали 15 мин. Фазы разделяли центрифугированием 15 мин при 12000 g, после чего водную фазу отбирали, добавляли равный объем изопропанола и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. РНК из

изопропанола осаждали центрифугированием 15 мин при 12000 g, промывали 1 мл 80% этанола и центрифугировали 7 мин при 12000 g. Надосадочную жидкость отбирали, а осадок РНК высушивали от следового количества этанола в термостате при 30°C и растворяли в 25 мкл воды (Milli-Q, Millipore, США).

2.2.2 Обратная транскрипция

Перед реакцией обратной транскрипции проводили измерение оптической плотности полученной РНК на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 260 нм. Одна оптическая единица соответствовала 40 мкг/мл РНК. Для проведения реакции к 1 мкг РНК добавляли 300 нг праймера Random-гексамер (R6) (Синтол, Россия) и доводили объем смеси до 12,5 мкл водой (Milli-Q, Millipore, США). Для отжига праймера смесь прогревали 5 мин при 70°C и помещали в лед. Затем добавляли 6 мкл раствора dNTP с концентрацией 10 mM (Евроген, Россия), 5 мкл 5-кратного буфера для обратной транскрипции (Promega, США) и 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV (Promega, США), доводили до общего объема 50 мкл водой Milli-Q. После этого пробу инкубировали 10 мин при комнатной температуре и затем при 42°C в течение часа. Обратную транскриптазу инактивировали нагреванием в течение 15 мин при 70°C.

2.2.3 Полимеразная цепная реакция

К 2 мкл кДНК после обратной транскрипции добавляли 5 мкл 2,5mM dNTP (Евроген, Россия), 5 мкл буфера (DreamTaq Buffer), по 1 мкл праймеров с концентрацией 10 пкмоль (Таблица 8) и доводили водой до объема 49,5 мкл. Смесь прогревали 5 мин при 95°C, охлаждали до 50°C и добавляли 0,5 мкл термостабильной DreamTaq-ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США). Реакционный цикл: 20 с при 95°C (денатурация), 30 с при 50°C (отжиг праймеров) и 60 с при 72°C (элонгация), выполняли 40 раз.

2.2.4 Аналитический и препаративный гель-электрофорез ДНК

Аналитический гель-электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле, приготовленном из 1,5 г агарозы (Sigma-Aldrich, США) и 98,5 мл 1xTBE (0,09 M Трис (Диа-М, Россия), 0,09 M борной кислоты (Компонент-Реактив, Россия), 2 mM ЭДТА (Sigma-Aldrich, США)). Смесь нагревали до расплавления агарозы, затем добавляли 8 мкл насыщенного раствора бромистого этидия («Компонент-реактив», Россия). Смесь в микропланшете застывала в течение 20-30 мин при комнатной температуре. Далее в лунки микропланшета добавляли по 1 мкл краски (6-кратный раствор ксилена цианола и бромфенолового синего в 30% сахарозе) (Евроген, Россия) и по 5 мкл ПЦР продукта. Полученную смесь перемешивали и добавляли в лунки геля. В отдельную лунку добавляли 3 мкл маркера молекулярной массы GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, США). Электрофорез проводили в буфере 1xTBE при 80-90 В (5,71-6,00 В/см) (Bio-

Rad, США). Результаты оценивали визуально в УФ трансиллюминаторе LMV transilluminator и фотографировали с помощью системы Infinity-Capt.

Препаративный электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле (Sigma-Aldrich, США) в буфере 1xTBE при тех же условиях, что и аналитический. Добавляли 10 мкл краски (6-кратный раствор ксилена цианола и бромфенолового синего в 30% сахарозе) (Евроген, Россия) в пробирки с ПЦР продуктом (50 мкл). Затем всё содержимое пробирок тщательно перемешивали и вносили в лунки геля. В отдельную лунку добавляли 10 мкл маркера молекулярной массы GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, США). После окончания электрофореза (80-90 В) участок геля, содержащий нужный фрагмент, вырезали стерильным скальпелем и затем выделяли из него ДНК. Скальпель прожигали каждый раз перед вырезанием фрагмента.

2.2.5 Выделение ДНК из агарозного геля после препаративного гель-электрофореза

Экстракцию ДНК проводили с помощью колонок QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. К фрагменту геля добавляли 600 мкл буфера Buffer QG и инкубировали при 50°C в термостате до растворения геля, перемешивая каждые 5 мин. Затем в пробирку добавляли 200 мкл изопропанола и перемешивали, после чего отбирали 700 мкл пробы и переносили в колонку, которую центрифугировали 1 мин при 12000 g, наносили на колонку оставшуюся часть пробы и центрифугировали ещё раз при тех же условиях. После этого вносили в колонку 500 мкл Buffer QG и центрифугировали 1 мин при 12000 g. Затем вносили 700 мкл Buffer PE и оставляли при комнатной температуре на 5 мин, после чего центрифугировали 1 мин при 12000 g. Добавляли еще 700 мкл Buffer PE и центрифугировали 2 раза по 1 мин при 12000 g. В центр колонки наносили 30 мкл воды и оставляли на 5 мин, после чего центрифугировали 1 мин при 12000 g. Концентрацию полученной кДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.6 Секвенирование и анализ последовательностей

Нуклеотидную последовательность полученной ДНК после очистки препаративным электрофорезом и выделения из геля определяли секвенированием по Сэнгеру. В реакцию секвенирования брали 20-30 нг ДНК в пересчете на необходимый фрагмент длиной 500-1000 пар нуклеотидов (пн), добавляли 3,2 пкмоль праймера. Секвенирование ПЦР продуктов проводили с соответствующими олигонуклеотидами (Таблица 4).

Таблица 4 – Праймеры для секвенирования сайта клонирования семейства плазмид pQE

Праймер	Последовательность
pQEseq-F	ATTTGCTTTGTGAGCGG
pQEseq-R	GAGCGTTCTGAACAAATCC

Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. Реакцию проводил ведущий научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) к.м.н. Холодилов И.С. Последовательности анализировали при помощи пакета программ SeqMan.

2.2.7 Филогенетический анализ штаммов

Последовательности геномов штаммов ВКЭ всех известных подтипов, а также штаммов ВЗН, ВОГЛ, ВПОВ и вируса Лангат были взяты из генбанка и использованы для филогенетического анализа. Были использованы геномы штаммов, взятых в работу, а также набор геномов штаммов ортофлавириусов для репрезентативности филогенетического дерева. Нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагмент гена белка Е (1097 нт, начиная с позиции 144), были выровнены с помощью метода ClustalW. Филогенетический анализ проводили с использованием метода максимального правдоподобия и модели Тамуры-Нея [237] в программе MEGA X с 1000 бутстреп-репликациями [235; 238].

2.2.8 Анализ последовательностей

Все хроматограммы, полученные на автоматическом секвенаторе, выверяли вручную с помощью программы SeqMan (пакет программ LaserGene DNASTAR v7.0). Поиск гомологий между полученными в данной работе нуклеотидными и аминокислотными последовательностями с соответствующими последовательностями фрагментов вирусных геномов проводили в базах данных NCBI при помощи программы BLAST.

2.2.9 Рестрикция

В работе были использованы рестриктазы HindIII, BglII, NcoI FD, SacI FD и BamHI FD (Thermo Fisher Scientific, США).

Реакцию проводили согласно инструкции производителя. К 0,5-1 мкг ДНК добавляли 2 мкл буфера, 10 ед. рестриктазы и доводили объем водой до 20 мкл. Инкубировали при 37 °С 180 минут. При использовании рестриктаз с меткой FD (Fast Digest – быстрая ферментация) проводили рестрикцию в течение 15 минут. Ферменты инактивировали термически (Таблица 5). Успешное проведение реакции подтверждали аналитическим гель-электрофорезом.

Таблица 5 – Характеристики ферментов рестрикции, используемых в работе

Рестриктаза	Название буфера	Время инкубации, мин	Температура инактивации, °С	Время инактивации, мин
HindIII	R	180	80	20
BglII	O	180	-	-
NcoI FD	FD	15	65	15
SacI FD	FD	15	65	5

2.2.10 Лигирование

Полученные ампликоны клонировали по сайтам рестрикции BglIII и NcoI для sE и dI+II, используя вектор pQE-60 (Qiagen, Германия), и по сайтам рестрикции HindIII и SacI для dIII, используя вектор pQE-30 (Qiagen, Германия). После обработки рестриктазами плазмиды наносили на 1,5%-ный агарозный гель и очищали на центрифужных колонках, следуя инструкции производителя (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК измеряли по оптической плотности или с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США).

Для реакции лигирования вектор и вставку брали в эквимольном соотношении. Реакцию проводили в буфере (60 мМ Трис-HCl [pH 7,6], 5 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ), 1 мМ аденозинтрифосфат (АТФ) (Sigma-Aldrich, США)), содержащем 100 ед./мл ДНК-лигазы фага T4 (Fermentas, США). Смесь инкубировали при 16 °С в течение 16 часов. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TOP10 по методике теплового шока.

2.2.11 Трансформация бактериальных клеток

К 100 мкл суспензии компетентных бактериальных клеток *E. coli* TOP10 добавляли водный раствор лигазной смеси и инкубировали при 4°С в течение 40 минут. Затем пробирку с клетками нагревали 2 минуты при 42°С (метод теплового шока), после чего добавляли 400 мкл питательной среды SOB (2% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМоль NaCl, 2,5 мМоль KCl) и инкубировали час при температуре 37°С.

Трансформированные клетки высевали на чашки Петри с 1% агаризованной питательной средой SOB, содержащей ампициллин (Serva, Германия) в концентрации 0,5 мг/мл, и инкубировали около 18 часов при 37 °С. Отдельные колонии, выросшие на чашках, переносили в 3 мл жидкой питательной среды SOB с 1 мкг/мл ампициллина. Культуру растили при 37 °С в ротационной качалке в течение 12-16 часов.

2.2.12 Выделение плазмидной ДНК малого и большого объема

Выделяли плазмидную ДНК из культивированных в 3 мл среды SOB (дрожжевой экстракт 5 г/л, Триптон 12 г/л, KCl 0,185 г/л, NaCl 0,585 г/л) клетках *E. coli* TOP10 с помощью набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкции производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США) или спектрофотометра (Bio-Rad, США).

Для выделения плазмиды из большого объема КЖ клетки переносили из 3 мл в 200 мл жидкой питательной среды SOB, содержащей 0,5 мг/мл ампициллина. Культуру инкубировали при 37 °С в ротационной качалке в течение 12-16 часов. Затем выделяли плазмидную ДНК с помощью набора реагентов Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Германия), согласно инструкции производителя. Наличие и чистоту полученной плазмидной ДНК проверяли аналитическим

электрофорезом. Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США) или спектрофотометра (Bio-Rad, США).

2.2.13 Индукция клеток *E. coli* для получения рекомбинантных белков

Полученными конструкциями, содержащими последовательности, кодирующие рекомбинантные белки, трансформировали клетки *E. coli* JM109 методом теплового шока. Использовали среды: LB, SOB и TB (Таблица 6). Отдельную колонию клеток инкубировали в течение 12–16 часов в 3 мл среды, содержащей 0,5 мг/мл ампициллина (Serva, Германия), с подавлением индукции в присутствии 20 мМ глюкозы (Serva, Германия). Далее переносили клеточную суспензию в 200 мл среды с ампициллином (0,5 мг/мл) и глюкозой (20 мМ) и растили клеточную массу до оптической плотности 0.6–0.8 при длине волны 600 нм (9.6×10^9 клеток/мл). Клетки осаждали центрифугированием при 1700 g, 4°C в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в 200 мл среды (SOB, LB или TB) без глюкозы с 0,5 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ; “Диа-М”, Россия) как индуктором экспрессии и инкубировали 18 часов при 37 °C в орбитальном шейкере. Полученный в результате центрифугирования (1700 g, 4°C, 30 мин) осадок промывали 50 мл ФБС (Sigma-Aldrich, США) и пересаждали в тех же условиях.

Таблица 6 – Состав использованных сред для работы с бактериальными клетками

Название среды	Состав	Концентрация, г/л
SOB	Дрожжевой экстракт	5
	Триптон	12
	KCl	0,185
	NaCl	0,585
LB	Дрожжевой экстракт	5
	Триптон	10
	NaCl	10
TB	Дрожжевой экстракт	24
	Глицерин 99%	20 (мл/л)

Из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК как описано ранее [194]. Наличие вставки проверяли методом ПЦР с праймерами, которые использовали для клонирования. Отсутствие замен подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

2.2.14 Ультразвуковая обработка бактериальных клеток

После индукции ресуспендировали клетки в 5 мл буфера А (50 мМ Трис-НСl pH 8,0; 0,2 М NaCl; 2% Тритон X-100; 1 мМ ЭДТА). Обработку клеток ультразвуком проводили в следующем режиме: 3 раза по 1 мин импульсом 7 мс на льду. После центрифугирования (7800 g, 4°C, 30 мин) осадок ресуспендировали в 3 мл буфера В (50 мМ Трис-НСl, pH 8,0; 0,2 М NaCl;

2 М мочевины (Ленреактив, Россия)) и центрифугировали при тех же условиях. Далее клетки обрабатывали ультразвуком 3 раза по 1 мин импульсом 7 мс на льду. Центрифугировали (7800 g, 4°C, 30 мин) и последовательно использовали 2 мл лизирующего буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,5 М NaCl) с нарастающей концентрацией мочевины (2М, 4М, 6М, 8М). Обрабатывали ультразвуком 3 раза по 1 мин импульсом 7 мс на льду для каждой концентрации мочевины. Далее в работе использовали супернатант.

2.2.15 Аффинная хроматография с использованием никелевого сорбента

Для очистки целевых рекомбинантных белков, полученных после ультразвуковой обработки с мочевиной, использовали аффинную хроматографию на 9-сантиметровых гравитационных колонках Poly-Prep® (Bio-Rad, США) с 1 мл Ni-NTA-агарозы (Qiagen). В колонку добавляли 1 мл сорбента и уравнивали буфером лизиса. На колонку наносили 3 мл супернатанта, содержащего рекомбинантный белок, затем колонку промывали 2 мл буфера С1 (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 0,5 М NaCl; 6 М мочевины; 10 мМ имидазола) и С2 (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 0,5 М NaCl; 6 М мочевины; 25 мМ имидазола). Элюировали целевой белок 10 мл буфера для элюции E_1 (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 0,25 М NaCl; 6 М мочевины; 0,15 М имидазола). После элюирования собирали 10 фракций по 1 мл. Наличие белков во фракциях проверяли путем нанесения 2 мкл из каждой фракции на нитроцеллюлозную бумагу (Bio-Rad, США) и, затем, окрашивая Понсо S (0,1 г Ponceau S (Sigma-Aldrich, США), 5 мл CH₃COOH (Компонент-Реактив, Россия), 95 мл H₂O). В дальнейшую работу брали 2 фракции (суммарно 2 мл) с наибольшим количеством белка.

2.2.16 Обессоливание и рефолдинг рекомбинантных белков

Рефолдинг рекомбинантных белков штамма Сухар проводили путем смены буфера E_1 (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,25 М NaCl, 6 М мочевины, 0,15 М имидазол) на 1хФБС (Sigma, США) с использованием Hi-Trap Desalting Column 5 ml (Cytiva, Швеция), согласно инструкции производителя. Объем раствора, содержащего очищенный белок, был равен первоначальному объему, который вносили на колонку.

В другом варианте рефолдинга доменов белка E штамма Сухар белок разводили по капельно в соотношении 1:20 с буфером рефолдинга (2 М мочевины, 4% глицерин). Добавляли постепенно CaCl₂ до конечной концентрации 2 мМ и глутатиона – до 0,5 мМ. Инкубировали смесь полчаса при +4°C и концентрировали с помощью центрифужного концентратора Amicon (Amicon, Merck, Германия), для рекомбинантных белков sE и dI+II использовали концентраторы с диаметром пор 30 кДа, для dIII – 10 кДа, концентрировали в 20 раз для доведения объема до первоначального.

Рефолдинг белка sE штамма Софьин проводили путем смены буфера E_1 на тот же объем ФБС с использованием центрифужных концентраторов Amicon 50 ml (Amicon, Merck, Германия) с диаметром пор 30 кДа согласно инструкции производителя.

Объемы растворов, содержащих очищенные белки, были одинаковы после всех вариантов рефолдинга.

2.2.17 Электрофорез в полиакриламидном геле и измерение концентрации белков

Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 12%-ном (или 15% -ном для dIII) полиакриламидном геле (ПААГ). Гель окрашивали красителем Кумасси (1 г Кумасси R-250 (Sigma, США); 300 мл этанол (Константа-Фарм М, Россия); 650 мл дистиллированной воды; 50 мл уксусной кислоты (Ленреактив, Россия)) 30 минут, затем отмывали в течение 12 часов буфером (H₂O дист., содержащая 10% этанола и 10% CH₃COOH (Компонент-Реактив, Россия)). Для определения концентрации целевых белков использовали калибровочный график, построенный по известным концентрациям бычьего сывороточного альбумина (БСА) (стандарт 2 мг/мл (Thermo Fisher Scientific, США)). Расчёт производили при помощи пакета программ Genesys tool from Syngene. Для денситометрии полос в ПААГ измеряли полосы с целевым продуктом при помощи пакета программ Genesys tool from Syngene. Определяли площадь пика полосы исследуемого белка.

Общий белок в пробах для контроля измеряли при помощи метода Лоури по стандартному протоколу [239].

2.2.18 Вестерн-блот

Полученные рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в 12%-ном ПААГ как описано ранее и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) с использованием системы мокрого блоттинга Criterion Blotter (Bio-Rad, США). Мембрану инкубировали с 5%-ным обезжиренным коровьим молоком (Best Value, США) в трис-боратном буфере (ТБС: 25 мМ Tris, 0.15 М NaCl, pH 7,5) в течение 1 часа, затем 1 час с исследуемой сывороткой. Мембрану промывали ТБС с 0,05% Tween-20 (ТБС-Т) и инкубировали с мечеными пероксидазой хрена (HRP) антителами против IgG мыши (кат. №. ab6789), кролика (кат. №. ab6721) или человека (кат. №. ab6759) (Abcam, Великобритания), в зависимости от исследуемой сыворотки, в течение 1 часа. Затем мембрану промывали ТБС с 0,05% Tween-20 (ТБС-Т). Проявляли мембрану с использованием набора ECL (Bio-Rad, США) в гельдокументирующей системе Genesys (Genesys, США).

2.2.19 Получение сывороток и иммуноасцитных жидкостей мышей

В работе использовали инбредных мышей BALB/c и аутбредных мышей ICR (Государственное учреждение «Научный центр биотехнологии», филиал «Столбовая», поселок

Столбовая, Московская область, Россия). Содержание животных осуществлялось в соответствии с международными рекомендациями по обращению с лабораторными животными (рекомендации CIOMS, 1985, Директива 2010/63/EU и Приложение А к Европейской конвенции ETS № 123). Все экспериментальные процедуры с использованием животных были одобрены комитетом по биоэтике ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П.Чумакова» РАН (Институт полиомиелита) (протокол № 17 от 1 сентября 2016 г. и протокол № 29012018 от 29 января 2018 г.).

Для размножения вируса брали 3-4 дневных мышей сосунков и заражали интрацеребрально по 20 мкл 10% мозговой суспензией вируса. Забор мозга проводили при первых проявлениях клинических симптомов заболевания (примерно на 3-8 сутки).

Аутбредным мышам (ICR) массой 20-22 г вводили 0,5 мл смеси вируса и полного адьюванта Фрейнда (1:1) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) под кожу в область холки (три раза с 7-дневным интервалом между инъекциями) для получения гипериммунной сыворотки. Затем, через 7 дней, вирус без адьюванта вводили внутривентрикулярно. Через день вводили клетки саркомы TG-180. Ещё через 10-14 дней мышей умерщвляли путем декапитации. Кровь и иммуноасцитные жидкости (ИАЖ) собирали и центрифугировали при 1500 об./мин в центрифуге R6 (Biosan). Надосадочную жидкость хранили в виде аликвот при -20 °С.

Сыворотки мышей после экспериментальной инфекции были собраны в пул от трех мышей через семь дней после подкожного инфицирования разными штаммами ВКЭ. Образцы крови мышей получали путем декапитации, сыворотку отделяли центрифугированием как было описано ранее и хранили в виде аликвот при -20 °С.

Гипериммунные сыворотки кроликов, содержащие антитела к различным штаммам ВКЭ, были получены ранее и предоставлены для работы сотрудниками лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Обезьян распределяли на группы по 2-3 особи. Одной группе вводили вакцину КЭ двукратно с интервалом в 14 дней, после чего обезьяны были заражены ВПОВ штамм Row-24 через 14 дней после второй дозы вакцины. Вторую группу заражали ВКЭ штамм ЭК-328. Третью группу заражали ВПОВ штамм Row-24. Четвертой группе вводили физ. раствор и использовали в качестве отрицательного контроля. Забор крови проводили за день до заражения, а также на 2, 4, 7 и 10-14 день после введения вирусов. Все сыворотки обезьян были получены совместно с сотрудниками лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Роговой Анастасией Андреевной и Илларионовой Викторией Владимировной.

2.2.20 Реакция нейтрализации 50% бляшек в культуре клеток

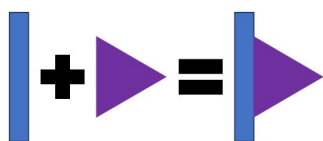
Содержание нейтрализующих антител (НАТ) в образцах сывороток определяли с использованием 24-луночных планшетов с монослоем клеток СПЭВ. Делали серийные разведения исследуемой сыворотки с шагом 1:4 со средой 199 в растворе Эрла (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) с 2% фетальной бычьей сывороткой (ФБС (Gibco, США)) и вносили в них равный объем вируса с концентрацией 20–30 БОЕ/лунку. Инкубировали полученную смесь 1 час при 37 °С, затем вносили в планшет с клетками и инкубировали 1 час в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Последующие этапы проводили по методике, описанной для титрования вируса *in vitro* [240]. Титр НАТ рассчитывали по модифицированной формуле Рида–Менча и представляли в виде lg(НАТ) [241].

2.2.21 Иммуноферментный анализ

Рекомбинантные белки сорбировали в лунках (12 нг на лунку) в ФСБ (Sigma, США) при 4°С в течение 16 часов. В качестве внутреннего отрицательного контроля (отрицательного антигена) использовали К- (очищенную суспензию клеток *E. coli*, трансфицированных плазмидой pQE-32 (без вставки) после ИПТГ-индукции, солюбилизации, аффинной хроматографии и обессоливания), который также сорбировали на лунки микропланшета в концентрации (12 нг на лунку). Неспецифические сайты связывания блокировали в течение 1 часа при 37°С 4%-ным обезжиренным молоком в ФСБ-Т (фосфатно-буферный солевой раствор (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) с 0,05% Tween 20 (Sigma, США)). Исследуемые разведенные сыворотки в ФСБ-Т с 4% обезжиренным коровьим молоком (Best Value, США) добавляли в планшеты на 1 час при 37°С. После промывки планшеты инкубировали со вторичными антителами против IgG мыши (кат. №ab6789, Abcam, США), кролика (кат. №ab6721, Abcam, США), обезьяны (кат. №A2054, Sigma, США), человека (кат. №ab6759, Abcam, США), или IgM мыши (кат. №ab97230, Abcam, США), конъюгированные с HRP в зависимости от исследуемого образца, в течение 1 часа при 37°С.

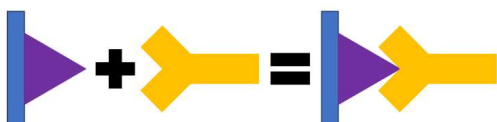
Раствор субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (ТМБ (Sigma, США)) добавляли в каждую лунку и инкубировали 20 минут при комнатной температуре в темноте. Затем реакцию останавливали 2М раствором H₂SO₄ (Ленреактив, Россия). Результаты определяли путем измерения оптической плотности при 450 нм (Multiscan, Thermo Fisher Scientific, США) [235]. Краткое проведение анализа представлено на Рисунке 13.

Сорбирование антигена



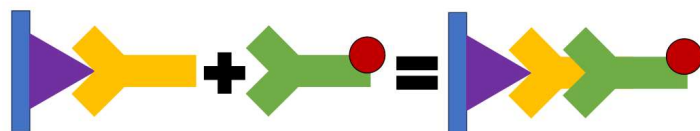
12 нг/лунку рекомбинантного белка (sE, dI+II или dIII) в ФСБ сорбировали 16 часов при +4°C в 96-луночном планшете, затем готовый планшет промывали три раза ФСБ

Внесение образца



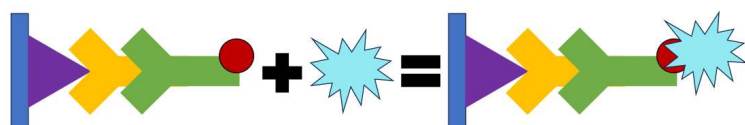
Исследуемую сыворотку развели 1:50 в 4% молоке в ФСБ-Т и вносили в планшет, инкубировали 1 час при 37°C, затем планшет промывали три раза ФСБ-Т

Внесение конъюгата



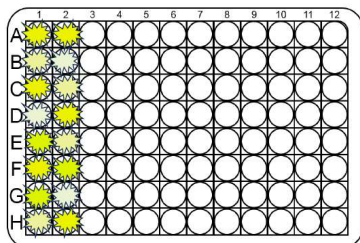
Меченый HRP конъюгат, соответствующий исследуемой сыворотке, вносили в планшет, инкубировали 1 час при 37°C, затем планшет промывали три раза ФСБ-Т

Добавление субстрата



Субстрат ТМБ вносили в планшет, планшет убирали в темное место на 20 минут, затем вносили серную кислоту для остановки реакции

Получение результата



Планшеты помещали в спектрофотометр и измеряли оптическую плотность каждого образца при длине волны равной 450 нм

Рисунок 13 – Схема диагностической методики ИФА, использованной в работе

Для построения калибровочной кривой использовали титрованную положительную сыворотку в 6 разведениях, начиная с 1:50 с кратностью 4. При помощи уравнения линейной зависимости рассчитывали титры исследуемых сывороток.

Коммерческие наборы для выявления антител к ВКЭ «Anti-TBE ELISA (IgG)» (кат. №EI2661-9601G) Euroimmune (Германия) и «Векто-ВКЭ-IgG» (кат. №D-1156) Вектор-Бест (Россия) использовали в соответствии с инструкцией производителя.

Глава 3. Результаты и обсуждение

В отличие от традиционного производства антигенов на основе цельных патогенов, требующего сложных и дорогостоящих условий, производство рекомбинантных белков является более дешевым и простым и легко масштабируется [242; 243]. Безопасность ИФА-наборов на основе рекомбинантных белков позволяет использовать их в широком спектре условий, включая экстренные ситуации при вспышках инфекций, когда необходима быстрая диагностика. Высокая производительность и оперативность получения результатов делают эти тесты полезными для эпидемиологического надзора, мониторинга заболеваемости и оценки эффективности противоэпидемических мер общественного здравоохранения.

Сочетаемые очаги ортофлавивирусных инфекций на территории России и расширяющиеся туристические потоки в регионы, эндемичные по другим ортофлавивирусам, поднимают вопрос о необходимости повышения эффективности дифференциальной диагностики заболеваний, вызванных этими вирусами. Дифференциальная серодиагностика необходима, во-первых, для лабораторного подтверждения диагноза и выбора оптимальной схемы лечения. Во-вторых, она используется для мониторинга эпидемиологической ситуации; её результаты служат основой для разработки стратегии и тактики профилактических мероприятий, особенно на территориях со смешанными очагами. Кроме того, дифференциальная серодиагностика имеет значение для научных исследований, направленных на изучение механизмов формирования иммунного ответа и АТЗУИ [194].

Серологические методы, включая ИФА, играют важную роль в исследовании и диагностике заболеваний, вызванных ортофлавивирусами, в том числе и ВКЭ [174]. ИФА используется как в клинической диагностике, так и для массового скрининга в эндемичных регионах [5; 26; 244]. Как было сказано ранее, большинство тестов ИФА для выявления антител к ВКЭ основано на использовании в качестве антигена цельных вирионов [21; 28], однако такие тесты часто имеют низкую специфичность [245], что снижает их эффективность. В связи с этим всё большее внимание уделяется использованию рекомбинантных белков в качестве антигенов. Такие подходы лежат в основе современных ИФА тест-систем для выявления антител к различным ортофлавивирусам [246; 247].

Гликопротеин Е ортофлавивирусов является основным белком оболочки, который содержит антигенные сайты для антител, вырабатываемых в процессе инфекции. Консервативность белка Е среди ортофлавивирусов является причиной кросс-реактивности и ложноположительных результатов в применяемых серологических диагностических системах. Считается, что повышение специфичности ИФА тест-систем возможно при использовании не полноразмерного белка Е, а отдельных его участков: доменов I, II и III.

Для получения рекомбинантных доменов белка E (sE, dI+II и dIII) был выбран штамм Сухар, который принадлежит к Сибирскому подтипу Балтийской группы. Ранее не изученный штамм Сухар был выделен из мозга пациента, умершего от КЭ в 2016 году в Ярославской области. Он представляет интерес как новый штамм, полученный из клинического материала от человека, а также выбор штамма был обусловлен широким распространением Сибирского подтипа на территории РФ. Помимо этого, был получен рекомбинантный белок sE вакцинного штамма Софьин, принадлежащего к Дальневосточному подтипу ВКЭ.

3.1 Особенности структуры рекомбинантных белков sE и dI+II штамма Сухар

Рекомбинантные белки dI+II и sE штамма Сухар получали без одного цистеина на N-конце. Вторичную структуру белка sE штамма Сухар предсказывали при помощи программы AlphaFold 2 (версия v2.3.2 от DeepMind совместно с ColabFold) в онлайн сервисе (app.tamarind.bio). Для оценки разницы вторичной структуры белков E ВКЭ штамма Сухар с цистеином на N-конце (Рисунок 14 (А) и 14 (А1)) и без него (Рисунок 14 (Б) и 14 (Б1)) проводили визуальное сравнение аминокислотных последовательностей части белка.

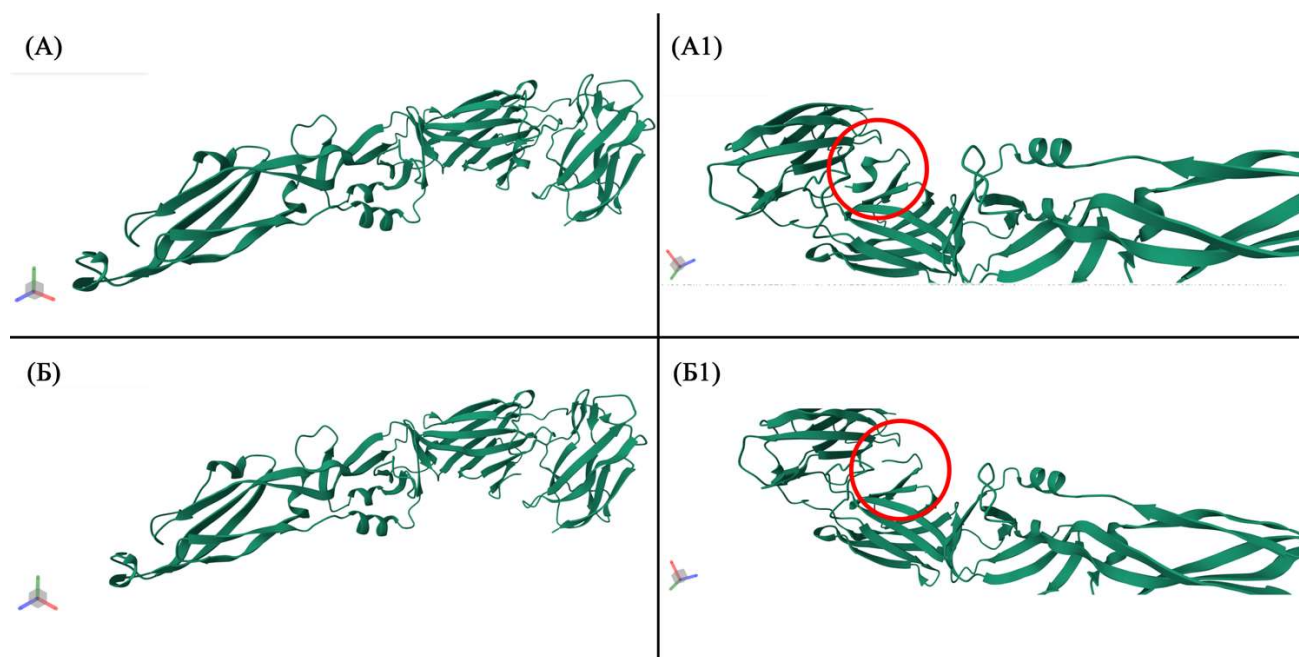


Рисунок 14 – Вторичная структура белка sE штамма Сухар предсказанная с помощью программы AlphaFold 2 в онлайн сервисе (app.tamarind.bio). Вторичная структура белка с наличием цистеина (А), увеличенный участок (А1), представляющий наличие цистеина (отмечено красным): score – 0,85 (pLDDT – 96.15). Вторичная структура с отсутствием цистеина (Б), увеличенный участок (Б1), представляющий отсутствие цистеина (отмечено красным): score – 0,85 (pLDDT – 95.88)

Аналогично предсказывали вторичную структуру рекомбинантного белка dI+II, с цистеином на N-конце (Рисунок 15 (Б)) и без него (Рисунок 15 (А)).

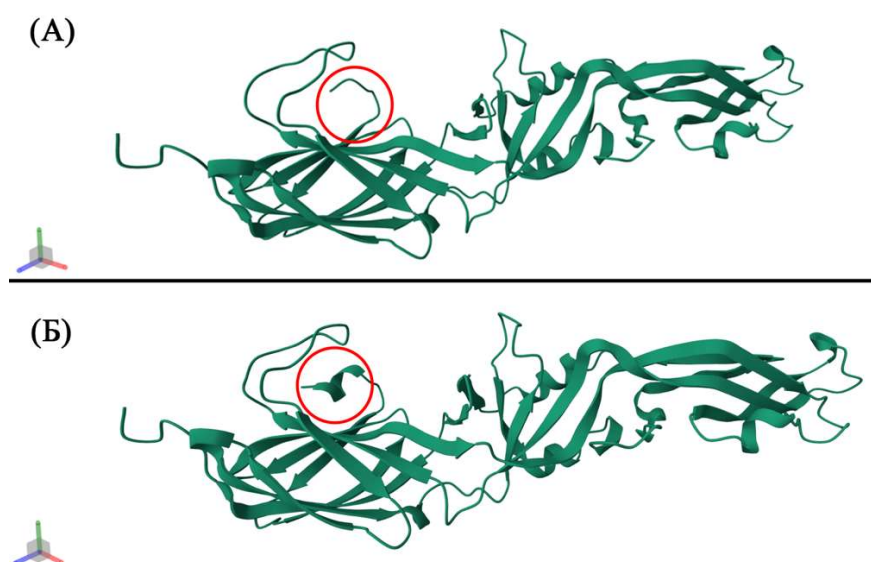


Рисунок 15 – Вторичная структура белка dI+II штамма Сухар предсказанная с помощью программы AlphaFold 2 в онлайн сервисе (app.tamarind.bio). Для вторичной структуры с цистеином (отмечено красным) (Б) score – 0,84 (pLDDT – 95.64), для структуры в отсутствии цистеина (отмечено красным) (А) score – 0,84 (pLDDT – 95.50)

Сравнение структур показало, что удаление остатка цистеина на N-конце рекомбинантных белков sE и dI+II приводит к исчезновению N-концевой альфа-спирали, что, предположительно, делает данный участок белка более открытым.

3.2 Получение целевых участков генов и конструкций, кодирующих рекомбинантные белки

На основании последовательности белка E штамма Сухар ВКЭ были подобраны праймеры для амплификации участков, кодирующих домен III (dIII), домены I+II (dI+II) и эктодомен (sE) белка E ВКЭ (Таблица 7) [194]. Как было отмечено ранее, в конструкциях, кодирующих белки sE и dI+II, отсутствовал N-концевой цистеин [248].

Последовательность, кодирующая домен dI+II изображена на Рисунке 16 (А). Считается, что в нём содержится большинство перекрёстно-реактивных эпитопов [73], однако в нём находятся и видоспецифичные эпитопы [249].

ACACATCTGGAGAACAGGGACTTTGTCACTGGCACTCAGGGAACAACGAGAGTGAC
 TTTGGTTTTGGAATTGGGTGGATGTGTACGATCACTGCTGAGGGGAAGCCCTCAAT
 GGATGTGTGGCTTGATTCCATCTATCAAGAGAACCCGGCCAAAACACGCGAGTACT
 GCCTGCATGCTAAGCTATCGGACACCAAGGTTGCGGCCAGATGCCCAACAATGGGG
 CCTGCCACTCTAGCTGAAGAGCATCAGAGTGGCACGGTGTGCAAGAGAGACCAGAG
 CGACCGAGGCTGGGGCAATCACTGCGGGCTGTTTGAAAAGGCAGCATTGTGACCT
 GCGTCAAGGCTGCTTGCAGAGCAAAGAAGAAGGCCACTGGACATGTGTATGACGCC
 AACAAAATTGTGTACACAGTCAAGGTTGAGCCACACACGGGGGACTATGTTGCCGC
 CAATGAAACCCACAGTGGGAAGGAAGACGGCATCCTTCACGGTCTCCTCAGAAAAGA
 CCATTTTGAACATGGGGGACTACGGAGATGTGTCTTGTGTGCAGAGTCGCCAGTG
 GCGTTGACTTAGCTCAGACTGTCACTTCTTGAGCTTGACAAGACTCTGGAACACCTC
 CGACGGCCTGGCAGGTCCATCGTGACTGGTTCAATGATCTGGCCCTGCCGTGGAAGC
 ACGAAGGAGCGCAACACTGGAACAATGCTGAGCGACTGGTTGAATTTGGAGCTCCG
 CATGCCGTGAAAATGGACGTGTACAACCTTGAGATCAAACCTGGAGTGTTGCTGAA
 GTCACTCGCGGGGGTTCCTGTGGCGCACATTGATGGAACAAAGTACCACCTAAAAA
 GCGGTCATGTGACATGCGAGGTTGGACTGGAGAAGCTCAAGATGAAAGGTCTCACA
 TAC

Рисунок 16 (А) – Нуклеотидная последовательность, кодирующая домен I+II белка E штамма Сухар ВКЭ (GenBank: OP185392)

DIII был выбран на основании предыдущих работ, где данный антиген успешно применяли для специфической серологической диагностики различных ортофлавириусных инфекций (Рисунок 16 (Б)) [250–253].

ACAATGTGTGACAAAACGAAGTTCACATGGAAGCGGACTCCAACAGATAGTGGACA
 TGACACAGTGGTGATGGAGGTCACGTTCTCTGGAACAAAACCTTGCAGGATCCAG
 TGCGGGCAGTGGCACACGGCTCTCCAGACGTGAATGTTGCCATGCTGATAACACCA
 AACCCACCATTTGAGAACAACGGAGGTGGCTTCATAGAAATGCAGCTACCCCCAGG
 AGATAACATCATTTATGTTGGGGAACATAAGCCATCAGTGGTTCCAAAAGCTAAGCC
 ATCAGTGGCAAAAG

Рисунок 16 (Б) – Нуклеотидная последовательность, кодирующая домен III белка E штамма Сухар ВКЭ (GenBank: OP185392)

Был также клонирован растворимый участок белка E – sE штаммов Сухар без концевой цистеина и sE белок штамма Софьин без дополнительных модификаций (Рисунок 16 (В)).

TCACGGTGCACACATCTGGAAAACAGGGATTTTGTACTGGCACTCAGGGGACCACTCGTGTGACTCTGG
 TGCTGGAACCTGGGAGGATGCGTCACCATAACAGCTGAGGGGAAGCCCTCGATGGATGTGTGGCTTGACTC
 CATCTACCAGGAGAACCCTGCCAAAACACGTGAGTACTGCCTTCACGCAAAGCTATCAGATACCAAAGTC
 GCGGCCAGATGCCCAACAATGGGACCTGCCACTTTGGCTGAAGAGCACCAGAGCGGCACAGTGTGTAAGA
 GAGACCAGAGTGATCGAGGCTGGGGTAATCATTTGTGGATTATTCGGAAAAGGCAGCATCGTGACCTGTGT
 CAAGGCGTCTTGTGAGGCAAAAAAGAAAAGCTACAGGACACGTGTATGATGCTAACAAAAATTGTGTACAC
 AGTCAAAGTAGAACCGCATACGGGGGATTACGTCGCTGCTAATGAGACTCACAGTGGAAAGAAAAACAGCG
 TCSTTCACGGTTTTCCTCGGAGAAGACCATCTTGACCATGGGAGACTACGGAGACGTGTCTTGTATTGCA
 GAGTAGCCAGCGGTGTTGACSTTGCTCAGACCGTCACTCTGGAGCTTGACAAGACCTCAGAACACCTACC
 GACGGCCTGGCAGGTCCACCGGGACTGGTTCAATGATCTGGCCCTACSTTGGAACATGAAGGAGCACAG
 AACTGGAACAATGCGGAACGGCTGGTTGAGTTTGGAGCTCCACACGCTGTGAAAATGGACGTGTACAACC
 TTGGAGACCATACTGGAGTGTGCTTAAATCACTTGCTGGTGTTCCTGTGGCGCACATTTGATGGAACCAA
 GTACCACSTGAAAAGTGGCCACGTGACATGCGAGGTAGGGCTAGAAAAAATTAAAGATGAAAGGTCTTACA
 TACACAATGTGCGACAAGACGAAATTCACGTGAAAAAGAATTCCAACAGACAGTGGACATGACACAGTG
 GTCATGGAAGTTCGCTTCTCTGGGACCAAACCTGTAGGATCCCGGTGAGGGCCGTGGCACACGGCTCTC
 CAGATGTGAATGTGGCTATGTTGATAACACCCCAACCCCATAAATCGAAAACAATGGTGGTGGCTTCATAGA
 AATGCAGTTACCTCCAGGAGATAATATCATCTATGTTGGGGAACAGTGCACCAATGGTTCCAAAA

Рисунок 16 (В) – Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок sE штамма Софьин ВКЭ

Ожидаемая молекулярная масса белков составляла: sE – 44 кДа, dI+II – 33 кДа и dIII – 11 кДа [248]. Олигонуклеотиды для клонирования участков генома, кодирующих sE, dI+II, dIII указаны в Таблице 7.

Таблица 7 – Праймеры для амплификации доменов sE, dI+II и dIII белка E штамма Сухар ВКЭ

Штамм	Праймер	Последовательность	Участок в геноме
Сухар	Прямой для sE и dI+II	GAGCTACCATGGTCACACATCTGGAGAACAGG	1-19
	Прямой для dIII	GAGCTAGAGCTCACAATGTGTGACAAAACGAAG	904-925
	Обратный для dI+II	TAGCTCAGATCTGTATGTGAGACSTTTCATCT	885-905
	Обратный для sE и dIII	TAGCTCAGATCTTTTTGGAACCACTGATGGC	1158-1117
Софьин	Прямой для sE	GAGCTACCCGGGGAAAACCTGTATTTTCAG* GGCTCACGGTGCACACATCTGG	1-19
	Обратный для sE	TAGCTCAAGCTTTTTTTGGAACCATTTGGTGAC	1185-1165

В качестве векторов для работы были выбраны плазмиды группы pQE (pQE-30, pQE-32 и pQE-60), компетентные для экспрессии белков в бактериальной системе *E. coli*, благодаря наличию лактозного оперона (lacO). Лактозный оперон позволяет контролировать экспрессию встраиваемого гена, что особенно актуально на стадии работы с чистым вектором или наработки готовой конструкции. Гены, кодирующие целевые белки, были фланкированы последовательностью, кодирующей гистидиновый тег (6×His), содержащийся в векторе, что позволяет в дальнейшем использовать метод аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе для

выделения рекомбинантного белка из бактериального лизата [194]. Схема клонирования представлена на Рисунке 17.

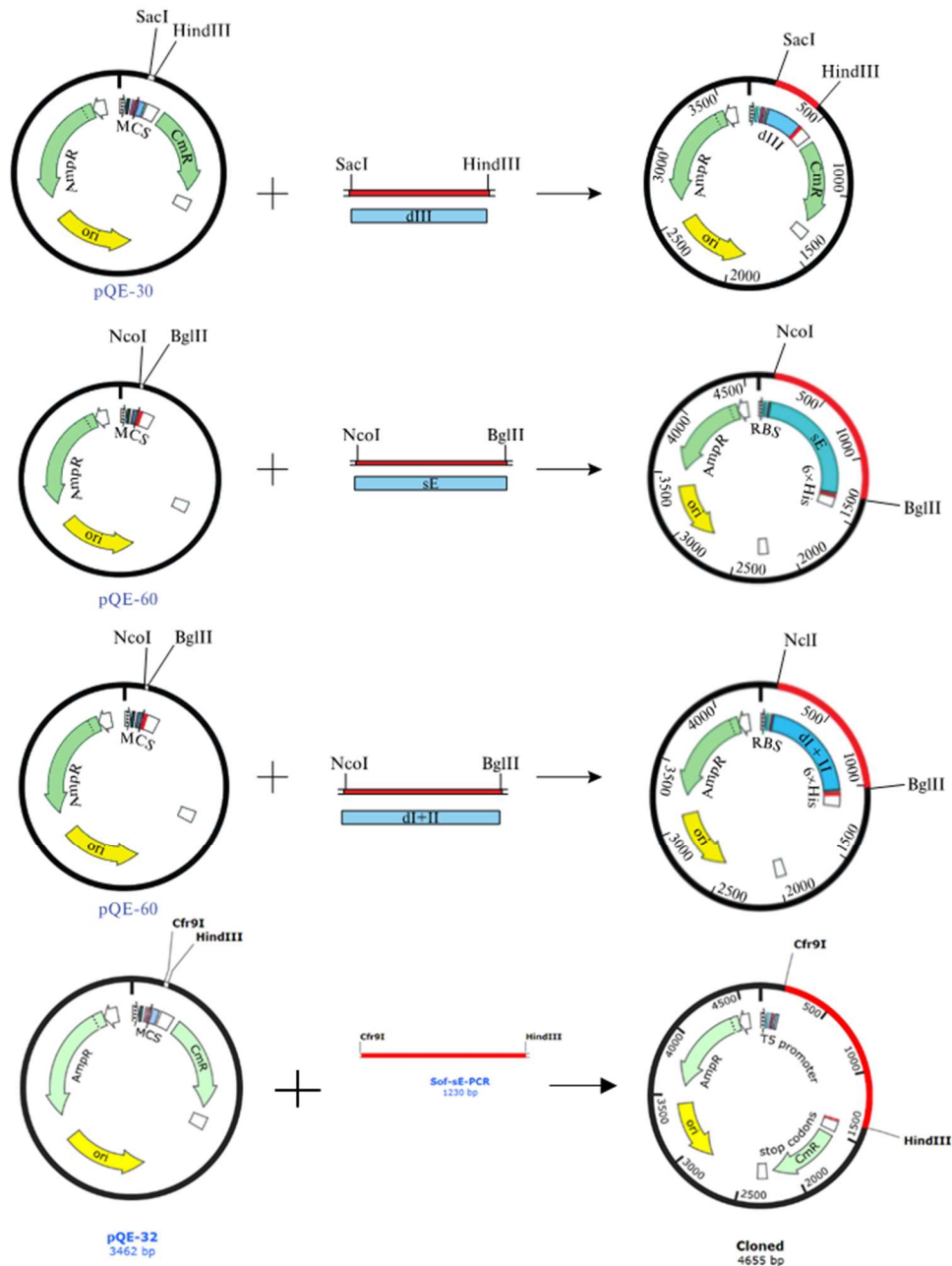


Рисунок 17 – Схема получения векторных конструкций

После выделения РНК и обратной транскрипции при помощи ПЦР со специфичных праймеров были получены ампликоны целевых участков гена белка Е ВКЭ. Полученные ампликоны клонировали по сайтам рестрикции BglII и NcoI для sE и dI+II, используя вектор pQE-60, и по сайтам рестрикции HindIII и SacI для dIII, используя вектор pQE-30 (Рисунок 17). Фрагменты ДНК после рестрикции очищали путем препаративного электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле (Рисунок 18) [194].

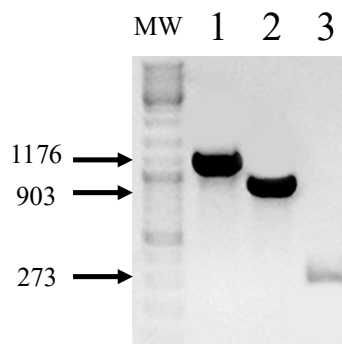


Рисунок 18 – Электрофореграмма или аналитический электрофорез ампликонов целевых участков гена белка E для клонирования в бактериальную систему: sE (1) – 1176 п.н., dI+II (2) – 903 п.н., dIII (3) – 273 п.н.

Лигирование проводили, смешивая вектор и вставку в эквимолярном соотношении 1:3 и 1:9 соответственно, в течение 16 часов при 14°C. Клетки *E. coli* TOP10 трансформировали лигазной смесью методом теплового шока. Плазмидную ДНК, выделенную из полученных клонов, проверяли на наличие вставки методом ПЦР, используя праймеры для клонирования (Таблица 7). Гель-электрофорез с полученными клонами со вставкой, кодирующей целевой белок sE штамма Сухар, представлен на Рисунке 19 (А). Полученные конструкции для экспрессии рекомбинантных белков в бактериальной системе проверили на отсутствие замен методом секвенирования по Сэнгеру [194]. Использовали универсальные праймеры для семейства плазмид pQE, отжигающиеся по обе стороны от сайта клонирования (Таблица 4).

Для получения конструкции, содержащей целевой ген рекомбинантного белка sE штамма Софьин, использовали плазмиду pQE-32. Целевой ген получали при помощи обратной транскрипции с РНК ВКЭ штамма Софьин и ПЦР праймеров (Таблица 7). Продукты ПЦР и плазмиду обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Sma*I и *Hind*III. В реакцию лигирования брали 50 нг вставки и вектора 3:1 и 9:1 по молярному соотношению. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TOP10, отбор клонов осуществляли по наличию вставки после ПЦР в агарозном гель-электрофорезе (Рисунок 19 (Б)) с последующим секвенированием по Сэнгеру.

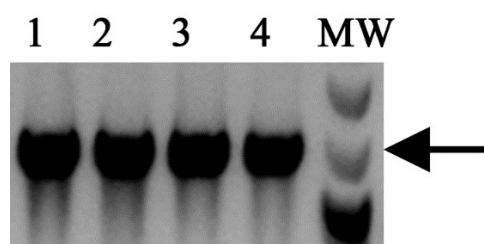


Рисунок 19 (А) – Гель-электрофорез с полученными клонами со вставкой, кодирующей белок sE шт. Сухар (указан стрелкой) после лигирования (клоны 1-4)

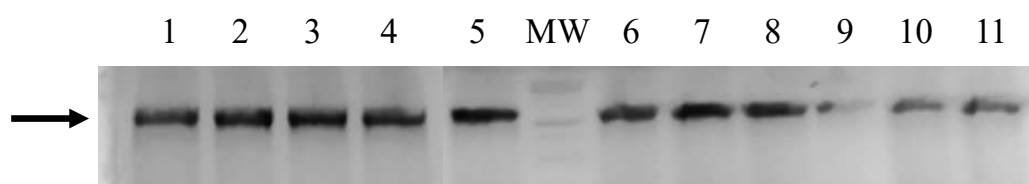


Рисунок 19 (Б) – Гель-электрофорез с полученными конструкциями с sE штамма Софьин (указан стрелкой) после лигирования в соотношении вектора и вставки 1:3 (клоны 1-5) и 1:9 (клоны 6-11)

Для рекомбинантного белка sE штамма Сухар был выбран клон номер 4, что соответствует дорожке №4 гель-электрофореза (Рисунок 19 (А)). В работу отобрали клон номер три, соответствующий дорожке №3 гель-электрофореза (Рисунок 19 (Б)) для получения рекомбинантного белка sE штамма Софьин. Аналогичным образом были отобраны клоны, содержащие вставку, кодирующую рекомбинантные белки dI+II и dIII штамма Сухар.

3.3 Оптимизация условий получения рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII штамма Сухар и sE штамма Софьин

3.3.1 Подбор среды для экспрессии целевых белков

Для оптимизации роста бактериальных клеток и получения белка в бактериальных системах экспрессии необходимо было подобрать оптимальную среду.

Каждая среда обладает уникальным набором питательных веществ, который влияет на скорость роста бактерий, выход белка и его экспрессию. Для культивирования бактерий не редко используют среды LB (Luria–Bertani), SOB (Super Optimal Broth) и TB (Terrific Broth). Среда SOB отличается повышенной питательностью за счёт содержания триптона, дрожжевого экстракта и ионов магния, что способствует интенсивному росту клеток и повышает эффективность трансформации плазмид [254]. Среда SOB обычно применяется на начальных этапах получения рекомбинантных белков — для работы с компетентными клетками и размножения плазмид. LB остаётся одной из самых распространённых сред благодаря простому составу и универсальности. Однако, из-за низкой питательности среда LB может обеспечивать меньший выход белка, чем SOB или TB. Несмотря на сравнительно невысокую питательность, среда LB остаётся

востребованной благодаря простому составу и удобству использования в большинстве стандартных экспериментов [255]. Среда ТВ содержит триптон, дрожжевой экстракт и глицерин, обладает высокой буферной ёмкостью и обеспечивает интенсивный рост клеток, что позволяет получать более высокий выход рекомбинантного белка [256]. Для отдельных задач также применяют среды 2xYT и M9 Minimal Medium [257]. Выбор питательной среды зависит от типа белка, особенностей системы экспрессии и требуемого объёма целевого продукта. LB чаще используют для клонирования и первичных экспериментов, тогда как ТВ и SOB подходят для получения большей биомассы и повышения выхода рекомбинантного белка в системах на основе *E. coli*. При этом эффективность экспрессии определяется не только составом среды, но и условиями индукции и культивирования.

Эксперимент по подбору оптимальной среды проводили для рекомбинантного белка sE штамма Сухар ВКЭ. Бактериальные клетки растили в малом объеме, затем наращивали на большем объеме до коэффициента оптической плотности 0,6 при длине волны 600 нм. Экспрессию белка индуцировали ИПТГ после чего осаждали клетки центрифугированием. Полученную клеточную массу обрабатывали первые два раза ультразвуком с буфером без содержания мочевины и третий раз с буфером, содержащим 8М мочевины. После каждой обработки образцов ультразвуком центрифугировали и в полученном супернатанте оценивали продукцию целевых белков денситометрированием полос, после электрофореза в 12%-ном ПААГ (Рисунок 20) [194].

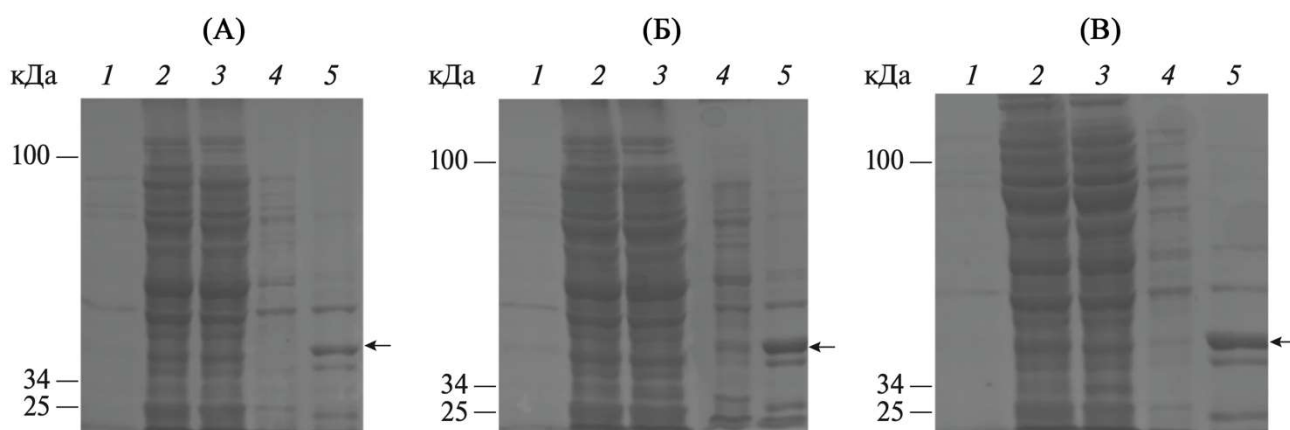


Рисунок 20 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ продукции рекомбинантного белка sE (44 кДа) штамм Сухар ВКЭ (указан стрелками) в клетках *E. coli*. Для экспрессии белка в клетках *E. coli* использована питательная среда LB (А), SOB (Б) или ТВ (В). Суспензия клеток до индукции (1), лизированные клетки (2), супернатант после первой (3), второй (4) и третьей (5) солубилизации телец включения в 8 М мочевины. Гели окрашены Кумасси R-250. Стрелками указан целевой белок. Денситометрия целевого белка sE: 50759 (А), 70116 (Б), 106561 (В)

Наличие целевого белка было подтверждено вестерн-блотом. При денситометрировании полос в 12% ПААГ, соответствующих целевому белку sE штамма Сухар ВКЭ, интегральный

показатель составлял 50759 при использовании среды LB, 70116 при использовании среды SOB, 106561 при использовании среды TB.

На основании перечисленных данных для целевого рекомбинантного белка sE штамма Сухар ВКЭ (44 кДа) была выбрана среда TB для культивирования клеток-продуцентов *E. coli* JM 109. Для рекомбинантных белков dI+II и dIII также использовали среду TB.

3.3.2 Подбор условий индукции синтеза белка

Для большинства экспрессионных векторов, используемых для продукции белков в системах *E. coli*, содержащих lac-промотор, в качестве индуктора экспрессии используют ИПТГ. Он, имитируя лактозу, связывается с рецептором, что инактивирует lac-промотор и позволяет транскрибировать интересующий ген. Концентрация ИПТГ имеет решающее значение для оптимизации уровня экспрессии и минимизации ненужной метаболической нагрузки на клетки. Более низкие концентрации ИПТГ часто используются для получения растворимых белков и для снижения клеточного стресса, что может помочь предотвратить образование телец включения. Было показано, что при синтезе некоторых рекомбинантных белков, например, токсичных белков, низкие уровни ИПТГ (0,01-0,1 мМ) позволяют сбалансировать выход с качеством белка, обеспечивая более медленную и контролируемую индукцию [258]. Умеренная концентрация ИПТГ в диапазоне 0,1 и 0,5 мМ часто используется для индукции синтеза белка. Этот диапазон, как правило, обеспечивает эффективный баланс между выходом белка и нагрузкой на клетки, позволяя избежать их избыточного стресса. Использование 0,1 мМ ИПТГ бывает достаточным для достижения высоких уровней экспрессии некоторых белков при комбинации использования высокопроцессивных штаммов *E. coli* и эффективного промотора [259]. Высокая концентрация от 1 мМ ИПТГ обычно используется для индукции максимальной экспрессии. Однако высокая концентрация ИПТГ может увеличить метаболическую нагрузку на бактериальные клетки и привести к снижению эффективности экспрессии целевого белка из-за его агрегации и образования телец включения. Более высокие концентрации ИПТГ обычно подходят для краткосрочного синтеза белков в больших концентрациях, которые не имеют проблем с растворимостью или токсичностью [260]. Идеальная концентрация ИПТГ зависит от таких факторов, как вектор экспрессии, растворимость белка, токсичность белков и фаза роста клеток, на которой проводится индукция.

Мы сравнили выход рекомбинантного белка sE штамма Сухар при умеренной 0,5 мМ (Рисунок 21 (а)) и высокой концентрации ИПТГ 5 мМ (Рисунок 21 (б)).

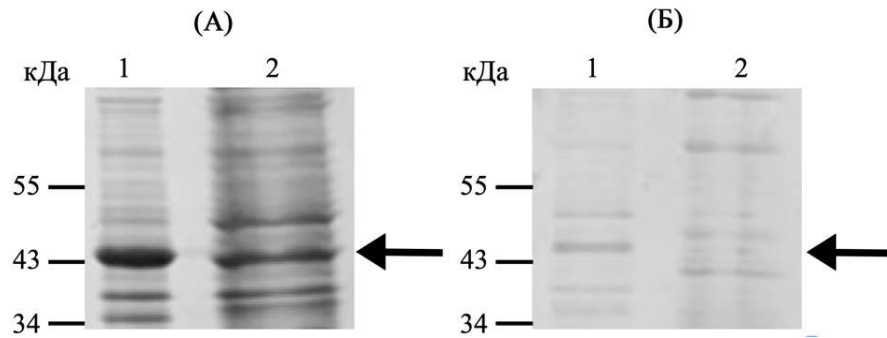


Рисунок 21 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ белка sE (44 кДа) штамм Сухар ВКЭ (указан стрелкой) после индукции 0,5 мМ (а) и 5 мМ (б) ИПТГ. На дорожки нанесены: клеточный осадок после индукции (1) и супернатант после индукции клеток (2)

Оптимальную концентрацию ИПТГ для получения белка sE ВКЭ штамма Сухар в количестве 0,5 мМ определили визуально по результатам белкового электрофореза в ПААГ согласно полосе, соответствующей молекулярной массе белка (Рисунок 21). При этом большая часть целевого белка находилась в нерастворимой части, т.е. в осадке. Для получения рекомбинантных белков dI+II и dIII в дальнейшем использовали концентрацию ИПТГ 0,5 мМ.

Для подбора условий оптимальной концентрации ИПТГ для синтеза белка sE штамма Софьин, отталкивались от подобранной концентрации ИПТГ для белка sE штамма Сухар. Индукцию экспрессии белка проводили разными концентрациями ИПТГ (0,1 мМ (Рисунок 22 (а)), 0,25 мМ (Рисунок 22 (б)) и 0,5 мМ (Рисунок 22 (в))) и, солюбилизировали синтезированный белок в присутствии 6 М мочевины, после чего центрифугировали клеточную суспензию и оценивали визуально супернатант в ПААГ (Рисунок 22).

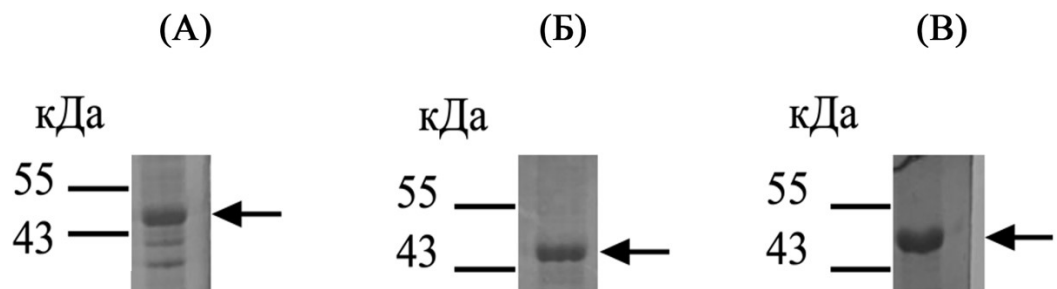


Рисунок 22 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ белка sE штамма Софьин (указан стрелками) после индукции низкими концентрациями ИПТГ (а – 0,1 мМ, б – 0,25 мМ, в – 0,5 мМ). На дорожках нанесен супернатант индуцированных ИПТГ клеток, после их солюбилизации 6 М мочевиной. Денситометрия целевого белка sE (44 кДа): 182136 (а), 230152 (б), 240477 (в)

Наличие целевого белка sE штамма Софьин в ПААГ оценивали денситометрически по полосе, соответствующей молекулярной массе белка. Денситометрия составляла 182136 при использовании 0,1 мМ ИПТГ, 230152 при использовании 0,25 мМ ИПТГ, 240477 при использовании 0,5 мМ ИПТГ. Оптимальную концентрацию ИПТГ для индукции белка sE штамма Софьин определили как 0,5 мМ.

После синтеза белка методом вестерн-блота подтверждали его наличие и способность связываться с антителами из гипериммунной асцитной жидкости мыши, содержащей антитела против ВКЭ штамма ЭК-328, Сибирского подтипа. В качестве отрицательного контроля использовали мышиную сыворотку не зараженной мыши (Рисунок 23).

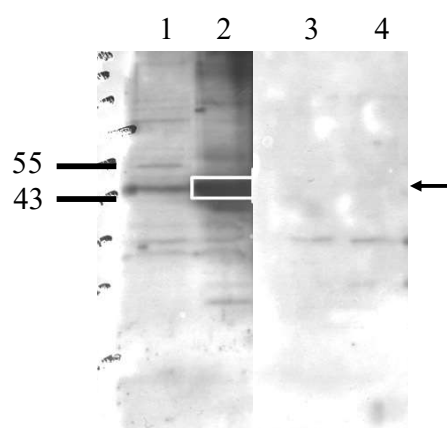


Рисунок 23 – Вестерн-блот рекомбинантного белка sE штамма Софьин до индукции (1 и 3) и после индукции (2 и 4) синтеза, окрашенные гипериммунной асцитной жидкостью мыши, содержащей антитела к ВКЭ штамму ЭК-328 (1 и 2) и мышиную сывороткой не зараженной мыши (3 и 4)

3.3.3 Подбор условий солюбилизации

Одной из проблем, которая возникает при получении белков в бактериальной системе, является агрегация белков в виде телец включения. Тельца включения представляют собой плотные нерастворимые агрегаты неправильно сложенного белка, которые необходимо солюбилизировать, после чего проводить рефолдинг для получения биологически активных белков. Для разрушения этих агрегатов и солюбилизации белка обычно используется мочевины как хаотропный агент в концентрации от 6 до 8 М. Мочевина эффективно денатурирует белки, делая их пригодными для дальнейших этапов очистки [261]. Солюбилизация телец включения мочевиной является простым и эффективным подходом, но требует тщательной оптимизации, поскольку неподходящие условия могут привести к реагрегации или неправильному фолдингу белка.

Для оптимизации условий получения исследуемых рекомбинантных белков для каждого целевого белка проводили солюбилизацию в градиенте концентраций мочевины (от 2 до 8 М).

Выход белков sE, dI+II и dIII штамма Сухар в раствор достигал максимума при использовании 6 М мочевины при денситометрической оценке полос в ПААГ (Рисунок 24) [194].

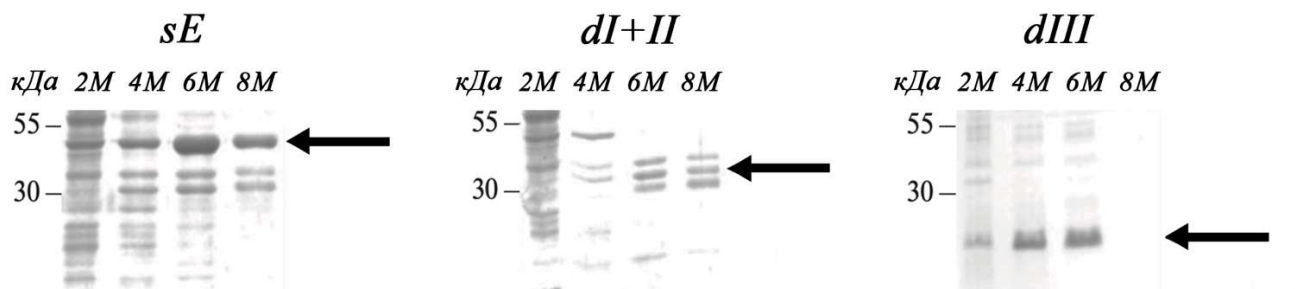


Рисунок 24 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII штамма Сухар (указаны стрелками) после солубилизации разными концентрациями мочевины для извлечения целевых белков из телец включения. На дорожки нанесены: супернатант после солубилизации с 2 М (3), 4 М (4), 6 М (5) и 8 М (6) мочевиной

Условия солубилизации для белка sE штамма Софьин подбирали аналогично условиям для белка sE штамма Сухар (Рисунок 25). Денситометрия полос целевого белка sE штамма Софьин (относительные единицы оптической плотности): 32122 (при 2 М мочеvine), 176339 (при 4 М мочеvine), 507204 (при 6 М мочеvine), 389653 (при 8 М мочеvine).

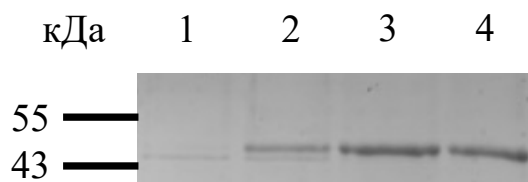


Рисунок 25 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ рекомбинантного белка sE штамма Софьин после последовательной солубилизации в градиенте мочевины 2 М (1), 4 М (2), 6 М (3) и 8 М (4) Денситометрия целевого белка sE (относительные единицы оптической плотности): 32122 (1), 176339 (2), 507204 (3), 389653 (4)

Следует уточнить, что выбранная концентрация 6 М была оптимальной для дальнейшей аффинной хроматографии с использованием гравитационных колонок, в которых визуально изменялся цвет сорбента при использовании 8 М мочевины.

3.3.4 Подбор концентрации имидазола для выделения рекомбинантных белков с помощью аффинной хроматографии

В элюирующих буферах для аффинной хроматографии на никель-нитрилтриуксусной кислоте (Ni-NTA) или кобальтовых смолах для очистки His-меченых белков обычно используют

имидазол. Имидазол конкурирует с гистидиновыми остатками белка за места связывания на металло-аффинной смоле, что позволяет контролировать элюцию целевого белка. Концентрация имидазола, используемая в элюирующем буфере, имеет решающее значение для достижения оптимального выхода и чистоты целевого продукта. Начальные низкие концентрации имидазола (около 10-20 мМ) обычно используют в промывочном буфере для минимизации неспецифического связывания сорбента со слабо взаимодействующими белками, что повышает чистоту белка [262].

Концентрация имидазола для буфера промывки в аффинной хроматографии при очистке исследуемых рекомбинантных белков составляла 10 мМ. Элюирование обычно проводят при умеренных или высоких концентрациях имидазола (от 100 до 500 мМ) в зависимости от средства связывания целевого белка с металлической смолой и конкретной используемой смолой Ni или Co. Более высокие концентрации имидазола эффективно вытесняют His-меченые белки из смолы. Для большинства смол Ni-NTA концентрация имидазола около 250-300 мМ достаточна для элюирования His-меченых белков без существенной потери чистоты [263]. Остаточные количества имидазола в пробах могут выступать в роли интерферирующего агента и тем самым нарушать корректность результатов ИФА [264]. Поэтому важно выбрать максимально-минимальную концентрацию имидазола, которая будет обеспечивать высокую степень очистки белка и хорошую элюцию белка.

В буфере для элюирования концентрацию имидазола варьировали от 50 мМ до 300 мМ с шагом 50 мМ по 3 мл и последовательно элюировали белок с повышением концентрации (Рисунок 26).

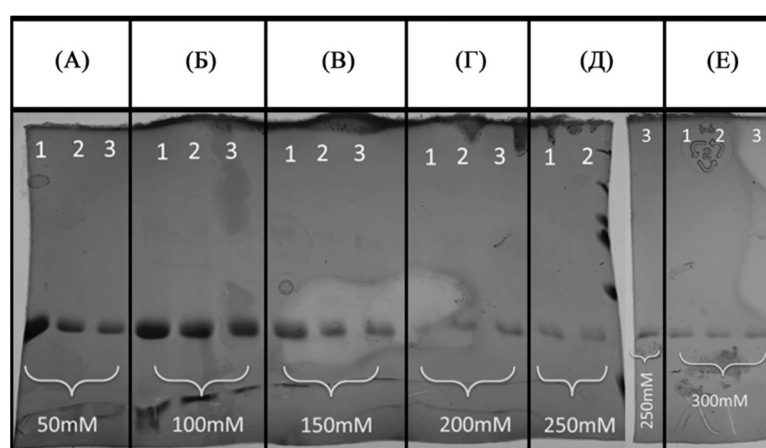


Рисунок 26 – Электрофоретический анализ в 12% ПААГ белка sE штамма Сухар (44кДа) после последовательного элюирования с повышением концентрации имидазола. На дорожки нанесены образцы, элюированные при следующих концентрациях имидазола: 50 мМ (А), 100мМ (Б), 150 мМ (В), 200 мМ (Г), 250 мМ (Д) и 300 мМ (Е)

Для белка sE штамма Сухар выбранная оптимальная рабочая концентрация имидазола в элюирующем буфере, используемом на аффинном сорбенте, составила 150 мМ (Рисунок 26). Именно при такой концентрации выход белка начинает снижаться, следовательно, целевой продукт вышел из колонки. Такую же концентрацию имидазола использовали для выделения белков dI+II, dIII штамма Сухар и sE штамма Софьин.

3.3.5 Рефолдинг белка sE штамма Сухар

После солюбилизации телец включения с помощью мочевины раствор денатурированного белка должен восстановить свою нативную, биологически активную структуру. Рефолдинг белков обычно проводят путём постепенного удаления мочевины с помощью диализа или обессоливания, что способствует восстановлению нативной структуры белка. Для подбора оптимальных условий варьируют pH, концентрацию белка и состав окислительно-восстановительной среды [265]. Одной из проблем при рефолдинге белков является их агрегация. Во избежание агрегации в процессе рефолдинга нередко используют восстановленный и окисленный глутатион (GSH/GSSG), обеспечивающие корректное образование дисульфидных связей [266; 267].

Рефолдинг проводили несколькими способами: путём смены буфера и при помощи глутатиона. После выделения белка на колонках с Ni-NTA сорбентом рефолдинг проводили путём смены буфера элюции на ФСБ с использованием колонок Hi-Trap Desalting Column. Интенсивность окрашенных полос, соответствующих целевым белкам, измеряли в ПААГ, как описано в разделе Материалы и методы. Второй способ рефолдинга проводили с помощью глутатиона на примере рекомбинантного белка sE штамма Сухар, покапельно внося глутатион в пробу с белком.

Концентрация белка sE штамма Сухар после рефолдинга путем смены буфера на колонке была выше (разведен в 10 раз для визуальной оценки), чем после рефолдинга с глутатионом (Рисунок 27).

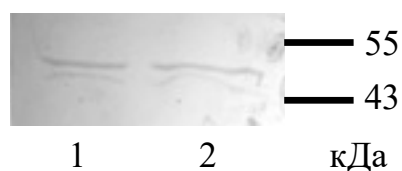


Рисунок 27 – Электрофорез в 12% ПААГ белка sE после рефолдинга с глутатионом (дорожка 1) и рефолдинга путём смены буфера на колонке. Полученный рекомбинантный белок sE путем смены буфера на колонке разведен в 10 раз (дорожка 2)

Концентрация белка sE после рефолдинга с глутатионом сильно падает. В дальнейшем проводили рефолдинг путём смены буфера с использованием колонок Hi-Trap Desalting Column для всех рекомбинантных белков (sE, dI+II и dIII штамм Сухар) и методом смены буфера при

помощи центрифужных концентраторов Amicon с диаметром пор 30 кДа для белка sE штамма Софьин.

3.3.6 Измерение концентрации белков

Выход белков с одного литра бактериальной культуры после описанных выше стадий их получения оценивали с использованием калибровки БСА по интенсивности полос после окрашивания Кумасси в ПААГ (Рисунок 28) с помощью пакета программ Genesys Tool.

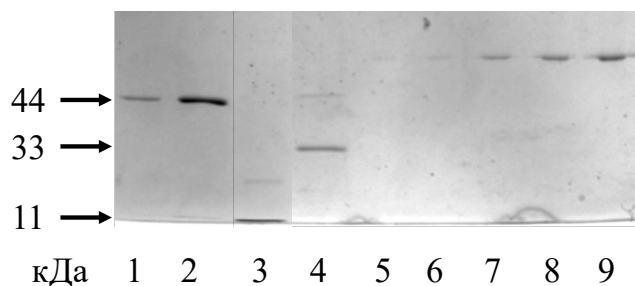


Рисунок 28 – Электрофорез в 15% ПААГ рекомбинантных белков sE (44 кДа) в двух разведениях: с разведением в 200 раз (дорожка 1) и в 20 раз (дорожка 2); dIII (11 кДа) в разведении в 200 раз (дорожка 3); dI+II (11 кДа) в разведении в 200 раз (дорожка 4) (указаны стрелками); концентрации БСА: 0,0025 мг/мл (дорожка 5), 0,005 мг/мл (дорожка 6), 0,025 мг/мл (дорожка 7), 0,05 мг/мл (дорожка 8), 0,1 мг/мл (дорожка 9)

Концентрации полученных рекомбинантных белков с 1 литра бактериальной культуры представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Конечные значения концентраций полученных рекомбинантных белков с одного литра культуры

Белок	Концентрация белка мг/мл
sE	3,103
dI+II	7,884
dIII	7,089
sE (Софьин)	0,7465

3.3.7 Первичный анализ способности связывания полученных рекомбинантных белков с антителами против вируса клещевого энцефалита

Несмотря на то что рекомбинантные белки sE, dI+II, dIII были получены в прокариотической системе и, следовательно, не гликозилированы, в ряде случаев показано, что отсутствие гликозилирования не препятствует сохранению антигенных свойств белков [268; 269].

Способность полученных рекомбинантных белков связываться с антителами, специфичными к ВКЭ, определяли методами иммуноблоттинга и ИФА. Исследуемые

рекомбинантные белки sE, dI+II и dIII штамма Сухар и белок sE штамма Софьин связывались с анти-ВКЭ-антителами из гипериммунной асцитной жидкости мыши к ВКЭ (штамм Абсеттаров) при анализе в иммуноблоттинге (Рисунок 29, 30). Предварительно наличие анти-ВКЭ-антител в гипериммунной мышиноной сыворотке было подтверждено в РН. Титр НАТ против штамма Абсеттаров, к которому была получена сыворотка, составлял 2,95 lg [194].

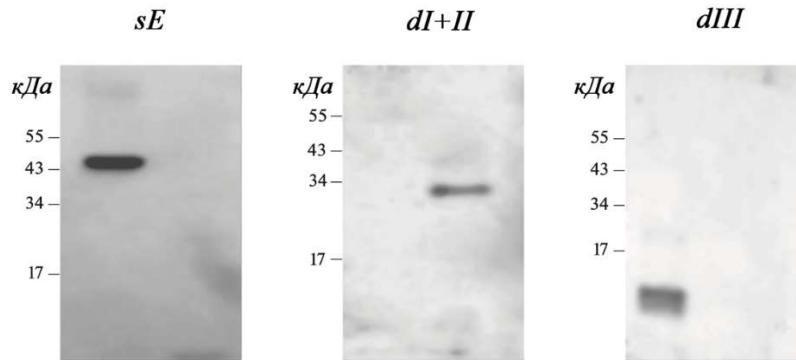


Рисунок 29 – Вестерн-блот рекомбинантных белков sE (44 кДа), dI+II (33 кДа) и dIII (11 кДа) штамма Сухар с гипериммунной асцитной жидкостью мыши, трижды иммунизированной ВКЭ (штамм Абсеттаров). Для детекции использованы HRP-меченые антитела против IgG мыши (Abscam, Великобритания)

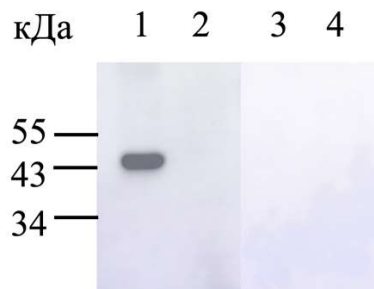


Рисунок 30 – Вестерн-блот с белком sE штамма Софьин (44 кДа). Дорожки 1 и 3 –очищенный белок sE штамма Софьин, дорожки 2 и 4 –контрольные пробы, К- (очищенная суспензия клеток *E. coli*, трансфицированных плазмидой pQE-32 (без вставки) после ИПТГ-индукции, солюбилизации, аффинной хроматографии и обессоливания). Слева (дорожки 1 и 2) – мембрана, окрашенная мышиноной сывороткой, содержащей антитела к ВКЭ, штамм Абсеттаров; справа (дорожки 3 и 4) – мембрана, окрашенная мышиноной сывороткой, не содержащей антител к ВКЭ

Для полученных рекомбинантных белков была подобрана рабочая концентрация для использования в ИФА в качестве антигенов. Пробы рекомбинантных белков приводили к единой концентрации 0,6 мг/мл и сорбировали на планшет в разведениях 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 и 1:10000. В качестве сыворотки использовали положительную сыворотку человека, дважды иммунизированного вакциной «Клещ-Э-Вак», раститрованную в разведениях начиная с 1:50 с шагом 4. Оптимальная концентрация, при которой не наблюдалось снижения оптической

плотности в ИФА, для полученных рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII составила 12 нг на лунку.

На основании значений оптической плотности, полученной в ИФА с положительной сывороткой вакцинированного человека, строили калибровочную кривую линейной зависимости для определения титров искомым сывороток в дальнейших экспериментах с человеческими сыворотками.

Параллельно с исследуемыми антигенами сенсibiliзировали другие лунки антигеном К- (очищенную суспензию клеток *E. coli*, трансфецированных плазмидой pQE-32 (без вставки) после ИПТГ-индукции, солюбилизации, аффинной хроматографии и обессоливания), в концентрации 12 нг общего белка/лунку. Все исследуемые рекомбинантные белки выявляли анти-ВКЭ-антитела в ИФА при исследовании сыворотки условно здорового человека, взятой через месяц после второй иммунизации вакциной Клещ-Э-Вак (Рисунок 31).

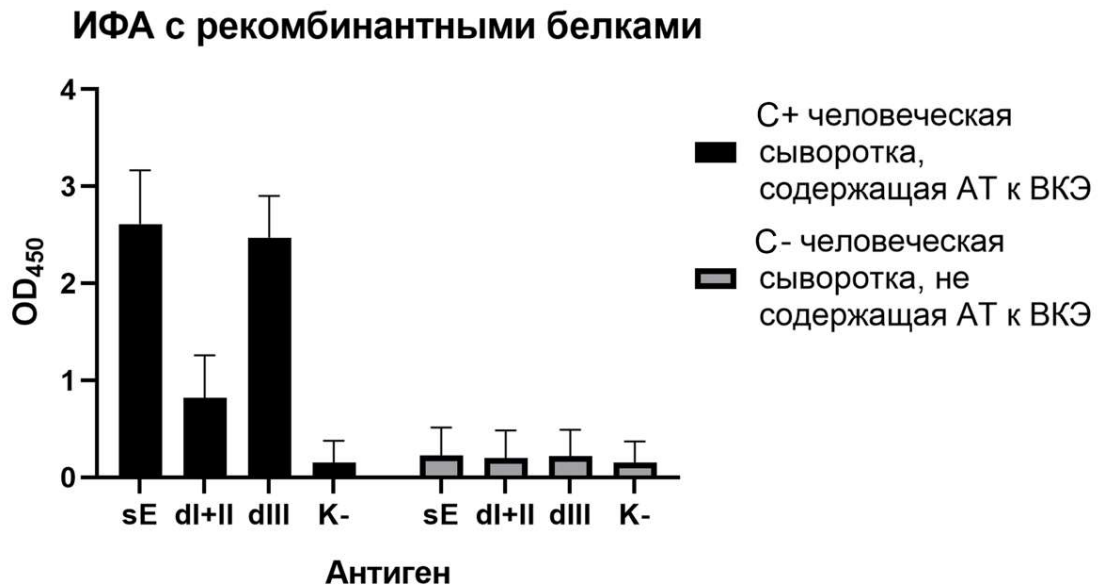


Рисунок 31 – Анализ способности рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII ВКЭ штамма Сухар связываться с анти-ВКЭ-антителами в сыворотке крови человека методом ИФА. Сыворотка человека, дважды иммунизированного вакциной Клещ-Э-Вак (С+), сыворотка невакцинированного человека (С-) в разведении 1:50. Для детекции использованы HRP-меченые антитела против IgG человека

Методом ИФА сравнили взаимодействие рекомбинантных белков sE, dI+II, dIII штамма Сухар и sE штамма Софьин с антителами к ВКЭ в сыворотке крови человека, дважды иммунизированного вакциной Клещ-Э-Вак. Для отрицательного контроля использовали сыворотку условно здорового, невакцинированного от ВКЭ человека (Рисунок 32).

Сравнение рекомбинантных белков в ИФА

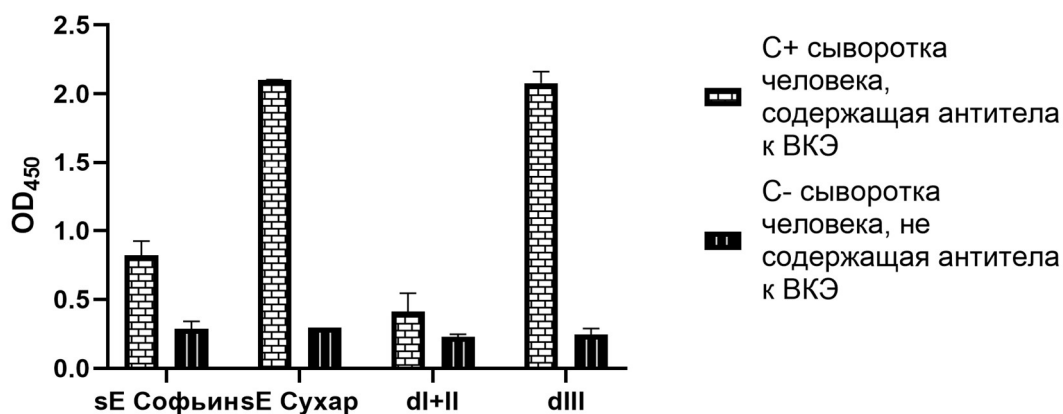


Рисунок 32 – ИФА при использовании в качестве антигенов белков sE, dI+II, dIII штамма Сухар и sE штамма Софьин с сыворотками: С+ – сыворотка человека после двукратной иммунизации вакциной Клещ-Э-Вак, С- – сыворотка невакцинированного от ВКЭ, условно здорового человека

При сравнении в ИФА взаимодействия рекомбинантных белков sE штамма Софьин и sE штамма Сухар, полученных в рамках данной работы, с положительной сывороткой крови вакцинированного от КЭ человека, белок sE штамма Софьин, взятый в той же концентрации, показал более низкий уровень сигнала, чем при использовании белка sE штамма Сухар (Рисунок 32), несмотря на то, что штамм Софьин используется для приготовления вакцины КЭ. Это может быть связано с отсутствием цистеина на N-конце белка sE штамма Сухар, и, как следствие, другому сворачиванию белка, которое способствовало его повышенной активности в ИФА. В дальнейшем рекомбинантный белок sE штамма Софьин не использовали в работе. Стоит отметить, что эффективность выявления антител к ВКЭ, а также специфичность разрабатываемых ИФА тест-систем может быть различной в зависимости от штамма и структуры белка, что также подтверждается результатами нашей работы.

Параллельно с данной работой исследователи получали отдельно третий домен (dIII) белка Е ВКЭ таких штаммов как Заусаев (сибирский подтип), Софьин и Glubinoe/2004 (дальневосточный подтип), 1528-99 и Абсеттаров (европейского подтипа) и полный белок Е, включающий трансмембранный домен (dIV). В большинстве работ полученные рекомбинантные белки использовали для исследования сайтов связывания моноклональных антител. Для домена dIII белка Е ВКЭ, полученного на основе штамма Glubinoe/2004, был проведен анализ его диагностических характеристик в ИФА, в котором было показано, что экспериментальная тест-система на основе рекомбинантного белка обладала меньшей чувствительностью, однако большей специфичностью в сравнении с коммерческими ИФА-наборами [270–272].

Таким образом, была проведена работа по оптимизации следующих условий: подобрана среда для культивирования белков в клетках *E. coli* – среда ТВ, подобрана концентрация ИПТГ

(0,5 мМ) для индукции синтеза белка и выбрана концентрация мочевины (6 М) для солюбилизации белков из телец включения в растворимую фракцию. Отработаны условия очистки – сформирован протокол выделения при помощи аффинной хроматографии на никелевом сорбенте и обессоливания полученных рекомбинантных белков после очистки (Рисунок 33) [194].

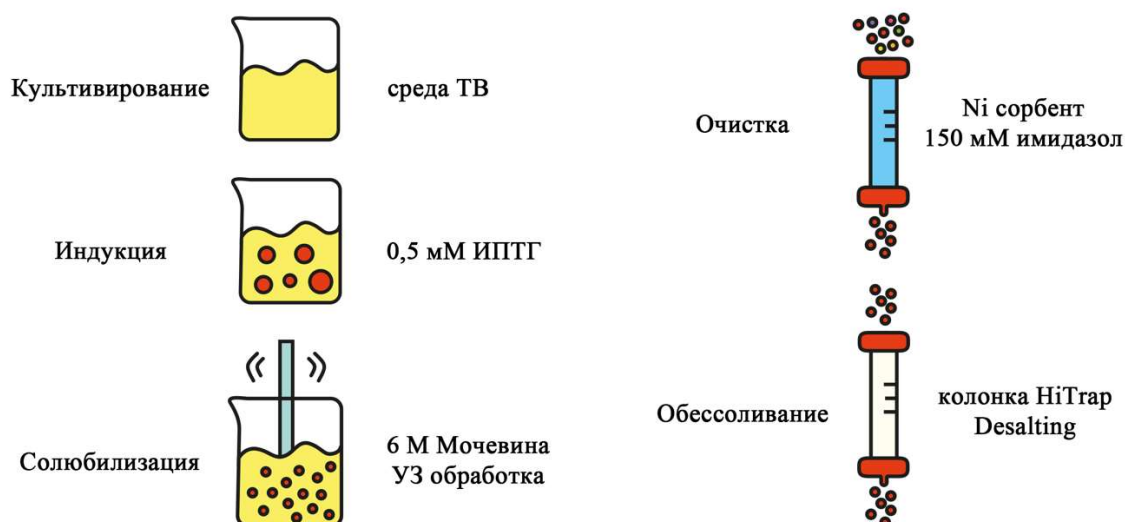


Рисунок 33 – Схематичное представление условий получения рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII белка E ВКЭ штамма Сухар

Всё это позволяет получать рекомбинантные белки в концентрации 3,1 – 7,8 мг с одного литра культуры с сохранением их антигенных свойств в реакциях вестерн-блота и ИФА.

3.4 Выявление антител против вируса клещевого энцефалита с помощью диагностической методики иммуферментного анализа на основе рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII штамма Сухар

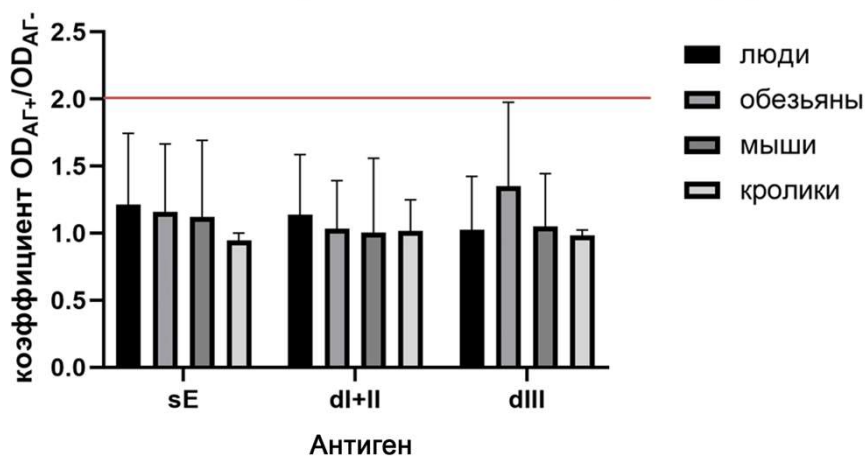
3.4.1 Определение порогового значения и коэффициента порогового значения для диагностической методики иммуферментного анализа

Ключевым моментом при оценке результатов ИФА является определение порогового значения, позволяющего отличить положительный сигнал от отрицательного. Существует несколько подходов к его расчету. Наиболее традиционный метод основан на использовании средней оптической плотности отрицательных сывороток с добавлением статистической поправки, такой как плюс одно или плюс два стандартных отклонения [273]. Также в ИФА встречается и другой подход, исследователи применяют методику с параллельным сорбированием специфического антигена (АГ+) и контрольного антигена (АГ-), полученного в тех же условиях [274]. В нашем случае был применен коэффициент $OD_{(АГ+)} / OD_{(АГ-)}$, который

отражает отношение специфического сигнала к фону. Такой подход оптимален, так как есть риск повышенного фонового связывания в некоторых случаях особенно при исследовании сывороток от пациентов с неизвестным диагнозом или при смешанной инфекции на фоне выраженного иммунного ответа на другой антиген.

Для определения порогового значения диагностической методики ИФА были использованы отрицательные сыворотки людей, обезьян, мышей и кроликов. Коэффициент рассчитывали как соотношение оптических плотностей, определенных при исследовании отрицательных сывороток с положительным антигеном (АГ+) к оптической плотности, определенной с теми же образцами с отрицательным антигеном (АГ-). Пороговым значением считалось среднее значение коэффициента плюс два стандартных отклонения (2SD). Положительными антигенами выступали рекомбинантные белки sE, dI+II и dIII ВКЭ штамма Сухар, отрицательным антигеном – К- (очищенная суспензия клеток *E. coli*, трансфицированная плазмидой pQE-32 (без вставки) после ИПТГ-индукции, солюбилизации, аффинной хроматографии и обессоливания) (Рисунок 34).

Оценка порогового значения ИФА системы с использованием отрицательных сывороток (К-)



$$K = \frac{\overline{OD}_{\text{АГ}^+}}{\overline{OD}_{\text{АГ}^-}}$$

Рисунок 34 – Определение порогового значения диагностической методики ИФА с использованием набора отрицательных сывороток лабораторных животных и людей. Доверительные интервалы соответствуют двум стандартным отклонениям. Справа указана формула расчёта порогового значения

Корректная интерпретация ИФА должна учитывать видовую специфику: пороговое значение, приемлемое для человека, может оказаться неадекватным для мыши, собаки или дикого животного. Это связано с межвидовыми различиями в иммунной системе, составе сыворотки и степенью неспецифического связывания с сорбентом для разных организмов. Было показано, что при разработке мультивидовых диагностических ИФА тест-систем требовалось устанавливать разные пороги в зависимости от организма, от которого был получен материал

(люди, собаки, мыши, кролики, олени и т.д.), поскольку уровень фонового сигнала и динамика специфических антител варьировалась между видами [275–277]. В нашем случае был рассчитан критерий отсечения по формуле выше, который соответствовал коэффициенту $OD_{(AG+)} / OD_{(AG-)}$ равному двум для сывороток всех исследуемых организмов (Рисунок 34).

Валидность используемого нами коэффициента была подтверждена при исследовании пула заведомо положительных сывороток человека и лабораторных животных (мышей, кроликов и обезьян), содержащих антитела к ВКЭ в сравнении с заведомо отрицательными сыворотками (Рисунок 35). Для повышения точности анализа рассчитывали пороги отдельно для каждого организма.

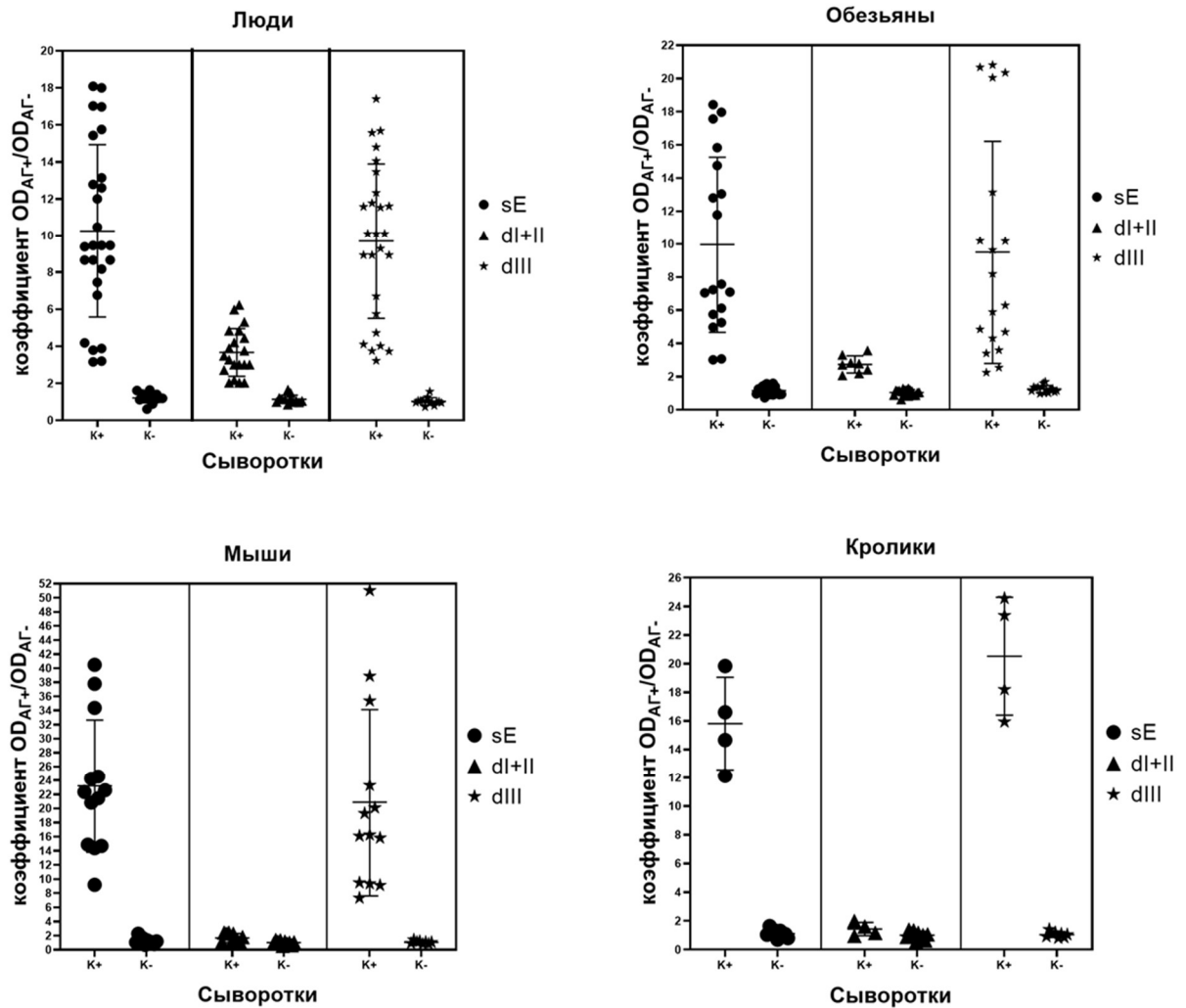


Рисунок 35 – Оценка валидности порогового значения диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dIII и dI+II при исследовании положительных и отрицательных сывороток крови лабораторных животных и людей. Доверительные интервалы соответствуют двум стандартным отклонениям

Таким образом был подтвержден выбранный порог отрицательных значений при коэффициенте $OD_{(AG+)} / OD_{(AG-)}$ равном двум при исследовании сывороток людей, обезьян,

кроликов и мышей в лабораторной диагностической методике ИФА с использованием рекомбинантных белков sE и dIII штамма Сухар. При использовании сывороток мышей и кроликов не были обнаружены антитела к рекомбинантному белку dI+II, поэтому для этого антигена порог отсечения, равный двум, был рассчитан с использованием сывороток людей и обезьян.

3.4.2 Филогенетический анализ штаммов ортофлавивирусов, используемых для получения иммунных сывороток лабораторных животных

На территории РФ одним из наиболее распространенных ортофлавивирусов является ВКЭ. На эндемичных по ВКЭ территориях в России проживает около 60 миллионов человек [232; 278; 279]. При этом на этих территориях помимо ВКЭ также существуют совместные очаги с другими ортофлавивирусами: ВЗН, ВОГЛ, ВПОВ. Последовательности штаммов ВКЭ всех известных подтипов, а также штаммов ВЗН, ВОГЛ, ВПОВ и Лангат были взяты из онлайн сервиса GenBank и использованы для филогенетического анализа. Для наиболее распространенного на территории РФ сибирского подтипа ВКЭ были взяты минимум по 4 штамма для каждой группы (Рисунок 36).

Филогенетическое дерево было построено в программе Mega X методом ClustalW. Штаммы ВКЭ, ВОГЛ, вируса Лангат, ВЗН и ВПОВ, отмеченные на дереве красными кругами, были использованы в работе (Рисунок 36).

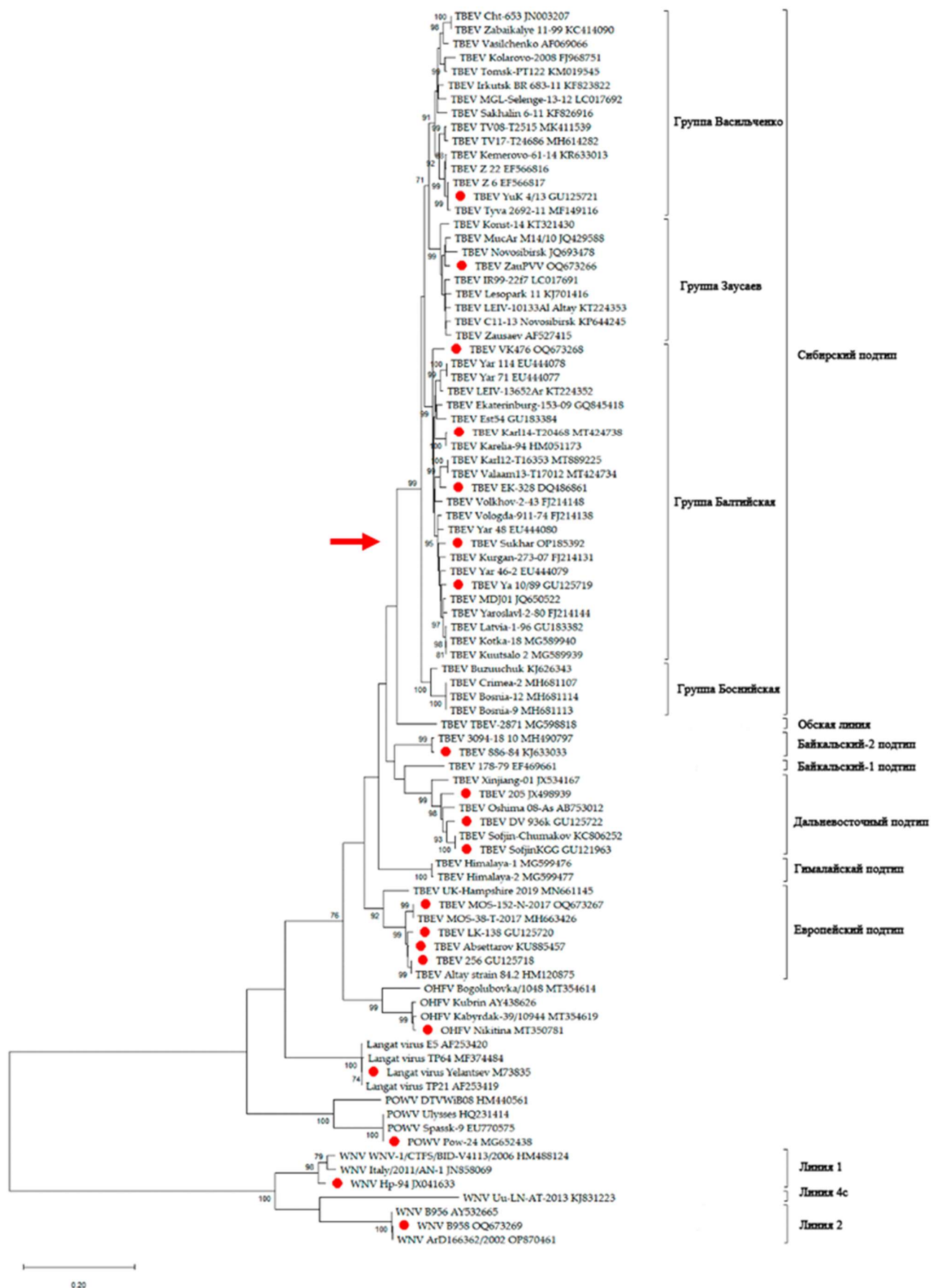


Рисунок 36 – Филогенетическое дерево построено на основе нуклеотидных последовательностей белка E в программе Mega X методом ClustalW. Красной стрелкой отмечен штамм Сухар, который использовали для получения рекомбинантных белков. Штаммы, используемые в работе, отмечены красным кругами

Для анализа были выбраны штаммы ВКЭ, которые представляли разные группы (ветви) на филогенетическом дереве. Как видно в Таблице 2, для получения панели сывороток лабораторных животных, были выбраны штаммы, изолированные из разных источников (клевц, человек, полёвка) и в разные годы, в том числе за последние 20 лет.

Ранее подобный набор штаммов был апробирован для анализа протективной способности вакцины КЭ на основе европейского и дальневосточного штаммов [129].

3.4.3 Анализ мышинных иммуноасцитных жидкостей мышей и кроличьих сывороток, содержащих антитела к разным штаммам вируса клещевого энцефалита, в иммуноферментном анализе с белками sE, dI+II и dIII

Для проверки чувствительности тест-системы были получены сыворотки к набору штаммов ВКЭ: Absettarov, ZauPVV, VK476, MOS-152-N-2017, Karl14-T20468, LK-138, 205, DV 936k, 178–79, 886–84, принадлежащих к разным подтипам ВКЭ (Рисунок 36). Вирусы предварительно размножали в мозге мышей для получения высокотитражных мозговых суспензий, которые в дальнейшем использовали для получения сывороток и ИАЖ.

Титр НАТ в ИАЖ определяли против соответствующего вируса (Таблица 9) с помощью РН 50% бляшек в культуре клеток СПЭВ. Титры НАТ исследуемых мышинных ИАЖ составляли около 2,5lg.

ИАЖ кроликов, полученные ранее в лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), и ИАЖ мышей, полученные в рамках данной работы, содержащие антитела против различных штаммов ВКЭ, которые циркулируют на территории РФ, тестировали в ИФА с белками sE, dI+II и dIII. Все исследуемые ИАЖ были положительны в ИФА тест-системе с рекомбинантными белками sE и dIII и отрицательны с dI+II (Таблица 9).

Таблица 9 – Титр НАТ и результаты ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII при исследовании ИАЖ, содержащих антитела к разным штаммам ВКЭ

От кого получена ИАЖ	Подтип	Штамм	Титр НАТ против соответствующего вируса, lg(НАТ)	ИФА (sE)	ИФА (dI+II)	ИФА (dIII)
Мышь	Европейский	Absettarov	2,95	+	–	+
	Европейский	MOS-152-N-2017	1,9	+	–	+
	Сибирский	VK476	2,94	+	–	+
	Сибирский	ZauPVV	1,9	+	–	+
	Сибирский	Karl14-T20468	2	+	–	+
Кролик	Дальневосточный	256	н/т	+	–	+
	Сибирский	Yar-82	н/т	+	–	+
	Сибирский	Kurg-59	н/т	+	–	+

«н/т» – не тестировали

Разработанная ИФА тест-система на основе рекомбинантных белков dIII и sE была эффективна в отношении всех исследуемых ИАЖ, содержащих антитела ко всем штаммам ВКЭ, используемым в работе. Рекомбинантный белок dI+II не сработал ни с одной мышиной и кроличьей сывороткой.

3.4.4 Выявление антител против разных штаммов вируса клещевого энцефалита в сыворотке крови мышей при экспериментальном заражении

Для определения спектра выявляемых антител против ВКЭ с использованием рекомбинантных белков тестировали сыворотки мышей, полученные при моделировании естественной инфекции различными штаммами ВКЭ. Мышей заражали подкожно по 0,1 мл вируса в заднюю лапу. Сыворотки от 3х мышей на 7-й день после инокуляции одним вирусом объединяли в пул. Все сыворотки были протестированы в РН против штамма вируса соответствующего подтипа.

Ввиду отсутствия сигнала в ИФА при использовании рекомбинантного белка dI+II при тестировании мышинных и кроличьих ИАЖ, белок не использовали в исследовании сывороток после экспериментального заражения КЭ.

В пулах сывороток крови мышей, зараженных ВКЭ, на 7-й день после введения вируса титры НАТ в РН были низкими (на уровне 1–1,4 lg). При выявлении IgG антител 3/8 и 4/8 исследуемых сывороток показали отрицательный результат в ИФА с рекомбинантными белками sE и dIII соответственно. Тем не менее, большинство исследуемых сывороток (7/8) оказались

положительными на IgM-антитела в ИФА с белком dIII, а половина пулов (4/8) - положительными на IgM-антитела в ИФА с белком sE (Таблица 10).

Таблица 10 – Исследование сывороток мышей на 7-е сутки после заражения разными штаммами ВКЭ в ИФА на основе белков sE и dIII

Подтип	Штамм	Титр НАТ против ВКЭ, lg	ИФА IgG (sE)	ИФА IgM (sE)	ИФА IgM (dIII)
Европейский	Absettarov	н/т	+	+	+
	LK-138	1,25 * ¹	–	–	+
Сибирский	Yuk 4/13	1,07 ²	+	+	+
	SofjinKGG	1,17 ³	+	–	–
Дальневосточный	205	1,24 ³	+	+	+
	DV 936k	н/т	+	+	+
Байкальский-1	178–79	1,48 ²	–	–	+
Байкальский-2	886–84	1,45 ²	–	–	+

* – Разброс значений для РН с контрольной сывороткой для ВКЭ находится в пределах SD=0,18 (n = 10);

¹ – титр НАТ был проверен в РН со штаммом LK-138;

² – титр НАТ был проверен в РН со штаммом EK-328;

³ – титр НАТ был проверен в РН со штаммом SofjinKGG;

«н/т» – не тестировали

При исследовании сывороток крови мышей, полученных на 7-е сутки после заражения разными штаммами ВКЭ, с использованием ИФА тест-системы на основе белков sE и dIII, IgG антитела выявлялись не во всех сыворотках. Это связано с тем, что на 7-е сутки IgG антительный ответ еще слабо сформирован, что подтверждается низкими титрами антител, определенных в РН (<1,5 lg). Так у людей уровень IgM достигает пика на 10-14 сутки после заражения (на ранних стадиях заболевания) и начинает снижаться примерно к шести неделям после заражения [280]. У мышей IgG антитела обычно обнаруживаются вскоре после IgM антител, причем заметное повышение уровня наблюдается в течение нескольких недель после заражения. Важно отметить, что хотя эти временные рамки представляют собой общую схему, точная кинетика появления антител может варьироваться в зависимости от таких факторов, как вид организма, доза вируса и путь заражения [281]. Выявление IgG-антител в сыворотках мышей на ранней стадии инфекции с помощью ИФА оказалось проблематичным, тогда как анализ IgM-антител позволил выявить их в тех образцах, в которых результаты выявления IgG антител были отрицательными (Таблица 10).

Таким образом, была продемонстрирована высокая чувствительность диагностической методики ИФА на основе полученных рекомбинантных белков sE и dIII при использовании их в качестве антигенов для выявления антител к широкому спектру штаммов ВКЭ, относящихся к

европейскому, сибирскому, дальневосточному и байкальским подтипам, как в гипериммунных сыворотках и ИАЖ мышей и кроликов, так и в сыворотках крови мышей при экспериментальной инфекции ВКЭ [282]. Использовались охарактеризованные ранее штаммы, выделенные в разные годы, из разных источников и из разных географических регионов [235].

Суммируя результаты, полученные рекомбинантные белки sE и dIII пригодны для выявления как IgG, так и IgM антител против ВКЭ, что может быть в дальнейшем применимо для диагностики антител к ВКЭ.

3.4.5 Оценка спектра антител против вируса клещевого энцефалита в сыворотках крови обезьян после экспериментальной инфекции вирусом клещевого энцефалита или иммунизации вакциной против клещевого энцефалита

Обезьян делили на группы по две-три особи. Одной группе вводили вакцину КЭ двукратно с интервалом в 14 дней, вторую группу заражали ВКЭ штамм ЭК-328, а третьей группе вводили физиологический раствор и использовали в качестве отрицательного контроля. Сыворотки обезьян до заражения были исследованы в РН на наличие антител к вирусам ВЗН, ВКЭ и ВПОВ, т.к. данные вирусы эндемичны на территории России. У двух обезьян были обнаружены НАТ: у обезьяны №6 в титре 1,84 Ig к ВЗН и у обезьяны №2 в титре 1,81 Ig к ВЗН и 1,86 Ig к ВКЭ. При рандомизации согласно случайным числам, обезьяна №6 попала в контрольную группу невакцинированных незараженных обезьян, а обезьяна №2 попала в группу зараженных ВКЭ обезьян.

При помощи разработанной методики ИФА IgG антитела к белкам sE, dI+II и dIII были обнаружены в сыворотках некоторых обезьян, в которых были высокие титры НАТ. Стоит отметить, что НАТ, определяемые в РН, включают как IgG, так и IgM антитела, которые преимущественно образуются на первых этапах инфекции, тогда как в ИФА измеряли только IgG антитела. В группе инфицированных ВКЭ обезьян, на 7 и 10-14 сутки после заражения антитела были обнаружены в ИФА ко всем исследуемым рекомбинантным белкам в равных количествах только у обезьяны №2, у которой уже имелись НАТ к ВКЭ или другому ортофлавивирусу до заражения. В группе вакцинированных («Клещ-Э-Вак») обезьян на 13 день после иммунизации второй дозой вакцины, антитела к ВКЭ наблюдались у всех исследуемых обезьян. В контрольной группе антитела к ВКЭ не обнаруживались (Таблица 11).

Таблица 11 – Титры НАТ к ВКЭ и антител, выявленных в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII в сыворотках обезьян, зараженных ВКЭ либо вакцинированных вакциной КЭ

Группа	День после инфекции/вакцинации	Обезьяны	Анти-ВКЭ НАТ, Ig	Антитела против dIII в ИФА, Ig	Антитела против sE в ИФА, Ig	Антитела против dI+II в ИФА, Ig
ВКЭ	7	1	2,35	0	0	0
		2	4,49	3,98	3,9	3,93
		3	1,8	0	0	0
	10-14	1	3,23	0	0	0
		2	4,4	4,1	4,07	4,68
		3	1,84	0	0	0
ВКЭ вакцинированные	13	4	2,40	3,49	3,33	3,42
		5	2,70	3,75	3,3	3,53
Невакцинированные и незараженные	0	6	0	0	0	0
		7	0	0	0	0

В отличие от мышинных и кроличьих сывороток при тестировании сывороток обезьян как после заражения ВКЭ, так и после иммунизации вакциной КЭ, рекомбинантный белок dI+II в ИФА тест-системе позволял также эффективно выявлять антитела к ВКЭ, как и sE и dIII. Антитела ко всем рекомбинантным белкам выявлялись примерно в равных количествах [248].

3.4.6 Выявление антител против вируса клещевого энцефалита в сыворотках крови обезьян после инфекции вирусом Повассан и после иммунизации вакциной против клещевого энцефалита с последующим заражением вирусом Повассан

В исследование входили две группы животных: обезьяны, зараженные ВПОВ и обезьяны, иммунизированные двукратно вакциной против ВКЭ, зараженные ВПОВ через 14 дней после последней иммунизации (Рисунок 37).

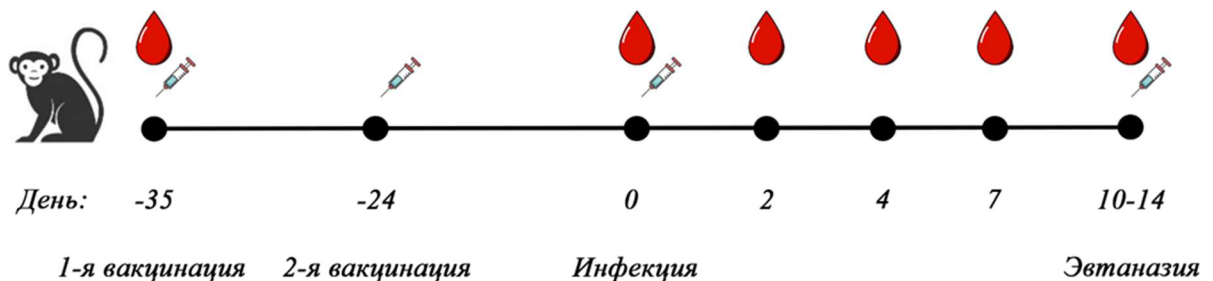


Рисунок 37 – Схема эксперимента по заражению обезьян ВПОВ с предварительной иммунизацией вакциной КЭ и без неё. Красными каплями на графике указаны дни сбора материала

В группе, инфицированной только ВПОВ без вакцинации, антитела к рекомбинантным белкам не были обнаружены, несмотря на наличие перекрестно реагирующих НАТ к ВКЭ (Таблица 12). Стоит отметить, что перекрестные НАТ после заражения ВПОВ к ВКЭ обнаруживались в достаточно низких титрах, что могло повлиять на эффективность их обнаружения. Тем не менее в наших экспериментах мышинные ИАЖ, полученные к ВПОВ, также показали отрицательный результат с разработанной ИФА тест системой на основе исследуемых рекомбинантных белков, что дает дополнительное подтверждение о ее специфичности [194]. В группе двукратно иммунизированных вакциной КЭ обезьян после заражения ВПОВ антитела эффективно выявлялись в ИФА с использованием всех трёх рекомбинантных белков во всех временных точках, за исключением второго дня после инфицирования. При этом титры перекрестно-реактивных антител к ВКЭ значительно выросли к 10 суткам после заражения ВПОВ вакцинированных животных.

При тестировании сывороток крови обезьян все три рекомбинантных белка (sE, dI+II, dIII) эффективно выявляли антитела к ВКЭ, в отличие от мышинных и кроличьих сывороток [248].

Таблица 12 – Титры анти-ВКЭ НАТ и антител, выявленных в ИФА тест-системе на основе белков sE, dI+II и dIII в сыворотках обезьян, зараженных вирусом Повассан с иммунизацией вакциной КЭ и без неё [248]

Группа	День после инфекции	Обезьяны	Анти-ВКЭ НАТ, lg	Антитела против dIII, lg	Антитела против sE, lg	Антитела против dI+II, lg
ВПОВ	7	8	1,3	0	0	0
		9	1,8	0	0	0
		10	н/т	0	0	0
Вакцинированные против ВКЭ + ВПОВ	2	4	2,40	0	0	0
		5	2,57	3,85	3,55	4,77
	4	4	2,98	4,02	4,02	4,41
		5	2,31	4,08	3,84	3,6
	7	4	3,04	4,92	4,84	5,58
		5	2,95	5,33	4,95	4,62
	10-14	4	4,17	4,45	4,6	4,87
		5	5,30	5,55	5,01	7,82
Отрицательные	0	6	0	0	0	0
		7	0	0	0	0

«н/т» – не тестировали

3.4.7 Исследование клинического материала от людей в иммуноферментном анализе на основе рекомбинантных белков

В России встречаются все подтипы ВКЭ, из них Европейский, Сибирский и Дальневосточный отвечают за большинство случаев заражения, в то время как Байкальские варианты вируса имеют более ограниченный ареал (Рисунок 38).

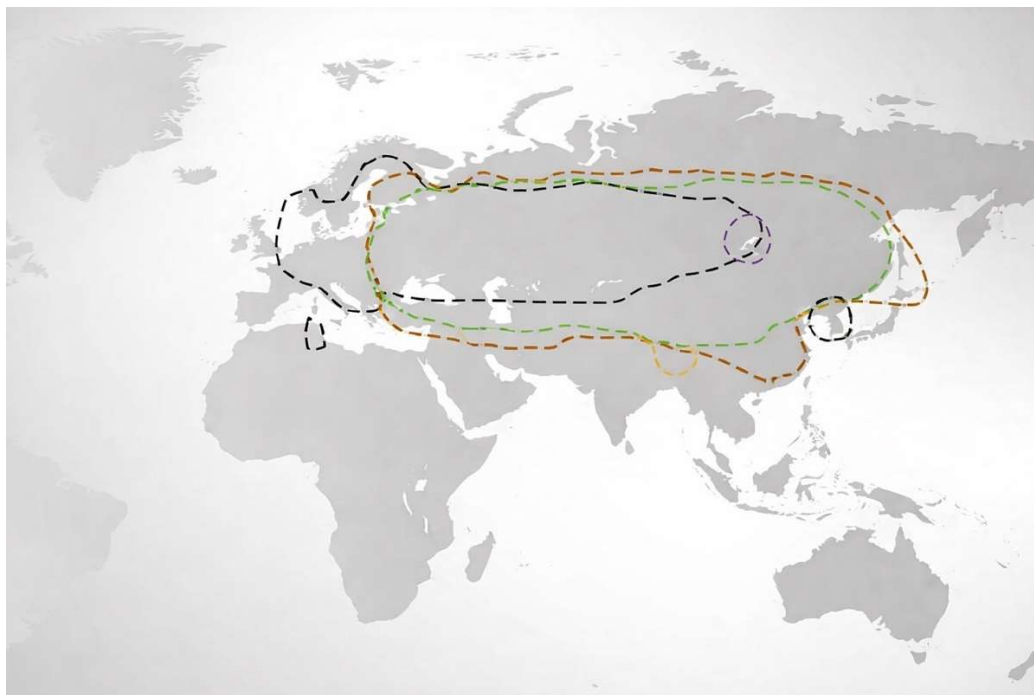


Рисунок 38 – Карта мира. Разными цветами отмечено распространение различных подтипов ВКЭ. Европейский (черная линия), сибирский (коричневая линия) и дальневосточный (зеленая линия), байкальские (фиолетовая линия) и гималайский (золотая линия). (Адаптировано по: Worku D.A. и др., 2023 [283])

Для оценки эффективности полученных рекомбинантных белков в качестве антигенов для ИФА при исследовании сывороток человека использовали несколько наборов сывороток пациентов с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом КЭ из разных регионов России (Рисунок 39). Сыворотки были получены от пациентов на разных стадиях заболевания КЭ и в отдаленные сроки после перенесенного заболевания (от 4 дней до более чем года) и подробно описаны в разделе Материалы и методы.



Рисунок 39 – Карта России, на которой отмечены регионы откуда поступили материалы от пациентов с диагнозами КЭ или ЛЗН, сыворотки которых были проанализированы в работе. Указаны регионы без четких координат и границ распространения вируса

В первом наборе проб от пациентов из ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» шесть из семи сывороток от пациентов с диагнозом КЭ были положительными в ИФА с белками sE, и dIII и три из семи сывороток с белком dI+II. Ввиду низкой эффективности выявления антител к ВКЭ в ИФА на основе белка dI+II в дальнейших исследованиях человеческих сывороток его не использовали. Одна из сывороток оказалась отрицательной в нашей тест-системе на основе белков sE, и dIII при выявлении IgG антител против ВКЭ, поэтому она была дополнительно протестирована в РН против штамма ВКЭ MOS-152-N-2017, относящегося к европейскому подтипу, т.к. пациент был заражен на территории Европейской части Российской Федерации. Титр составлял 2,01 lg НАТ.

Второй набор сывороток пациентов с диагнозом КЭ был взят из ретроспективного анализа за 20 лет. Все сыворотки были положительными в ИФА с использованием белка sE. Только 11 из 26 сывороток были положительными в ИФА с белком dIII.

Все сыворотки из третьего набора, полученные от пациентов с диагнозом КЭ, поступивших в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 2017 по 2023 год, были положительными в исследуемой тест-системе на основе рекомбинантного белка sE (20/20). При использовании рекомбинантного белка dIII положительными были 18 из 20 сывороток (Таблица 13).

Таблица 13 – Эффективность выявления анти-ВКЭ антител в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII в сыворотках пациентов с диагнозом КЭ

Номер набора	Количество сывороток, <i>n</i>	ИФА (sE) С+/n	ИФА (dIII) С+/n
1	7	6/7	6/7
2	26	26/26	11/26
3	20	20/20	18/20

С+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

В общей сложности было исследовано 53 человеческие сыворотки, полученные от людей с подтвержденным диагнозом КЭ. В лабораторном варианте ИФА на основе рекомбинантного белка sE, при тестировании человеческих сывороток, эффективность выявления анти-ВКЭ антител составила 98% (52/53). При использовании в ИФА рекомбинантного белка dIII эффективность выявления анти-ВКЭ антител составила 66% (35/53). Рекомбинантный белок dI+II, который использовали только при анализе первого набора сывороток, показал самую низкую эффективность 42% (3/7).

3.5 Изучение взаимодействия рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII с антителами к другим ортофлавивирусам в иммуноферментном анализе

3.5.1 Анализ мышинных гипериммунных асцитных жидкостей, содержащих антитела к различным ортофлавивирусам

ИАЖ мышей, полученные в рамках данной работы, содержащие антитела против различных ортофлавивирусов: ВПОВ, ВОГЛ, вируса Лангат и ВЗН – были протестированы в РН против соответствующего вируса. Несмотря на наличие высоких титров нейтрализующих антител (>2,2 lg), все исследуемые ИАЖ, за исключением ИАЖ к штамму Абсеттаров ВКЭ, показали отрицательный результат в ИФА тест-системе на основе рекомбинантных белков sE и dIII, а также с белком dI+II (Таблица 14) [235].

Таблица 14 – Исследование мышинных сывороток, содержащих антитела против различных ортофлавивирусов, в РН и в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII

Вирус / штамм	Титр НАТ против соответствующего вируса, Ig(НАТ)	ИФА (sE)	ИФА (dI+II)	ИФА (dIII)
ВКЭ / Absettarov	2,95	+	–	+
ВПОВ / Pow-24	>3,4 *	–	–	–
ВОГЛ / Nikitina	2,2	–	–	–
Вирус Лангат / TP-21 (Elantsev)	2,5**	–	–	–
ВЗН / B958	2,3	–	–	–

* – Разброс значений для РН 50% бляшек с контрольной сывороткой для ВКЭ находится в пределах SD=0,18 (n = 10);

** – Значение титра в РН 50% бляшек против ВОГЛ; «–» - антитела не выявлялись

Таким образом, были протестированы сыворотки мышей, содержащие антитела к различным ортофлавивирусам, циркулирующим на территории РФ, таким как ВЗН, ВПОВ, ВОГЛ и вирус Лангат. Разработанная ИФА тест-система на основе рекомбинантных белков dIII и sE показала 100% специфичность при анализе антител к ВКЭ и не выявляла антитела к другим исследуемым ортофлавивирусам. Рекомбинантный белок dI+II также не сработал ни с одной мышинной сывороткой [194].

3.5.2 Исследование специфичности полученных рекомбинантных белков в иммуноферментном анализе с использованием сывороток людей

Специфическая диагностика заболеваний, вызванных ортофлавивирусами, важна как для совместно циркулирующих вирусов, так и для географически и филогенетически отдаленных вирусов в условиях активного и развивающегося туризма. Поэтому было важно протестировать исследуемые рекомбинантные белки с сыворотками людей, содержащими антитела к различным ортофлавивирусам, близким или отдаленно родственным ВКЭ. Специфичность выявления антител к ВКЭ разработанной тест-системы ИФА на основе рекомбинантных белков sE и dIII была показана с использованием пула человеческих сывороток (56 сывороток) с клинически и лабораторно подтвержденными инфекциями ЯЭ, Зика, ЛЗН, ЖЛ и лихорадки денге (первый набор) и содержащими антитела к одному или сразу к нескольким ортофлави- (ВЖЛ и вирус Зика) или альфавирусам (вирус Чукунгунья) (четвертый набор) (Рисунок 40). Последние были взяты в анализ для оценки возможного неспецифического связывания на фоне другой арбовирусной инфекции [235].



Рисунок 40 – Карта мира с указанием регионов, где предположительно произошло заражение пациентов ортофлавирусной инфекцией, чьи сыворотки были проанализированы в работе

При тестировании сывороток от пациентов с ортофлавирусными инфекциями (кроме КЭ), рекомбинантные белки sE и dIII обнаружили антитела в ИФА лишь в одном случае – у больного с диагнозом японский энцефалит (Таблица 15).

Таблица 15 – Исследование человеческих сывороток, содержащих антитела против других ортофлавирусов в ИФА на основе белков sE, dI+II и dIII

Номер набора	Диагноз	Количество сывороток, <i>n</i>	ИФА (sE) С+/n	ИФА (dIII) С+/n
1	ЯЭ*	1	1/1	1/1
	Лихорадка Зика	2	0/2	0/2
	ЛЗН	6	0/6	0/1
	Лихорадка денге	6	0/6	0/6
4	ЖЛ	5	0/5	0/5
	ЖЛ + Зика	1	0/1	0/1
	Чикунгунья + ЖЛ	5	0/5	0/5
	Чикунгунья + Зика	3	0/3	0/3
	Чикунгунья	3	0/3	0/3

* – Пациент был ранее иммунизирован вакциной против КЭ;

С+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

При более подробном изучении истории болезни в анамнезе данного пациента выявилось, что он ранее был вакцинирован от КЭ и посещал эндемичные по КЭ территории, что, судя по всему, послужило причиной выявления анти-ВКЭ антител. Данный случай был описан в отчете врачей [284]. Сыворотка пациента с ЯЭ была дополнительно протестирована на наличие НАТ против ВЯЭ и ВКЭ. Было установлено, что титр НАТ в сыворотке пациента против ВКЭ штамма MOS-152-N-2017 европейского подтипа составил 2,11 lg. В то же время, титр НАТ против ВЯЭ был – 2,8 lg. Эти данные свидетельствуют о выраженной перекрестной реактивности антител к

ВКЭ в исследуемом образце сыворотки, что объясняет почему исследуемая сыворотка была положительна в ИФА с антигенами sE и dIII [235]. Однако для исключения возможности перекрестной реакции антител к ВЯЭ с исследуемыми рекомбинантными белками необходимо более масштабное тестирование сывороток, содержащих только антитела к ВЯЭ.

Таким образом, результаты свидетельствуют о 100% специфичности тест-системы ИФА на основе рекомбинантных белков sE и dIII. Оценить специфичность рекомбинантного белка dI+II не представилось возможным ввиду его низкой эффективности.

3.5.3 Влияние последующей вакцинации против вируса желтой лихорадки на обнаружение антител против вируса клещевого энцефалита у людей

Известно, что предшествующая вакцинация против одного ортофлавивируса может повлиять на иммунный ответ при заражении другим ортофлавивирусом, в том числе на спектр антител, образующихся в ответ на инфекцию [285; 286]. Ежегодно в мире регистрируется около 200 тысяч случаев заражения людей ВЖЛ. При этом, в случае развития тяжелой формы заболевания, летальность достигает почти пятидесяти процентов [287; 288]. В связи с этим в 2023 году в рамках стратегии ВОЗ по ликвидации эпидемий ЖЛ вакцинацию прошли почти 62 миллиона реципиентов [289; 290]. Вакцинация против ЖЛ довольно распространена в РФ в связи с массовым туризмом в страны, эндемичные по этому заболеванию. Поэтому мы оценили эффективность выявления анти-ВКЭ антител в ИФА с использованием рекомбинантных белков sE, dI+II и dIII в сыворотках людей, вакцинированных и не вакцинированных против КЭ, которые дополнительно были вакцинированы против ВЖЛ (Рисунок 41).

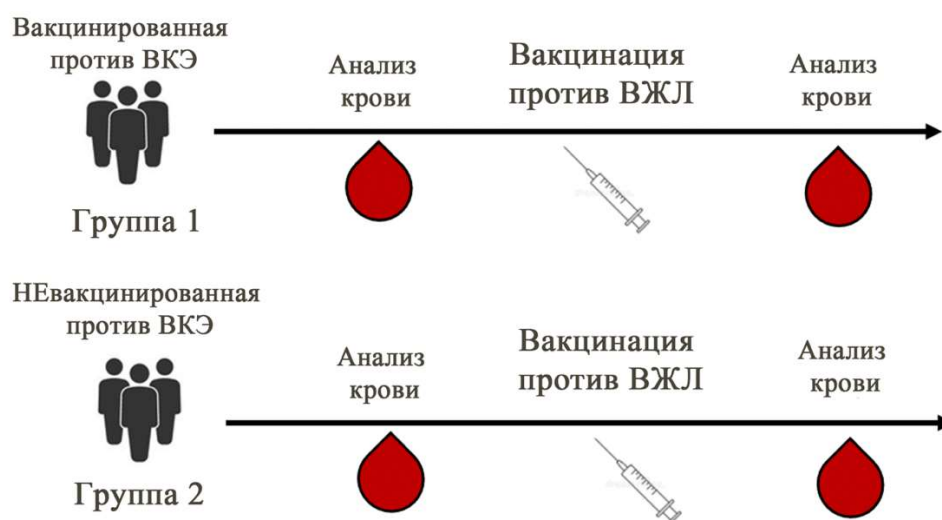


Рисунок 41 – Схема эксперимента по влиянию вакцинации против ЖЛ на обнаружение анти-ВКЭ антител в сыворотке крови людей, предварительно иммунизированных вакциной КЭ

Все сыворотки людей, вакцинированных против ВКЭ до и после вакцинации против ВЖЛ (штамм 17D) (пятый набор сывороток), были положительны в разработанной ИФА тест-системе на основе рекомбинантных белков sE и dIII. При использовании в ИФА рекомбинантного белка dI+II анти-ВКЭ антитела выявлялись только у 5 из 8 пациентов, вне зависимости от иммунизации вакциной против ВЖЛ. Сыворотки людей, не вакцинированных против ВКЭ, были отрицательными как до, так и после введения вакцины против ВЖЛ (Таблица 16).

Таблица 16 – Исследование сывороток людей, иммунизированных и неиммунизированных вакциной КЭ на фоне дополнительной иммунизации вакциной против ВЖЛ в ИФА на основе рекомбинантных белков sE, dIII и dI+II

Группа	Вакцинация против ВКЭ	Вакцинация против ВЖЛ	Количество образцов	ИФА (sE) C+/n	ИФА (dI+II) C+/n	ИФА (dIII) C+/n
Группа 1 до вакцинации от ВЖЛ	+	–	8	8/8	5/8	8/8
Группа 2 до вакцинации от ВЖЛ	–	–	6	0/6	0/6	0/6
Группа 1 после вакцинации от ВЖЛ	+	+	8	8/8	5/8	8/8
Группа 2 после вакцинации от ВЖЛ	–	+	6	0/6	0/6	0/6

C+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

Таким образом, вакцинация против ВЖЛ не повлияла на выявление антител к ВКЭ, выработанных после иммунизации вакциной КЭ, при их исследовании в ИФА на основе рекомбинантных белков sE и dIII. Рекомбинантный белок dI+II показал более низкую чувствительность при выявлении анти-ВКЭ антител в сыворотках крови людей [235].

3.5.4 Специфичность выявления антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках крови условно здоровых людей, содержащих антитела к вирусу Западного Нила

ИФА широко используется для оценки уровня популяционного иммунитета. Перекрестная реактивность антител к ВКЭ и ВЗН является одной из важных проблем при серодиагностике нейроинфекций, особенно на территориях, где вирусы циркулируют одновременно [135]. В работе были исследованы 10 образцов сывороток крови условно здоровых людей из Московской области (шестой набор), которые, по данным Центра гигиены и эпидемиологии Московской области, были положительными на анти-ВКЭ IgG антитела в коммерческом наборе для ИФА (ВектоВКЭ-IgG) [282]. Образцы были протестированы в РН и имели титры НАТ как к штамму ВКЭ MOS-152-N-2017, изолированному в Москве в 2017 году,

принадлежащему к европейскому подтипу, так и к ВЗН штамму Нр-90, принадлежащему к первой линии. Титр НАТ к ВКЭ был выше, чем к ВЗН, только в сыворотке № 10 (Таблица 17).

Таблица 17 – Титры НАТ к ВКЭ и ВЗН в сыворотках условно здоровых людей из Московской области

Номер сыворотки	титр НАТ против ВКЭ, lg(НАТ)	титр НАТ против ВЗН, lg(НАТ)
1	1.5 *	2.3
2	<1 **	1.9
3	<1	>2.2
4	<1	1.8
5	<1	2.7
6	<1	>2.8
7	<1	2
8	1.8	2.2
9	<1	1.9
10	>2.2	1.6

* – Разброс значений в реакции нейтрализации 50% бляшек с контрольной сывороткой для ВКЭ находится в пределах SD=0,18 (n = 10);

** – Значение находится ниже порога чувствительности метода

Все сыворотки были использованы для исследования в разработанной диагностической методике ИФА на основе белков sE и dIII. В ИФА на основе рекомбинантного белка sE в качестве антигена антитела к ВКЭ выявлялись только при тестировании сыворотки №10 (Рисунок 42). Однако при использовании в качестве антигенов в ИФА рекомбинантных белков dI+II и dIII с этой же сывороткой результат был отрицательным. Остальные сыворотки были отрицательны при исследовании в ИФА с антигенами sE, dI+II и dIII, что свидетельствует о высокой специфичности ИФА тест-системы при выявлении антител к ВКЭ в сыворотках людей, содержащих антитела к ВЗН [235].

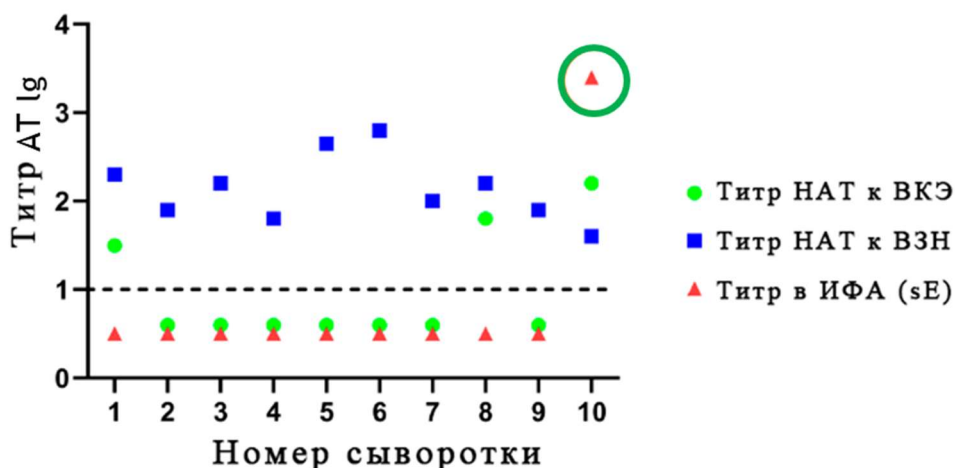


Рисунок 42 – Титры антител в сыворотках условно здоровых людей в РН против ВКЭ и ВЗН и в ИФА с белком sE

Это подтверждает, что полученный рекомбинантный белок sE может быть использован в качестве антигена в ИФА для эффективной специфической диагностики ВКЭ, что особенно важно в районах, где наблюдается совместная ко-циркуляция ВКЭ и ВЗН [5; 135; 291].

3.6 Сравнение разработанной методики иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков с коммерческими тест-системами на основе иммуноферментного анализа

Эффективность и специфичность ИФА тест-системы на основе рекомбинантных белков sE и dIII сравнивали с лицензированными коммерческими тест-системами: российским набором «Вектор-Бест» и немецким набором «Euroimmun». Эти наборы используются для рутинной диагностики КЭ в клинической практике.

Для тестирования были взяты 22 сыворотки крови людей из набора №1 с клинически подтвержденными диагнозами ортофлавирусных инфекций: КЭ, ЯЭ, ЛЗН, лихорадка Зика и лихорадка денге.

Как описано ранее, для количественного определения антител в разработанной ИФА тест-системе на основе рекомбинантных белков sE и dIII использовали контрольную сыворотку человека, вакцинированного дважды вакциной Клец-Э-Вак (Россия). Сыворотку брали в 6 разведениях, начиная с 1:50 с кратностью 4, после чего на основании данных полученной оптической плотности (OD) строили калибровочную кривую. При помощи уравнения линейной зависимости рассчитывали титры исследуемых сывороток (Рисунок 43).

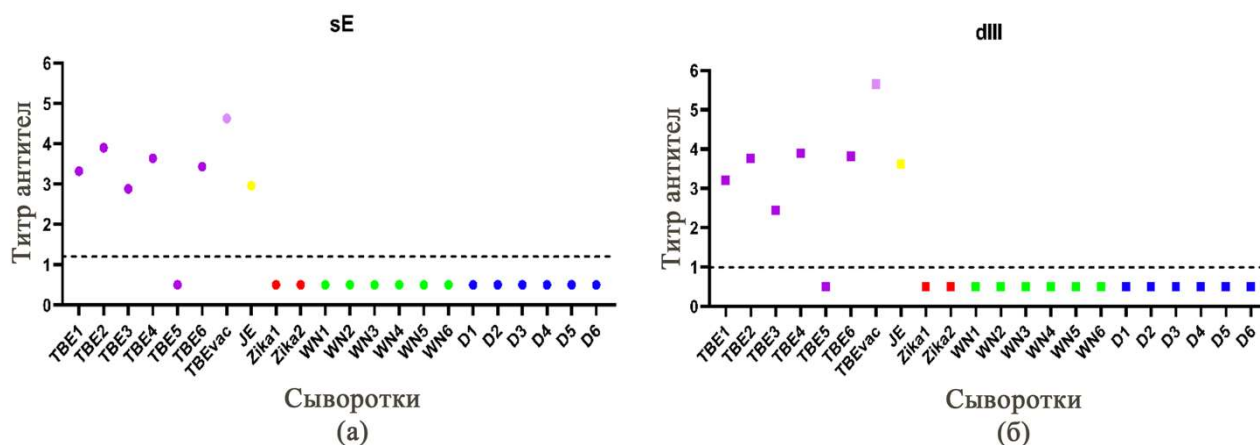


Рисунок 43 – Титры антител в исследуемых сыворотках, определенные с помощью ИФА с использованием в качестве антигена (а) белка sE и (б) белка dIII. Цветами указаны титры сывороток пациентов с диагнозами: фиолетовый – КЭ, светло-фиолетовый – условно здоровый реципиент иммунизированный вакцинированный против КЭ, желтый – ЯЭ, красный – лихорадка Зика, зеленый – ЛЗН, синий – лихорадка денге

Кроме того, часть сывороток из набора №1 была протестирована в коммерческих ИФА наборах (Таблица 18).

Таблица 18 – Исследование человеческих сывороток, содержащих АТ к различным ортофлавивирусам в коммерческих наборах ИФА и некоммерческой ИФА тест-системе на основе рекомбинантных белков sE и dIII

Диагноз	ИФА (sE и dIII) C+/n	Euroimmun C+/n	Вектор-Бест C+/n
ЯЭ *	1/1	1/1	1/1
КЭ	4/5	4/5	5/5
Лихорадка Зика	0/1	0/1	0/1
Лихорадка денге	0/5	2/5	2/5
ЛЗН	0/5	1/5	1/5

* – Пациент был ранее иммунизирован вакциной против КЭ;

C+/n – количество положительных сывороток / общее количество исследуемых сывороток

Рекомбинантные белки sE и dIII показали схожие результаты при тестировании сывороток. Их эффективность составила 80% (4/5) при выявлении анти-ВКЭ-антител в сыворотках людей, а специфичность 92% (11/12), учитывая описанную ранее сыворотку пациента с ЯЭ, имеющую титр НАТ 2,11 lg к ВКЭ [284]. Для коммерческого набора Euroimmun (Германия) эффективность составила 80% (4/5), а специфичность 67% (8/12). Для коммерческого набора Вектор-Бест эффективность составила 100% (5/5), а специфичность 67% (8/12) (Рисунок 43 и Таблица 18). Таким образом, использование рекомбинантных белков в ИФА тест-системе

значительно повысило её специфичность для выявления антител к ВКЭ в сравнении с коммерческими наборами, основанными на иммобилизации цельвирионного антигена. При этом использование sE белка в качестве антигена не снижало эффективность выявления, однако использование только dIII или dI+II значительно снижало эффективность выявления анти-ВКЭ-антител в ИФА.

Специфичность и чувствительность полученных рекомбинантных белков при их использовании в качестве антигенов в ИФА могут при соответствующей доработке обеспечить более точную диагностику КЭ. Это особенно важно для диагностики заболеваний со сходными с КЭ клиническими проявлениями, а также ввиду серологической перекрестной реактивности ортофлавивирусов [292]. Таким образом, полученные рекомбинантные белки штамма Сухар ВКЭ могут быть использованы в качестве платформы для специфической и эффективной тест-системы ИФА.

Заключение

Диссертация посвящена препаративному получению рекомбинантных белков dI+II, dIII, sE ВКЭ штамма Сухар и sE штамма Софьин в бактериальной системе экспрессии *E. coli* и оценке их диагностического потенциала в ИФА для выявления антител к ВКЭ. Изучена чувствительность и специфичность диагностической методики ИФА, проведено сравнение с существующими ИФА тест-системами на основе цельновирионного антигена ВКЭ.

Для получения рекомбинантных белков был выбран ранее неисследованный штамм Сухар, относящийся к сибирскому подтипу ВКЭ [194]. В качестве антигенов для лабораторной ИФА тест-системы были отобраны: слитый домен dI+II, так как в нем находится большая часть общих внутриродовых эпитопов; домен dIII, в связи с тем, что он несет в себе большинство вирусоспецифических эпитопов; домен sE, как целый поверхностный вирусный антиген.

Для получения рекомбинантных белков подбирали и оптимизировали условия их выделения в бактериальной системе экспрессии. На первом этапе, используя стандартный режим культивирования бактерий (18 часов при 37°C), была подобрана оптимальная питательная среда для культивирования. Наибольшую экспрессию рекомбинантного белка sE наблюдали при использовании среды ТВ.

Поскольку исследуемые рекомбинантные белки синтезировали в виде телец включения, на следующем этапе работы проводили подбор концентрации мочевины для буфера солиubilизации. Далее были подобраны оптимальные условия по выделению белков при помощи аффинной хроматографии (последовательные смывы белка с колонки при повышении концентрации имидазола) и обессоливания на колонках. Концентрация выделенных и очищенных рекомбинантных белков варьировалась от 3,1 до 7,8 мг с литра культуры. При постановке иммуноблота и ИФА было показано, что полученные белки сохранили способность связываться с антителами к ВКЭ.

Белок sE штамма Софьин был получен в количестве 0,8 мг при использовании условий, аналогичных условиям получения белка sE штамма Сухар, что достаточно для его применения в качестве антигена в иммунологических реакциях. Однако, при сравнении способности связываться с антителами к ВКЭ в ИФА белок sE штамма Софьин показал более низкую оптическую плотность (OD₄₅₀), чем белок sE штамма Сухар.

Для изучения эффективности и специфичности диагностической методики ИФА на основе полученных белков в работе были использованы сыворотки мышей, кроликов и людей, содержащие антитела к ВКЭ и другим ортофлавивирусам. Все исследуемые мышинные и кроличьи сыворотки, полученные против штаммов ВКЭ, принадлежащих к различным подтипам, были положительны в ИФА с белками sE и dIII. Таким образом, диагностическая методика ИФА

на основе белков sE и dIII показала широкий спектр выявления антител к ВКЭ. Разработанная ИФА тест-система на основе белка sE и dIII показала высокую специфичность при тестировании сывороток лабораторных животных, позволяя дифференцировать сыворотки, содержащие антитела к ВКЭ, от сывороток с антителами к другим ортофлавивирусам. Суммарно было протестировано 20 сывороток мышей и кроликов, предварительно иммунизированных ВКЭ и ортофлавивирусами ВПОВ, ВОГЛ, вирусом Лангат и ВЗН. Во всех сыворотках, содержащих антитела к широкому спектру штаммов ВКЭ, были выявлены анти-ВКЭ антитела (16/16). В сыворотках, содержащих антитела к другим ортофлавивирусам, не было выявлено ложноположительных результатов (0/4) при тестировании белков sE и dIII. При тестировании сывороток лабораторных животных рекомбинантный белок dI+II не сработал ни с одной мышью или кроличьей сывороткой. Также были протестированы сыворотки мышей, взятые на разные сроки при экспериментальной инфекции ВКЭ и после иммунизации вакциной КЭ. Сыворотки, взятые на ранней стадии инфекции, были протестированы на наличие не только IgG, но и IgM антител. При отсутствии IgG антител в тест-системе безошибочно выявлялись анти-ВКЭ-IgM антитела, что соответствует ранней стадии инфекции. Стоит отметить, что эффективность выявления анти-ВКЭ IgG антител с помощью рекомбинантного белка sE была выше, чем при использовании белка dIII, особенно при анализе сывороток вакцинированных животных.

Чувствительность выявления антител к ВКЭ зависела от объекта исследования. В сыворотках мышей антитела выявлялись в ИФА на основе рекомбинантных белков sE и dIII даже при низких титрах НАТ, тогда как в сыворотках людей и обезьян антитела в ИФА выявлялись при титрах НАТ выше 2lg. Поскольку в РН детектируются только нейтрализующие антитела, а ИФА выявляет общий пул IgG антител к вирусу [293], наблюдаемые различия, по-видимому, обусловлены неодинаковым соотношением общих и нейтрализующих антител в исследуемых образцах.

Суммарно было протестировано 53 сыворотки крови от пациентов с подтверждённым диагнозом КЭ. В лабораторном варианте ИФА на основе рекомбинантного белка sE эффективность выявления антител к ВКЭ составила 98% (52/53). При использовании рекомбинантного белка dIII эффективность выявления антител была ниже – 66% (35/53). При тестировании белка dI+II данный показатель был минимальным и составил 42% (3/7). Таким образом, белок sE продемонстрировал лучший результат при его использовании в качестве антигена для постановки диагностического ИФА при выявлении антител к ВКЭ в сыворотках крови людей, не теряя при этом в специфичности.

Известно, что нейтрализующие эпитопы присутствуют во всех доменах белка E ВКЭ. Однако большинство видоспецифичных эпитопов расположены в домене dIII, в то время как

домены dI+II более консервативны и, следовательно, содержат больше перекрестно-реактивных эпитопов [92; 294]. Ранее было показано, что в иммунных сыворотках людей с острой формой КЭ, присутствуют антитела к dI+II [211]. В исследованиях было показано, что при экспериментальной инфекции на мышинной модели значительная часть антител, образующихся при заражении ВКЭ, направлена против домена III белка E [295]. В нашем исследовании рекомбинантный белок dI+II не прореагировал с антителами ни одной из иммунных к ВКЭ мышинных или кроличьих сывороток. Однако при использовании материала от обезьян *Macaca fascicularis*, которые являются более близкой к человеку животной моделью, было продемонстрировано наличие антител к доменам dI+II после заражения ВКЭ или иммунизации вакциной КЭ. При этом анти-ВКЭ-антитела к рекомбинантным белкам dIII и sE в сыворотках, инфицированных ВКЭ обезьян и вакцинированных от КЭ животных, в последствии зараженных ВПОВ, выявлялись наравне с антителами к доменам dI+II. При исследовании человеческих сывороток рекомбинантный белок dI+II не всегда был информативен, поэтому использовался только при исследовании ограниченного набора сывороток. Полученные результаты указывают на некоторое сходство в спектре антител человека и макака. Наши результаты показывают, что sE захватывает больший спектр IgG антител, чем dIII или dI+II, при этом обладая сходной специфичностью. Однако при выявлении IgM-антител в сыворотках мышей на 7-й день после экспериментального заражения вирусом, белок dIII продемонстрировал более высокую эффективность по сравнению с sE. Данный факт обуславливает необходимость дополнительной оптимизации условий ИФА для детекции антител класса IgM. Таким образом, антитела к dI+II выявлялись в сыворотках обезьян и человека нерегулярно, их уровень не определялся в сыворотках мышей и кроликов, а использование белков sE и dIII позволяло выявить антитела к ВКЭ в разных организмах с высокой эффективностью.

Описанные ранее ИФА тест-системы на основе рекомбинантных белков были недостаточно проверены на специфичность относительно других ортофлавириусов [270–272]. В данной работе были проведены исследования с использованием сывороток мышей и людей, содержащих антитела к различным ортофлавириусам: ВЗН, Лангат, ДЕНВ, ВПОВ, ВЖЛ, Зика, ВЯЭ, а также альфавируса Чикунгунья. Кроме того, были исследованы сыворотки людей со смешанными инфекциями, в которых не были выявлены анти-ВКЭ-антитела.

Повышение специфичности при разработке ИФА тест-систем чаще всего сопровождается сужением спектра выявляемых антител. В описанных результатах работы использовался широкий набор штаммов ВКЭ, относящихся к разным подтипам, таким как европейский, дальневосточный, сибирский, байкальский-1, байкальский-2. При исследовании ИФА тест-системы на основе рекомбинантных белков dI+II, dIII, sE использовали сыворотки людей с

диагнозом КЭ из разных регионов России, взятые на разные сроки инфекции, а также использовали пул сывороток из ретроспективных анализов.

ИФА тест-система на основе белка sE ВКЭ штамма Сухар показала самую высокую эффективность выявления антител против ВКЭ при тестировании сывороток мышей, кроликов, обезьян и людей, при этом не проявляя неспецифического связывания с антителами к другим ортофлавивирусам.

Выводы

1. Получены рекомбинантные белки (sE, dI+II, dIII) штамма Сухар сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита. Подобраны оптимальные условия для экспрессии соответствующих генов, солюбилизации, выделения и рефолдинга белков. Разработана диагностическая методика иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита на основе полученных рекомбинантных белков.

2. Диагностическая методика иммуноферментного анализа на основе рекомбинантных белков sE и dIII вируса клещевого энцефалита штамма Сухар обладает высокой чувствительностью: выявляет антитела в сыворотках лабораторных животных к 17 штаммам, относящимся к 5 подтипам вируса клещевого энцефалита, изолированным в разное время из разных источников и регионов. При анализе человеческих сывороток диагностическая методика иммуноферментного анализа на основе белка sE обладает более высокой чувствительностью в сравнении с белками dI+II и dIII.

3. Доказана способность разработанной диагностической методики иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных белков sE и dIII дифференцировать антитела к вирусу клещевого энцефалита при анализе иммунных сывороток животных, содержащих антитела к вирусу клещевого энцефалита, вирусу Западного Нила, вирусу Лангат, вирусу Повассан, вирусу японского энцефалита, а также в сыворотках крови пациентов с диагнозами клещевой энцефалит, японский энцефалит, лихорадка Западного Нила, лихорадка Зика, лихорадка денге и реципиентов, вакцинированных против вируса клещевого энцефалита и вируса желтой лихорадки.

4. Выявление антител к домену dI+II, в котором представлена большая часть кросс-реактивных эпитопов, связанных с антителозависимым усилением инфекции ортофлавириусов, информативно при анализе сывороток людей и обезьян, но не может быть использовано при анализе сывороток лабораторных животных (кроликов и мышей).

Практические рекомендации

Для практического применения разработанной диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных доменов особое значение имеют условия получения антигенов, используемых в анализе. Экспрессия, выделение и последующая очистка белков должны обеспечивать достаточный выход и необходимую степень чистоты, поскольку именно эти параметры во многом определяют воспроизводимость и диагностическую ценность метода при исследовании различных сывороточных образцов.

При постановке ИФА также необходимо использование системы контроля качества, включающей внутренние и внешние контрольные образцы. Применение таких контролей позволяет отслеживать стабильность работы тест-системы и своевременно выявлять возможные отклонения, связанные с вариабельностью реагентов, условиями проведения анализа или техническими особенностями выполнения методики.

Полученная ИФА тест-система может быть использована для дифференциальной диагностики антител к ВКЭ от антител к другим ортофлавивирусам. Четкие инструкции по использованию системы поддерживают точность диагностики, что позволит эффективно использовать ее в клинической практике.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Для доведения разработанной диагностической методики ИФА до коммерческого продукта, необходим подбор условий для длительного хранения и стабилизации белков.

Требуются дополнительные исследования для выбора рекомбинантного антигена для выявления антител класса IgM. В дальнейшем возможно улучшение разработанной ИФА тест-системы за счёт анализа специфических сайтов связывания антител против ВКЭ с антигенными сайтами в рекомбинантных доменах. Требуются дополнительные исследования по специфичности диагностической методики ИФА с сыворотками лабораторных животных или пациентов, в которых содержатся антитела к ортофлавивирусам шотландского энцефалита овец (ШЭО) и Усугу.

Аналогичным образом изучение связывания перекрёстных сайтов в рекомбинантных доменах со специфическими для рода антителами в дальнейшем может позволить получить пан-ортофлавивирусную ИФА тест-систему для первичного анализа сывороток людей при сезонных заболеваниях невыясненной этиологии.

Также, с научно-фундаментальной точки зрения, перспективным направлением будет анализ состава антител в сыворотках крови людей и животных при иммунном ответе на инфекцию, для изучения патогенеза при КЭ. Также, направление по изучению спектра противовирусных антител в постинфекционный и поствакцинальный периоды для обеспечения эффективности и снижения риска АТЗУИ при использовании экстренных и профилактических препаратов против ВКЭ.

Благодарности

Посвящается моим родителям

Список сокращений и условных обозначений

АТЗУИ – антитело-зависимое усиление инфекции

АТФ – аденозинтрифосфат

БОЕ – бляшко-образующие единицы

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки

ВЗН – вирус Западного Нила

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

ВОГЛ – вирус омской геморрагической лихорадки

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ВПОВ – вирус Повассан

ВЯЭ – вирус японского энцефалита

ГИС – гипериммунная сыворотка

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДЕНВ – вирус денге

ДМЕМ – питательная среда Игла, модифицированная Дульбекко

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

ЖЛ – желтая лихорадка

ИАЖ – иммуноасцитная жидкость

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

кДа – килодальтоны

КЖ – культуральная жидкость

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

КЭ – клещевой энцефалит

ЛЗН – лихорадка Западного Нила

ЛПА – латерально – проточный анализ

НАТ – нейтрализующие антитела

нт – нуклеотид(ы)

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПААГ – полиакриламидный гель

пн – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РН – реакция нейтрализации 50% бляшек

РНК – рибонуклеиновая кислота

СМЖ – спинномозговая жидкость

СПЭВ – эмбриональные клетки почки свиньи

СЧ – субвирусные частицы

ТБС (ТБС-Т) – трис-боратный буфер (+Твин)

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид

УФ – ультрафиолет

ФБС – фетальной бычьей сыворотка

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЦНС – центральная нервная система

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЯЭ – японский энцефалит

6×His – гистидиновый тэг (состоит из 6 гистидинов)

dNTP – смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dTTP, dGTP и dCTP)

HRP – пероксидаза хрена

IFN – интерферон

IgM – иммуноглобулин M

IgG – иммуноглобулина G

IL – интерлейкин

RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза

prM – мембранный белок-предшественник

TNF – фактор некроза опухоли

Список литературы

1. Chiffi, G. Tick-borne encephalitis: A comprehensive review of the epidemiology, virology, and clinical picture / G. Chiffi, D. Grandgirard, S.L. Leib [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. – 2023. – Vol. 33. – № 5. – P. e2470. DOI: 10.1002/rmv.2470.
2. Růžek, D. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications / D. Růžek, G. Dobler, O.D. Mantke // *Travel Medicine and Infectious Disease*. – 2010. – Vol. 8. – № 4. – P. 223-232. DOI: 10.1016/j.tmaid.2010.06.004.
3. Бондаренко Т.Е. Особенности лихорадочных состояний при инфекционных заболеваниях, передающихся при укусах клещей / Бондаренко Т.Е., Хохлова З.А., Кудашева С.В. [и др.] // *Клиническая медицина*. – 2021. – Т. 99. – № 9–10. – С. 521-530.
4. Bogovic, P. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management / P. Bogovic // *World Journal of Clinical Cases*. – 2015. – Vol. 3. – № 5. – P. 430. DOI: 10.12998/wjcc.v3.i5.430.
5. Ruzek, D. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines / D. Ruzek, T. Avšič Županc, J. Borde [et al.] // *Antiviral Research*. – 2019. – Vol. 164. – P. 23-51. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.01.014.
6. Miazga, W. The long-term efficacy of tick-borne encephalitis vaccines available in Europe - a systematic review / W. Miazga, K. Wnuk, T. Tataro [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 621. DOI: 10.1186/s12879-023-08562-9.
7. Loew-Baselli, A. Safety and immunogenicity of the modified adult tick-borne encephalitis vaccine FSME-IMMUN®: Results of two large phase 3 clinical studies / A. Loew-Baselli, R. Konior, B.G. Pavlova [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – № 24. – P. 5256-5263. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.03.061.
8. Klockmann, U. Preclinical investigations of the safety, immunogenicity and efficacy of a purified, inactivated tick-borne encephalitis vaccine / U. Klockmann, H.L. Bock, V. Franke [et al.] // *Journal of Biological Standardization*. – 1989. – Vol. 17. – № 4. – P. 331-342. DOI: 10.1016/S0092-1157(89)80004-6.
9. Barrett, P.N. History of TBE vaccines / P.N. Barrett, S. Schober-Bendixen, H.J. Ehrlich // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – P. S41-S49. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00814-9.
10. Xing, Y. Tick-borne encephalitis in China: A review of epidemiology and vaccines / Y. Xing, H.-J. Schmitt, A. Arguedas, J. Yang // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 9. – P. 1227-1237. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.01.015.
11. Domnich, A. Immunogenicity against Far Eastern and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis (TBE) virus elicited by the currently available vaccines based on the European subtype:

- Systematic review and meta-analysis / A. Domnich, D. Panatto, E. Klementievna Arbuzova [и др.] // *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. – 2014. – Т. 10. – № 10. – С. 2819-2833. DOI: 10.4161/hv.29984.
12. Козлова Т.Ю. Анализ эффективности и безопасности вакцин для профилактики клещевого энцефалита / Козлова Т.Ю., Хантимирова Л.М., Рукавишников А.В., Шевцов В.А. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2018. – Т. 18. – № 1. – С. 33-41.
13. Kollaritsch, H. Vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis / H. Kollaritsch, M. Paulke-Korinek, H. Holzmann [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. – 2012. – Vol. 11. – № 9. – P. 1103-1119. DOI: 10.1586/erv.12.86.
14. Харит С.М. Результаты открытого рандомизированного сравнительного клинического исследования по оценке реактогенности, безопасности и иммуногенности вакцины ЭнцеВир у детей в возрасте от 3-х до 17 лет / Харит С.М., Рулева А.А., Фридман И.В. [и др.] // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2015. – Т. 14. – № 2. – С. 66-72.
15. Vorovitch, M.F. Comparison of the Immunogenicity and Safety of Two Pediatric TBE Vaccines Based on the Far Eastern and European Virus Subtypes / M.F. Vorovitch, G.B. Maikova, L.L. Chernokhaeva [et al.] // *Advances in Virology*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1-9. DOI: 10.1155/2019/5323428.
16. Andersson, C.R. Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis / C.R. Andersson, S. Vene, M. Insulander [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 16. – P. 2827-2831. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.02.001.
17. Щербинина М.С. Эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита / Щербинина М.С., Бархалева О.А., Дорохова О.С., Мовсесянц А.А. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2020. – Т. 20. – № 3. – С. 174-186.
18. Wilson, S.E. The role of seroepidemiology in the comprehensive surveillance of vaccine-preventable diseases / S.E. Wilson, S.L. Deeks, T.F. Hatchette, N.S. Crowcroft // *Canadian Medical Association Journal*. – 2012. – Vol. 184. – № 1. – P. E70-E76. DOI: 10.1503/cmaj.110506.
19. Phipps, L.P. JMM Profile: Tick-borne encephalitis virus: This article is part of the JMM Profiles collection. / L.P. Phipps, N. Johnson. – [Electronic resource] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2022. – Vol. 71. – № 5. – Mode of access: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001492> (date of access: 12.03.2025).
20. Schwaiger, M. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA / M. Schwaiger, P. Cassinotti // *Journal of Clinical Virology*. – 2003. – Vol. 27. – № 2. – P. 136-145. DOI: 10.1016/S1386-6532(02)00168-3.

21. Ackermann-Gäumann, R. Comparison of three commercial IgG and IgM ELISA kits for the detection of tick-borne encephalitis virus antibodies / R. Ackermann-Gäumann, M.-L. Tritten, M. Hassan, R. Lienhard // *Ticks and Tick-borne Diseases*. – 2018. – Vol. 9. – № 4. – P. 956-962. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.031.
22. Niedrig, M. Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies / M. Niedrig, D. Vaisviliene, A. Teichmann [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2001. – Vol. 20. – № 3. – P. 179-182. DOI: 10.1016/S1386-6532(00)00178-5.
23. Chan, K.R. Serological cross-reactivity among common flaviviruses / K.R. Chan, A.A. Ismail, G. Thergarajan [и др.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Т. 12. – С. 975398. DOI: 10.3389/fcimb.2022.975398.
24. Weissbach, F.H. Comparison of Two Commercial Tick-Borne Encephalitis Virus IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays / F.H. Weissbach, H.H. Hirsch // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2015. – Vol. 22. – № 7. – P. 754-760. DOI: 10.1128/CVI.00096-15.
25. Santos-Peral, A. Prior flavivirus immunity skews the yellow fever vaccine response to cross-reactive antibodies with potential to enhance dengue virus infection / A. Santos-Peral, F. Luppa, S. Goresch [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 1696. DOI: 10.1038/s41467-024-45806-x.
26. Trozzi, G. Comparison of Serological Methods for Tick-Borne Encephalitis Virus-Specific Antibody Detection in Wild Boar and Sheep: Impact of the Screening Approach on the Estimated Seroprevalence / G. Trozzi, N.R. Adadj, M. Vervaeke [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 459. DOI: 10.3390/v15020459.
27. Klaus, C. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera / C. Klaus, U. Ziegler, D. Kalthoff [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2014. – Vol. 10. – № 1. – P. 78. DOI: 10.1186/1746-6148-10-78.
28. Ackermann-Gäumann, R. Comparison of Four Commercial IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Tick-Borne Encephalitis Virus Antibodies / R. Ackermann-Gäumann, C. Eyer, S.L. Leib, C. Niederhauser // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2019. – Vol. 19. – № 5. – P. 358-364. DOI: 10.1089/vbz.2018.2359.
29. Orlinger, K.K. Construction and Mutagenesis of an Artificial Bicistronic Tick-Borne Encephalitis Virus Genome Reveals an Essential Function of the Second Transmembrane Region of Protein E in Flavivirus Assembly / K.K. Orlinger, V.M. Hoenninger, R.M. Kofler, C.W. Mandl // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 24. – P. 12197-12208. DOI: 10.1128/jvi.01540-06.
30. Inagaki, E. Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles / E. Inagaki, M. Sakai, M. Hirano [et al.] // *Ticks and Tick-borne Diseases*. – 2016. – Vol. 7. – № 5. – P. 723-729. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.002.

31. Obara, M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles / M. Obara, K. Yoshii, T. Kawata [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2006. – Vol. 134. – № 1-2. – P. 55-60. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.11.018.
32. Levanov, L. Diagnostic Potential and Antigenic Properties of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus Subviral Particles Expressed in Mammalian Cells from Semliki Forest Virus Replicons / L. Levanov, S. Kuivanen, A. Matveev [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52. – № 3. – P. 814-822. DOI: 10.1128/JCM.02488-13.
33. Holbrook, M.R. Use of Recombinant E Protein Domain III-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Differentiation of Tick-Borne Encephalitis Serocomplex Flaviviruses from Mosquito-Borne Flaviviruses / M.R. Holbrook, R.E. Shope, A.D.T. Barrett // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42. – № 9. – P. 4101-4110. DOI: 10.1128/JCM.42.9.4101-4110.2004.
34. Chidumayo, N.N. Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins / N.N. Chidumayo, K. Yoshii, N. Saasa [et al.] // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2014. – Vol. 78. – № 4. – P. 373-378. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.014.
35. Simmonds, P. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae / P. Simmonds, P. Becher, J. Bukh [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2017. – Vol. 98. – № 1. – P. 2-3. DOI: 10.1099/jgv.0.000672.
36. Kuno, G. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses / G. Kuno, G.-J.J. Chang // *Archives of Virology*. – 2007. – Vol. 152. – № 4. – P. 687-696. DOI: 10.1007/s00705-006-0903-z.
37. Blitvich, B. A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector / B. Blitvich, A. Firth // *Viruses*. – 2017. – Vol. 9. – № 6. – P. 154. DOI: 10.3390/v9060154.
38. Blitvich, B. Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization / B. Blitvich, A. Firth // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – № 4. – P. 1927-1959. DOI: 10.3390/v7041927.
39. Cook, S. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission / S. Cook, E.C. Holmes // *Archives of Virology*. – 2006. – Vol. 151. – № 2. – P. 309-325. DOI: 10.1007/s00705-005-0626-6.
40. Grard, G. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy / G. Grard, G. Moureau, R.N. Charrel [et al.] // *Virology*. – 2007. – Vol. 361. – № 1. – P. 80-92. DOI: 10.1016/j.virol.2006.09.015.
41. Martins, I.C. Dengue, West Nile, and Zika Viruses: Potential Novel Antiviral Biologics Drugs Currently at Discovery and Preclinical Development Stages / I.C. Martins, R.C. Ricardo, N.C. Santos // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2535. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112535.

42. Deviatkin, A.A. TBEV Subtyping in Terms of Genetic Distance / A.A. Deviatkin, G.G. Karganova, Y.A. Vakulenko, A.N. Lukashev // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 11. – P. 1240. DOI: 10.3390/v12111240.
43. Tkachev, S.E. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia / S.E. Tkachev, G.S. Chicherina, I. Golovljova [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2017. – Vol. 56. – P. 36-43. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.10.020.
44. Demina, T.V. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes / T.V. Demina, Yu.P. Dzhioev, M.M. Verkhozina [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2010. – Vol. 82. – № 6. – P. 965-976. DOI: 10.1002/jmv.21765.
45. Rice, C.M. Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution / C.M. Rice, E.M. Lenches, S.R. Eddy [et al.] // *Science*. – 1985. – Vol. 229. – № 4715. – P. 726-733. DOI: 10.1126/science.4023707.
46. Плетнев, А.Г. N-концевые аминокислотные последовательности структурных белков вируса клещевого энцефалита / А.Г. Плетнев, В.Ф. Ямщиков // *Биоорг. химия*. – 1985. – Т. 11. – № 12. – С. 1681-1684.
47. Gritsun, T.S. The 3' untranslated region of tick-borne flaviviruses originated by the duplication of long repeat sequences within the open reading frame / T.S. Gritsun, E.A. Gould // *Virology*. – 2006. – Vol. 350. – № 2. – P. 269-275. DOI: 10.1016/j.virol.2006.03.002.
48. Lindenbach, B.D. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication / B.D. Lindenbach, C.M. Rice // *Fields Virology*. – 2007. – С. 1101-1151. DOI: 10.1016/0038-092X(88)90131-4.
49. Pustijanac, E. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Prevention / E. Pustijanac, M. Buršić, J. Talapko [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 7. – P. 1634. DOI: 10.3390/microorganisms11071634.
50. Pletnev A. G. Tick-borne encephalitis virus genome: The nucleotide sequence coding for virion structural proteins / Pletnev A. G., Yamshchikov V. F., Blinov V. M. – 1986. – Т. 200. – № 2. – С. 317-321.
51. Daffis, S. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members / S. Daffis, K.J. Szretter, J. Schriewer [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 468. – № 7322. – P. 452-456. DOI: 10.1038/nature09489.
52. Asghar, N. The role of the poly(A) tract in the replication and virulence of tick-borne encephalitis virus / N. Asghar, Y.-P. Lee, E. Nilsson [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 39265. DOI: 10.1038/srep39265.

53. Pulkkinen, L.I.A. Molecular Organisation of Tick-Borne Encephalitis Virus / L.I.A. Pulkkinen, S.V. Barrass, A. Domanska [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 792. DOI: 10.3390/v14040792.
54. Tan, T.Y. Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles / T.Y. Tan, G. Fibriansah, S.-M. Lok // *PLOS Pathogens*. – 2020. – Vol. 16. – № 5. – P. e1008542. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008542.
55. Mukhopadhyay, S. A structural perspective of the flavivirus life cycle / S. Mukhopadhyay, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3. – № 1. – P. 13-22. DOI: 10.1038/nrmicro1067.
56. Zhang, X. Structure and function of capsid protein in flavivirus infection and its applications in the development of vaccines and therapeutics / X. Zhang, Y. Zhang, R. Jia [et al.] // *Veterinary Research*. – 2021. – Vol. 52. – № 1. – P. 98. DOI: 10.1186/s13567-021-00966-2.
57. Selinger, M. Tick-borne encephalitis virus capsid protein induces translational shutoff as revealed by its structural–biological analysis / M. Selinger, R. Novotný, J. Sýs [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – Vol. 298. – № 11. – P. 102585. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102585.
58. Anastasina, M. The structure of immature tick-borne encephalitis virus / M. Anastasina, T. Füzik, A. Domanska, [et al.]. – *Microbiology*, 2023. – Mode of access: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.08.04.551633> (date of access: 22.01.2026). – [Electronic resource].
59. Miorin, L. Spatial and temporal organization of tick-borne encephalitis flavivirus replicated RNA in living cells / L. Miorin, P. Maiuri, V.M. Hoenninger [et al.] // *Virology*. – 2008. – Vol. 379. – № 1. – P. 64-77. DOI: 10.1016/j.virol.2008.06.025.
60. Ye, L. RNA Structures and Their Role in Selective Genome Packaging / L. Ye, U.B. Ambi, M. Olguin-Nava [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. 1788. DOI: 10.3390/v13091788.
61. Lin, H.-H. Zika virus structural biology and progress in vaccine development / H.-H. Lin, B.-S. Yip, L.-M. Huang, S.-C. Wu // *Biotechnology Advances*. – 2018. – Vol. 36. – № 1. – P. 47-53. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.004.
62. Nicholls, C.M.R. Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms / C.M.R. Nicholls, M. Sevvana, R.J. Kuhn. – [Electronic resource] // *Advances in Virus Research*. – Elsevier, 2020. – Vol. 108. – P. 33-83. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352720300397> (date of access: 15.07.2024).
63. Zhang, Y. Structures of immature flavivirus particles / Y. Zhang // *The EMBO Journal*. – 2003. – T. 22. – № 11. – C. 2604-2613. DOI: 10.1093/emboj/cdg270.

64. Elshuber, S. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus FN1 / S. Elshuber, S.L. Allison, F.X. Heinz, C.W. Mandl // *Journal of General Virology*. – 2003. – Vol. 84. – № 1. – P. 183-191. DOI: 10.1099/vir.0.18723-0.
65. Op De Beeck, A. Role of the Transmembrane Domains of prM and E Proteins in the Formation of Yellow Fever Virus Envelope / A. Op De Beeck, R. Molenkamp, M. Caron [et al.] // *Journal of Virology*. – 2003. – Vol. 77. – № 2. – P. 813-820. DOI: 10.1128/JVI.77.2.813-820.2003.
66. Tan, T.Y. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process / T.Y. Tan, G. Fibriansah, V.A. Kostyuchenko [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 895. DOI: 10.1038/s41467-020-14647-9.
67. Hsieh, S.-C. Highly Conserved Residues in the Helical Domain of Dengue Virus Type 1 Precursor Membrane Protein Are Involved in Assembly, Precursor Membrane (prM) Protein Cleavage, and Entry / S.-C. Hsieh, Y.-C. Wu, G. Zou [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 48. – P. 33149-33160. DOI: 10.1074/jbc.M114.610428.
68. Ferlenghi, I. Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus / I. Ferlenghi, M. Clarke, T. Ruttan [et al.] // *Molecular Cell*. – 2001. – Vol. 7. – № 3. – P. 593-602. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00206-4.
69. Kaufmann, B. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry / B. Kaufmann, M.G. Rossmann // *Microbes and Infection*. – 2011. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-9. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.09.005.
70. Rosendal, E. Influence of the pre-membrane and envelope proteins on structure, pathogenicity, and tropism of tick-borne encephalitis virus / E. Rosendal, K. Bisikalo, S.M.A. Willekens [et al.] // *Journal of Virology*. – 2025. – Vol. 99. – № 9. – P. e00870-25. DOI: 10.1128/jvi.00870-25.
71. Rey, F.A. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. / F.A. Rey, F.X. Heinz, C. Mandl [и др.] // *Nature*. – 1995. – Т. 375. – № 6529. – С. 291-8. DOI: 10.1038/375291a0.
72. Yamanaka, A. Key Amino Acid Substitution for Infection-Enhancing Activity-Free Designer Dengue Vaccines / A. Yamanaka, E. Konishi // *iScience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 125-137. DOI: 10.1016/j.isci.2019.02.012.
73. Zhang, X. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections / X. Zhang, R. Jia, H. Shen [et al.] // *Viruses*. – 2017. – Vol. 9. – № 11. – P. 338. DOI: 10.3390/v9110338.
74. Sevvana, M. Mapping the diverse structural landscape of the flavivirus antibody repertoire / M. Sevvana, R.J. Kuhn // *Current Opinion in Virology*. – 2020. – Vol. 45. – P. 51-64. DOI: 10.1016/j.coviro.2020.07.006.

75. Bressanelli, S. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation / S. Bressanelli, K. Stiasny, S.L. Allison [и др.] // *The EMBO Journal*. – 2004. – Т. 23. – № 4. – С. 728-738. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600064.
76. Salabai, N.Sh. Clinical and laboratory parameters when using combined therapy (immunoglobulin and interferon $\alpha 2v$) in patients with meningeal form of tick-borne encephalitis / N.Sh. Salabai, K.I. Chuikova // *Bulletin of Siberian Medicine*. – 2012. – Т. 11. – № 3. – С. 101-107. DOI: 10.20538/1682-0363-2012-3-101-107.
77. Zhang, X. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution / X. Zhang, P. Ge, X. Yu [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 20. – № 1. – P. 105-110. DOI: 10.1038/nsmb.2463.
78. Goto, A. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion / A. Goto, K. Yoshii, M. Obara [et al.] // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – № 23. – P. 3043-3052. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.11.068.
79. Könighofer, E. Identification of Three Novel O-Linked Glycans in the Envelope Protein of Tick-Borne Encephalitis Virus / E. Könighofer, E. Mirgorodskaya, K. Nyström [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 12. – P. 1891. DOI: 10.3390/v16121891.
80. Seligman, S.J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide / S.J. Seligman // *Virology Journal*. – 2008. – Vol. 5. – № 1. – P. 27. DOI: 10.1186/1743-422X-5-27.
81. Crill, W.D. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells / W.D. Crill, J.T. Roehrig // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75. – № 16. – P. 7769-7773. DOI: 10.1128/JVI.75.16.7769-7773.2001.
82. Pierson, T.C. Review Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection : Implications for Vaccine Development / T.C. Pierson, D.H. Fremont, R.J. Kuhn, M.S. Diamond. – 2008. – С. 229-238. DOI: 10.1016/j.chom.2008.08.004.
83. Kuivanen, S. Identification of linear human B-cell epitopes of tick-borne encephalitis virus / S. Kuivanen, J. Hepojoki, S. Vene [et al.] // *Virology Journal*. – 2014. – Vol. 11. – № 1. – P. 115. DOI: 10.1186/1743-422X-11-115.
84. Versiani, A.F. Identification of B-Cell Epitopes with Potential to Serologically Discriminate Dengue from Zika Infections / A.F. Versiani, R.P. Rocha, T.A.O. Mendes [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 11. – P. 1079. DOI: 10.3390/v11111079.
85. Amrun, S.N. Novel differential linear B-cell epitopes to identify Zika and dengue virus infections in patients / S.N. Amrun, W. Yee, F. Abu Bakar [et al.] // *Clinical & Translational Immunology*. – 2019. – Vol. 8. – № 7. – P. e1066. DOI: 10.1002/cti2.1066.

86. Lim, X.-X. Human antibody C10 neutralizes by diminishing Zika but enhancing dengue virus dynamics / X.-X. Lim, B. Shu, S. Zhang [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – № 25. – P. 6067-6080.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2021.11.009.
87. Sharma, A. The epitope arrangement on flavivirus particles contributes to Mab C10's extraordinary neutralization breadth across Zika and dengue viruses / A. Sharma, X. Zhang, W. Dejnirattisai [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – № 25. – P. 6052-6066.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2021.11.010.
88. Haslwanter, D. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection / D. Haslwanter, D. Blaas, F.X. Heinz, K. Stiasny // *PLOS Pathogens*. – 2017. – Vol. 13. – № 9. – P. e1006643. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006643.
89. Wang, Y. Rational design of flavivirus E protein vaccine optimizes immunogenicity and mitigates antibody dependent enhancement risk / Y. Wang, A. Galkin, X. Shang [et al.] // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 11558. DOI: 10.1038/s41467-025-67447-4.
90. Svoboda, P. A combination of two resistance mechanisms is critical for tick-borne encephalitis virus escape from a broadly neutralizing human antibody / P. Svoboda, J. Haviernik, P. Bednar [et al.] // *Cell Reports*. – 2023. – Vol. 42. – № 9. – P. 113149. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113149.
91. Vogt, M.R. Human Monoclonal Antibodies against West Nile Virus Induced by Natural Infection Neutralize at a Postattachment Step / M.R. Vogt, B. Moesker, J. Goudsmit [et al.] // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – № 13. – P. 6494-6507. DOI: 10.1128/JVI.00286-09.
92. Oliphant, T. Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein / T. Oliphant, G.E. Nybakken, M. Engle [et al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 24. – P. 12149-12159. DOI: 10.1128/JVI.01732-06.
93. Rouvinski, A. Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses / A. Rouvinski, P. Guardado-Calvo, G. Barba-Spaeth [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 520. – № 7545. – P. 109-113. DOI: 10.1038/nature14130.
94. Deng, Y.-Q. A Broadly Flavivirus Cross-Neutralizing Monoclonal Antibody that Recognizes a Novel Epitope within the Fusion Loop of E Protein / Y.-Q. Deng, J.-X. Dai, G.-H. Ji [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. e16059. DOI: 10.1371/journal.pone.0016059.
95. Crill, W.D. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells / W.D. Crill, J.T. Roehrig // *Journal of Virology*. – 2001. – T. 75. – № 16. – C. 7769-7773. DOI: 10.1128/jvi.75.16.7769-7773.2001.
96. Füzik, T. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody / T. Füzik, P. Formanová, D. Růžek [et al.] // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 436. DOI: 10.1038/s41467-018-02882-0.

97. Aregay, A. Tick-borne encephalitis vaccine breakthrough infections induce aberrant T cell and antibody responses to non-structural proteins / A. Aregay, J. Slunečko, M. Korva [et al.]. – [Electronic resource] // *npj Vaccines*. – 2024. – Vol. 9. – № 1. – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/s41541-024-00936-7> (date of access: 23.05.2025).
98. Jarmer, J. Variation of the Specificity of the Human Antibody Responses after Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Vaccination / J. Jarmer, J. Zlatkovic, G. Tsouchnikas [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 23. – P. 13845-13857. DOI: 10.1128/JVI.02086-14.
99. Van Den Elsen, K. Flavivirus nonstructural proteins and replication complexes as antiviral drug targets / K. Van Den Elsen, B.L.A. Chew, J.S. Ho, D. Luo // *Current Opinion in Virology*. – 2023. – Vol. 59. – P. 101305. DOI: 10.1016/j.coviro.2023.101305.
100. Puerta-Guardo, H. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism / H. Puerta-Guardo, D.R. Glasner, D.A. Espinosa [et al.] // *Cell Reports*. – 2019. – Vol. 26. – № 6. – P. 1598-1613.e8. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.036.
101. Muller, D.A. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker / D.A. Muller, P.R. Young // *Antiviral Research*. – 2013. – Vol. 98. – № 2. – P. 192-208. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008.
102. Ceconi, M. Diagnosing arthropod-borne flaviviruses: non-structural protein 1 (NS1) as a biomarker / M. Ceconi, K.K. Ariën, P. Delputte // *Trends in Microbiology*. – 2024. – Vol. 32. – № 7. – P. 678-696. DOI: 10.1016/j.tim.2023.11.016.
103. Rastogi, M. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein / M. Rastogi, N. Sharma, S.K. Singh // *Virology Journal*. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 131. DOI: 10.1186/s12985-016-0590-7.
104. Xie, X. Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein / X. Xie, S. Gayen, C. Kang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 8. – P. 4609-4622. DOI: 10.1128/JVI.02424-12.
105. Assenberg, R. Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication / R. Assenberg, E. Mastrangelo, T.S. Walter [et al.] // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – № 24. – P. 12895-12906. DOI: 10.1128/JVI.00942-09.
106. Miller, S. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner / S. Miller, S. Kastner, J. Krijnse-Locker [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 12. – P. 8873-8882. DOI: 10.1074/jbc.M609919200.
107. Zhou, Y. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase / Y. Zhou, D. Ray, Y. Zhao [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 8. – P. 3891-3903. DOI: 10.1128/JVI.02704-06.

108. Pierson, T.C. Flaviviruses: braking the entering / T.C. Pierson, M. Kielian // *Current Opinion in Virology*. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 3-12. DOI: 10.1016/j.coviro.2012.12.001.
109. Pulkkinen, L.I.A. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View / L.I.A. Pulkkinen, S.J. Butcher, M. Anastasina // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – № 7. – P. 350. DOI: 10.3390/v10070350.
110. Laureti, M. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry / M. Laureti, D. Narayanan, J. Rodriguez-Andres [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Т. 9. – С. 2180. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02180.
111. Mittler, E. LRP8 is a receptor for tick-borne encephalitis virus / E. Mittler, A.L. Tse, P.-T.-H. Tran [et al.] // *Nature*. – 2025. – Vol. 646. – № 8086. – P. 945-952. DOI: 10.1038/s41586-025-09500-2.
112. Anwar, M.N. The interactions of flaviviruses with cellular receptors: Implications for virus entry / M.N. Anwar, R. Akhtar, M. Abid [et al.] // *Virology*. – 2022. – Vol. 568. – P. 77-85. DOI: 10.1016/j.virol.2022.02.001.
113. Modis, Y. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein / Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, S.C. Harrison // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 12. – P. 6986-6991. DOI: 10.1073/pnas.0832193100.
114. Knipe, D.M. *Fields virology* / D.M. Knipe, P.M. Howley. – 6th ed. – Philadelphia : Wolters Kluwer health - Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
115. White, J.M. Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme / J.M. White, S.E. Delos, M. Brecher, K. Schornberg // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 43. – № 3. – P. 189-219. DOI: 10.1080/10409230802058320.
116. Stiasny, K. Membrane Interactions of the Tick-Borne Encephalitis Virus Fusion Protein E at Low pH / K. Stiasny, S.L. Allison, J. Schalich, F.X. Heinz // *Journal of Virology*. – 2002. – Vol. 76. – № 8. – P. 3784-3790. DOI: 10.1128/jvi.76.8.3784-3790.2002.
117. Li, L. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation / L. Li, S.-M. Lok, I.-M. Yu [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 319. – № 5871. – P. 1830-1834. DOI: 10.1126/science.1153263.
118. Kuhn, R.J. Structure of Dengue Virus / R.J. Kuhn, W. Zhang, M.G. Rossmann [et al.] // *Cell*. – 2002. – Vol. 108. – № 5. – P. 717-725. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00660-8.
119. Romanova, L.Iu. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation / L.Iu. Romanova, A.P. Gmyl, T.I. Dzhivaniyan [et al.] // *Virology*. – 2007. – Vol. 362. – № 1. – P. 75-84. DOI: 10.1016/j.virol.2006.12.013.

120. Рудаков Н.В. Эпидемиология омской геморрагической лихорадки / Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Якименко В.В. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 14. – № 1. – С. 39-48.
121. Г. Н. Леонова. Энцефалит Повассан на Дальнем Востоке : 2 / Г. Н. Леонова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2001. – С. 83-87.
122. Путинцева Е.В. Результаты мониторинга возбудителя лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз развития эпидемической ситуации на 2020 г. / Путинцева Е.В., Алексейчик И.О., Чеснокова С.Н. [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 1. – С. 51-60.
123. Лукин Е.П. Японский энцефалит – XXI век / Лукин Е.П. // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 9. – № 1. – С. 15-30.
124. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Дальневосточном очаговом регионе евразийского континента / Леонова Г.Н. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т. 97. – № 2. – С. 150-158.
125. Wagner, E. First Indications of Omsk Haemorrhagic Fever Virus beyond Russia / E. Wagner, A. Shin, N. Tukhanova [et al.] // Viruses. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 754. DOI: 10.3390/v14040754.
126. Diani, E. Omsk Hemorrhagic Fever Virus: A Comprehensive Review from Epidemiology to Diagnosis and Treatment / E. Diani, R. Cecchetto, E. Tonon [et al.] // Microorganisms. – 2025. – Vol. 13. – № 2. – P. 426. DOI: 10.3390/microorganisms13020426.
127. Kovalev, S.Y. The First Record of Omsk Hemorrhagic Fever Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus of Baltic Lineage from the Kemerovo Region of Russia / S.Y. Kovalev, V.Y. Okulovskaya // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2024. – Vol. 24. – № 7. – P. 443-450. DOI: 10.1089/vbz.2023.0156.
128. Kovalev, S.Yu. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries / S.Yu. Kovalev, D.N. Chernykh, V.S. Kokorev [et al.] // Journal of General Virology. – 2009. – Vol. 90. – № 12. – P. 2884-2892. DOI: 10.1099/vir.0.012419-0.
129. Chernokhaeva, L.L. Protective immunity spectrum induced by immunization with a vaccine from the TBEV strain Sofjin / L.L. Chernokhaeva, Yu.V. Rogova, M.F. Vorovitch [et al.] // Vaccine. – 2016. – Vol. 34. – № 20. – P. 2354-2361. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.03.041.
130. Shin, A. Tick-borne encephalitis virus and West-Nile fever virus as causes of serous meningitis of unknown origin in Kazakhstan / A. Shin, N. Tukhanova, J. Ndenkeh [et al.] // Zoonoses and Public Health. – 2022. – Vol. 69. – № 5. – P. 514-525. DOI: 10.1111/zph.12941.
131. Putintseva, E.V. West Nile Fever: Results of Monitoring over the Causative Agent in the Russian Federation in 2021, the Incidence Forecast for 2022 / E.V. Putintseva, S.K. Udovichenko, D.N. Nikitin

- [и др.] // *Problems of Particularly Dangerous Infections*. – 2022. – № 1. – С. 43-53. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-43-53.
132. Климова Е.А. Лихорадка Западного Нила на территории Московской агломерации / Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Шакарян А.К. [и др.] // *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение*. – 2021. – Т. 4 (39).
133. Platonov, A.E. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics / A.E. Platonov, M.V. Fedorova, L.S. Karan [et al.] // *Parasitology Research*. – 2008. – Vol. 103. – № S1. – P. 45-53. DOI: 10.1007/s00436-008-1050-0.
134. Čabanová, V. 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 / V. Čabanová, J. Kerlik, P. Kirschner [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 366. DOI: 10.3390/v15020366.
135. Rockstroh, A. Specific detection and differentiation of tick-borne encephalitis and West Nile virus induced IgG antibodies in humans and horses / A. Rockstroh, B. Moges, B.S. Berneck [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2019. – P. tbed.13205. DOI: 10.1111/tbed.13205.
136. Shi, P.-Y. Serologic diagnosis of West Nile virus infection / P.-Y. Shi, S.J. Wong // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2003. – Vol. 3. – № 6. – P. 733-741. DOI: 10.1586/14737159.3.6.733.
137. Martin, D.A. Use of Immunoglobulin M Cross-Reactions in Differential Diagnosis of Human Flaviviral Encephalitis Infections in the United States / D.A. Martin, B.J. Biggerstaff, B. Allen [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2002. – Vol. 9. – № 3. – P. 544-549. DOI: 10.1128/CDLI.9.3.544-549.2002.
138. Lhuillier, M. Intérêt des IgM anti-mariques dans le diagnostic et la surveillance épidémiologique de la fièvre jaune / M. Lhuillier, J.-L. Sarthou // *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*. – 1983. – T. 134. – № 3. – С. 349-359. DOI: 10.1016/S0769-2617(83)80008-2.
139. Johnson, A.J. Detection of Anti-Arboviral Immunoglobulin G by Using a Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / A.J. Johnson, D.A. Martin, N. Karabatsos, J.T. Roehrig // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2000. – Vol. 38. – № 5. – P. 1827-1831. DOI: 10.1128/JCM.38.5.1827-1831.2000.
140. Mandl, C.W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis / C.W. Mandl // *Virus Research*. – 2005. – Vol. 111. – № 2. – P. 161-174. DOI: 10.1016/j.virusres.2005.04.007.
141. Leonova, G.N. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the

- Russian Far East / G.N. Leonova, S.I. Belikov, I.G. Kondratov, I. Takashima // *Virology*. – 2013. – Vol. 443. – № 1. – P. 89-98. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.029.
142. Kapoor, T. Prevalence of Powassan Virus Seropositivity Among People with History of Lyme Disease and Non-Lyme Community Controls in the Northeastern United States / T. Kapoor, L. Murray, M. Kuvaldina [et al.] // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2024. – Vol. 24. – № 4. – P. 226-236. DOI: 10.1089/vbz.2022.0030.
143. Hermance, M.E. Powassan Virus: An Emerging Arbovirus of Public Health Concern in North America / M.E. Hermance, S. Thangamani // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2017. – Vol. 17. – № 7. – P. 453-462. DOI: 10.1089/vbz.2017.2110.
144. Kemenesi, G. Tick-Borne Flaviviruses, with a Focus on Powassan Virus / G. Kemenesi, K. Bányai // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2018. – Vol. 32. – № 1. – P. e00106-17. DOI: 10.1128/CMR.00106-17.
145. Петрова И.С. Завозной случай японского энцефалита у российского туриста (2014) / Петрова И.С., Муравьев О.Б., Кузьменко Т.Н. [и др.] // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2014. – Т. 19. – № 4. – С. 60-62.
146. Yoshii, K. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China: TBE in Japan, ROK and China / K. Yoshii, J.Y. Song, S.-B. Park [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-10. DOI: 10.1038/emi.2017.69.
147. Süss, J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—An overview / J. Süss // *Ticks and Tick-borne Diseases*. – 2011. – Vol. 2. – № 1. – P. 2-15. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2010.10.007.
148. Kwasnik, M. Tick-Borne Encephalitis—Review of the Current Status / M. Kwasnik, J. Rola, W. Rozek // *Journal of Clinical Medicine*. – 2023. – Vol. 12. – № 20. – P. 6603. DOI: 10.3390/jcm12206603.
149. Charrel, R.N. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe / R.N. Charrel, H. Attoui, A.M. Butenko [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2004. – Vol. 10. – № 12. – P. 1040-1055. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x.
150. Van Heuverswyn, J. Spatiotemporal spread of tick-borne encephalitis in the EU/EEA, 2012 to 2020 / J. Van Heuverswyn, L.K. Hallmaier-Wacker, J. Beauté [et al.]. – [Electronic resource] // *Eurosurveillance*. – 2023. – Vol. 28. – № 11. – Mode of access: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.11.2200543> (date of access: 12.09.2024).
151. Heinz, F.X. Vaccination and Tick-borne Encephalitis, Central Europe / F.X. Heinz, K. Stiasny, H. Holzmann [и др.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2013. – Т. 19. – № 1. – С. 69-76. DOI: 10.3201/eid1901.120458.

152. Chen, X. Epidemiology of tick-borne encephalitis in China, 2007- 2018 / X. Chen, F. Li, Q. Yin [et al.] // PLOS ONE. – 2019. – Vol. 14. – № 12. – P. e0226712. DOI: 10.1371/journal.pone.0226712.
153. Taba, P. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis / P. Taba, E. Schmutzhard, P. Forsberg [et al.] // European Journal of Neurology. – 2017. – Vol. 24. – № 10. – P. 1214. DOI: 10.1111/ene.13356.
154. Gritsun, T.S. Tick-borne encephalitis / T.S. Gritsun, V.A. Lashkevich, E.A. Gould // Antiviral Research. – 2003. – Vol. 57. – № 1-2. – P. 129-146. DOI: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1.
155. Polienko, A.E. Tick-borne encephalitis virus subtypes: mono- and mixed infection in specific and non-specific ticks / A.E. Polienko, O.A. Belova, A.G. Litov [и др.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2025. – Т. 15. – С. 1568449. DOI: 10.3389/fcimb.2025.1568449.
156. Factsheet about tick-borne encephalitis (TBE). – European Centre for Disease Prevention and Control An agency of the European Union, 2024. – Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet> (дата обращения: 19.05.2026). – [Электронный ресурс].
157. Elsterova, J. Tick-borne encephalitis virus neutralization by high dose intravenous immunoglobulin / J. Elsterova, M. Palus, J. Sirmarova [et al.] // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2017. – Vol. 8. – № 2. – P. 253-258. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.11.007.
158. Blom, K. Cell-Mediated Immune Responses and Immunopathogenesis of Human Tick-Borne Encephalitis Virus-Infection / K. Blom, A. Cuapio, J.T. Sandberg [и др.] // Frontiers in Immunology. – 2018. – Т. 9. – С. 2174. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02174.
159. Grygorczuk, S. The lymphocyte populations and their migration into the central nervous system in tick-borne encephalitis / S. Grygorczuk, J. Osada, K. Toczyłowski [et al.] // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2020. – Vol. 11. – № 5. – P. 101467. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101467.
160. Stone, E.T. T Cells in Tick-Borne Flavivirus Encephalitis: A Review of Current Paradigms in Protection and Disease Pathology / E.T. Stone, A.K. Pinto // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – № 4. – P. 958. DOI: 10.3390/v15040958.
161. Morgardt, S. Kinetics of tick-borne encephalitis virus IgM antibody responses in serum and cerebrospinal fluid / S. Morgardt, T. Bergström, K. Mehlig [et al.] // Infectious Diseases. – 2025. – Vol. 57. – № 7. – P. 676-686. DOI: 10.1080/23744235.2025.2473496.
162. Adam, A. Memory B cell and antibody responses to flavivirus infection and vaccination / A. Adam, S. Cuellar, T. Wang. – [Электронный ресурс] // Faculty Reviews. – 2021. – Т. 10. – Режим доступа: <https://facultyopinions.com/prime/reports/b/10/5/> (дата обращения: 30.09.2025).
163. Tigeeva, E.V. The importance of the role of T-cell immunity in the development of modern tick-borne encephalitis vaccines / E.V. Tigeeva, L.F. Nizolenko, L.I. Karpenko // Journal of microbiology,

epidemiology and immunobiology. – 2024. – T. 101. – № 4. – C. 546-559. DOI: 10.36233/0372-9311-553.

164. Aberle, J.H. Mechanistic insights into the impairment of memory B cells and antibody production in the elderly / J.H. Aberle, K. Stiasny, M. Kundi, F.X. Heinz // AGE. – 2013. – Vol. 35. – № 2. – P. 371-381. DOI: 10.1007/s11357-011-9371-9.

165. De Barros Cardoso, C.R. Dengue Dilemma: Navigating Cross-Reactivity and Immune Challenges / C.R. De Barros Cardoso, T. Cerqueira-Silva, M. Barral-Netto, V.S. Boaventura. – [Electronic resource] // Dengue Virus Evolution: From Emergence to a Global Health Crisis : Current Topics in Microbiology and Immunology / C.N. Duarte Dos Santos, M. Giovanetti eds. . – Cham : Springer Nature Switzerland, 2025. – Vol. 447. – P. 149-177. – Mode of access: https://link.springer.com/10.1007/82_2025_294 (date of access: 25.03.2026).

166. Aynekulu Mersha, D.G. The role of antibody-dependent enhancement in dengue vaccination / D.G. Aynekulu Mersha, I. Van Der Sterren, L.P.M. Van Leeuwen [et al.] // Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. 22. DOI: 10.1186/s40794-024-00231-2.

167. Halstead, S.B. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age / S.B. Halstead // Vaccine. – 2017. – Vol. 35. – № 47. – P. 6355-6358. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.089.

168. Narayan, R. Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection / R. Narayan, S. Tripathi // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – T. 10. – C. 580096. DOI: 10.3389/fcimb.2020.580096.

169. Halstead, S.B. Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses / S.B. Halstead. – [Electronic resource] // Advances in Virus Research. – Elsevier, 2003. – Vol. 60. – P. 421-467. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703600114> (date of access: 15.07.2024).

170. Rothman, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms / A.L. Rothman // Nature Reviews Immunology. – 2011. – Vol. 11. – № 8. – P. 532-543. DOI: 10.1038/nri3014.

171. Beltramello, M. The Human Immune Response to Dengue Virus Is Dominated by Highly Cross-Reactive Antibodies Endowed with Neutralizing and Enhancing Activity / M. Beltramello, K.L. Williams, C.P. Simmons [et al.] // Cell Host & Microbe. – 2010. – Vol. 8. – № 3. – P. 271-283. DOI: 10.1016/j.chom.2010.08.007.

172. Rey, F.A. Common Features of Enveloped Viruses and Implications for Immunogen Design for Next-Generation Vaccines / F.A. Rey, S.-M. Lok // Cell. – 2018. – Vol. 172. – № 6. – P. 1319-1334. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.054.

173. Stiasny, K. Flavivirus membrane fusion / K. Stiasny, F.X. Heinz // *Journal of General Virology*. – 2006. – Vol. 87. – № 10. – P. 2755-2766. DOI: 10.1099/vir.0.82210-0.
174. Musso, D. Serological Diagnosis of Flavivirus-Associated Human Infections / D. Musso, P. Desprès // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10. – № 5. – P. 302. DOI: 10.3390/diagnostics10050302.
175. Burrell, C.J. Laboratory Diagnosis of Virus Diseases / C.J. Burrell, C.R. Howard, F.A. Murphy. – [Electronic resource] // *Fenner and White's Medical Virology*. – Elsevier, 2017. – P. 135-154. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123751560000102> (date of access: 09.01.2025).
176. Glans, H. Diagnostic value of RT-PCR for detection of tick-borne encephalitis virus RNA in cerebrospinal fluid / H. Glans, S. Bartholdsson, N. Lagerqvist [et al.] // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2026. – Vol. 45. – № 4. – P. 1133-1140. DOI: 10.1007/s10096-025-05389-x.
177. Albinsson, B. Antibody responses to tick-borne encephalitis virus non-structural protein 1 and whole virus antigen—a new tool in the assessment of suspected vaccine failure patients / B. Albinsson, B. Rönnerberg, S. Vene, Å. Lundkvist // *Infection Ecology & Epidemiology*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1696132. DOI: 10.1080/20008686.2019.1696132.
178. Hilt, E.E. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases / E.E. Hilt, P. Ferrieri // *Genes*. – 2022. – Vol. 13. – № 9. – P. 1566. DOI: 10.3390/genes13091566.
179. Kabir, M.A. Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care / M.A. Kabir, H. Zilouchian, M.A. Younas, W. Asghar // *Biosensors*. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 206. DOI: 10.3390/bios11070206.
180. Achazi, K. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing / K. Achazi, A. Nitsche, P. Patel [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2011. – Vol. 171. – № 1. – P. 34-39. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.09.026.
181. Donoso Mantke, O. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections / O. Donoso Mantke, S.W. Aberle, T. Avšič-Županc [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2007. – Vol. 38. – № 1. – P. 73-77. DOI: 10.1016/j.jcv.2006.09.001.
182. Holzmann, H. Diagnosis of tick-borne encephalitis / H. Holzmann // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – P. S36-S40. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00819-8.
183. Dias, B.D.P. Challenges in Direct Detection of Flaviviruses: A Review / B.D.P. Dias, C.C. Barbosa, C.S. Ferreira [et al.] // *Pathogens*. – 2023. – Vol. 12. – № 5. – P. 643. DOI: 10.3390/pathogens12050643.

184. Mantke, O.D. Serological Versus PCR Methods for the Detection of Tick-Borne Encephalitis Virus Infections in Humans / O.D. Mantke, K. Achazi, M. Niedrig // *Future Virology*. – 2007. – Vol. 2. – № 6. – P. 565-572. DOI: 10.2217/17460794.2.6.565.
185. Reteng, P. A targeted approach with nanopore sequencing for the universal detection and identification of flaviviruses / P. Reteng, L. Nguyen Thuy, T. Tran Thi Minh [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 19031. DOI: 10.1038/s41598-021-98013-9.
186. Domingo, C. Yellow fever in the diagnostics laboratory / C. Domingo, R.N. Charrel, J. Schmidt-Chanasit [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2018. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-15. DOI: 10.1038/s41426-018-0128-8.
187. Gritsun, T.S. Tick-borne Flaviviruses / T.S. Gritsun, P.A. Nuttall, E.A. Gould. – [Electronic resource] // *Advances in Virus Research*. – Elsevier, 2003. – Vol. 61. – P. 317-371. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703610080> (date of access: 15.07.2024).
188. Mittova, V. Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV): Epidemiology, Diagnosis, Therapeutic Approaches and Some Molecular Aspects—An Updated Review / V. Mittova, Z.R. Tsetskhladze, C. Motsonelidze [et al.] // *Microbiology Research*. – 2024. – Vol. 15. – № 4. – P. 2619-2649. DOI: 10.3390/microbiolres15040174.
189. Fischer, C. Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses / C. Fischer, W.K. Jo, V. Haage [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2021. – Vol. 27. – № 9. – P. 1221-1229. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.05.047.
190. Heinz, F.X. Comparison of two different enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies against tick-borne encephalitis virus in serum and cerebrospinal fluid / F.X. Heinz, M. Roggendorf, H. Hofmann [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1981. – Vol. 14. – № 2. – P. 141-146. DOI: 10.1128/jcm.14.2.141-146.1981.
191. Roggendorf, M. Serological diagnosis of acute tick-borne encephalitis by demonstration of antibodies of the IgM class / M. Roggendorf, F. Deinhardt, F. Heinz, C. Kunz // *Journal of Medical Virology*. – 1981. – Vol. 7. – № 1. – P. 41-50. DOI: 10.1002/jmv.1890070105.
192. Hofmann, H. Tick-borne encephalitis: A simple method for detection of antibody production in the brain / H. Hofmann, F.X. Heinz, H. Dippe, Ch. Kunz // *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*. – 1985. – Vol. 260. – № 1. – P. 132-138. DOI: 10.1016/S0176-6724(85)80109-7.
193. Pazdiora, P. [Determination of antibodies after immunization with the FSME-Immun vaccine] / P. Pazdiora, J. Januska, A. Kubátová // *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Spolecnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti J.E. Purkyne*. – 2000. – T. 49. – № 3. – C. 110-114.

194. Барышникова, В.С. Рекомбинантный гликопротеин Е вируса клещевого энцефалита для создания дифференцирующей тест-системы / В.С. Барышникова, Ю.В. Турченко, А.А. Шишова [и др.] // Биотехнология. – 2022. – Т. 38. – № 6. – С. 73-83. DOI: 10.56304/s0234275822060023.
195. Quarsten, H. No detection of tick-borne encephalitis virus RNA in blood, urine or saliva of hospitalised immunocompetent tick-borne encephalitis patients / H. Quarsten, Å.K. Andreassen, K.M. Paulsen [et al.] // PLOS ONE. – 2024. – Vol. 19. – № 6. – P. e0305603. DOI: 10.1371/journal.pone.0305603.
196. Velay, A. Comparison of six commercial tick-borne encephalitis IgM and IgG ELISA kits and the molecular characterization of their antigenic design / A. Velay, M. Solis, H. Barth [et al.] // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2018. – Vol. 90. – № 4. – P. 286-292. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.12.012.
197. Reusken, C. An evaluation of serological methods to diagnose tick-borne encephalitis from serum and cerebrospinal fluid / C. Reusken, M. Boonstra, S. Rugebregt [и др.] // Journal of Clinical Virology. – 2019. – Т. 120. – С. 78-83. DOI: 10.1016/j.jcv.2019.09.009.
198. Щербинина М.С. Состояние поствакцинального иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения высокоэндемичной территории в условиях доминирования сибирского подтипа возбудителя / Щербинина М.С., Скрынник С.М., Левина Л.С. [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17. – № 2. – С. 27-36.
199. Yoshii, K. A Retrospective Epidemiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus in Patients with Neurological Disorders in Hokkaido, Japan / K. Yoshii, I. Takahashi-Iwata, S. Shirai [et al.] // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8. – № 11. – P. 1672. DOI: 10.3390/microorganisms8111672.
200. Veje, M. Diagnosing tick-borne encephalitis: a re-evaluation of notified cases / M. Veje, M. Studahl, M. Johansson [et al.] // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 37. – № 2. – P. 339-344. DOI: 10.1007/s10096-017-3139-9.
201. Girl, P. Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses / P. Girl, M. Bestehorn-Willmann, S. Zange [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2020. – Vol. 58. – № 4. – P. e01783-19. DOI: 10.1128/JCM.01783-19.
202. Donoso-Mantke, O. Tick-Borne Encephalitis Virus: A General Overview / O. Donoso-Mantke, L. S., D. Ruzek. – [Electronic resource] // Flavivirus Encephalitis / D. Ruzek ed. . – InTech, 2011. – Mode of access: <http://www.intechopen.com/books/flavivirus-encephalitis/tick-borne-encephalitis-virus-a-general-overview> (date of access: 24.02.2025).
203. Donoso-Mantke, O. Laboratory capacity for detection of chikungunya virus infections in Europe / O. Donoso-Mantke, M. Niedrig, On Behalf Of The Enivd Members. – [Electronic resource] // Weekly

- releases (1997–2007). – 2007. – Vol. 12. – № 37. – Mode of access: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esw.12.37.03267-en> (date of access: 24.02.2025).
204. Albinsson, B. Distinction between serological responses following tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection vs vaccination, Sweden 2017 / B. Albinsson, S. Vene, L. Rombo [et al.]. – [Electronic resource] // *Eurosurveillance*. – 2018. – Vol. 23. – № 3. – Mode of access: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.3.17-00838> (date of access: 24.02.2025).
205. Lindgren, E. Monitoring EU Emerging Infectious Disease Risk Due to Climate Change / E. Lindgren, Y. Andersson, J.E. Suk [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 336. – № 6080. – P. 418-419. DOI: 10.1126/science.1215735.
206. Holzmann, H. Diagnosis of tick-borne encephalitis / H. Holzmann // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – P. S36-S40. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00819-8.
207. Achazi, K. Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus / K. Achazi, D. Růžek, O. Donoso-Mantke [et al.] // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2011. – Vol. 11. – № 6. – P. 641-647. DOI: 10.1089/vbz.2010.0236.
208. Погодина В.В. Необычный случай летального исхода клещевого энцефалита у пациента, привитого вакцинами разных генотипов (челябинская область) / Погодина В.В., Лучинина С.В., Степанова О.Н. [и др.] // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2015. – № 20 (1). – С. 56-64.
209. Uhuami, A.O. Flavivirus cross-reactivity: Insights into e-protein conservancy, pre-existing immunity, and co-infection / A.O. Uhuami, N. Lawal, M.B. Bello, M.U. Imam // *The Microbe*. – 2024. – Vol. 4. – P. 100105. DOI: 10.1016/j.microb.2024.100105.
210. Crill, W.D. Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein Cross-Reactive Epitopes / W.D. Crill, G.-J.J. Chang // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 24. – P. 13975-13986. DOI: 10.1128/JVI.78.24.13975-13986.2004.
211. Jarmer, J. Variation of the Specificity of the Human Antibody Responses after Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Vaccination / J. Jarmer, J. Zlatkovic, G. Tsouchnikas [и др.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Т. 88. – № 23. – С. 13845-13857. DOI: 10.1128/jvi.02086-14.
212. Holbrook, M.R. Use of Recombinant E Protein Domain III-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Differentiation of Tick-Borne Encephalitis Serocomplex Flaviviruses from Mosquito-Borne Flaviviruses / M.R. Holbrook, R.E. Shope, A.D.T. Barrett // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42. – № 9. – P. 4101-4110. DOI: 10.1128/JCM.42.9.4101-4110.2004.
213. Ikawa-Yoshida, A. Development of an ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents: ELISA for TBE infection in rodents / A. Ikawa-Yoshida, K. Yoshii, K. Kuwahara [et al.] // *Microbiology and Immunology*. – 2011. – Vol. 55. – № 2. – P. 100-107. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00296.x.

214. Nagar, P.K. Detection of Dengue Virus-Specific IgM and IgG Antibodies through Peptide Sequences of Envelope and NS1 Proteins for Serological Identification / P.K. Nagar, D. Savargaonkar, A.R. Anvikar // *Journal of Immunology Research*. – 2020. – Vol. 2020. – № 1. – P. 1820325. DOI: 10.1155/2020/1820325.
215. Valle, C. Multiplex Serology for Sensitive and Specific Flavivirus IgG Detection: Addition of Envelope Protein Domain III to NS1 Increases Sensitivity for Tick-Borne Encephalitis Virus IgG Detection / C. Valle, S. Shrestha, G.-J. Godeke [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 2. – P. 286. DOI: 10.3390/v16020286.
216. Kravchuk, B.I. Cross-Reactive Antibodies to the NS1 Protein of Omsk Hemorrhagic Fever Virus Are Absent in the Sera of Patients with Tick-Borne Encephalitis / B.I. Kravchuk, Y.A. Khlusevich, G.S. Chicherina [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 7. – P. 1032. DOI: 10.3390/v16071032.
217. Fisher, R. The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections / R. Fisher, Y. Lustig, E.H. Sklan, E. Schwartz // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 572. DOI: 10.3390/v15020572.
218. Albinsson, B. Multi-laboratory evaluation of ReaScan TBE IgM rapid test, 2016 to 2017 / B. Albinsson, A.E. Jääskeläinen, K. Värvi [et al.]. – [Electronic resource] // *Eurosurveillance*. – 2020. – Vol. 25. – № 12. – Mode of access: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.12.1900427> (date of access: 25.02.2025).
219. Blázquez, A.-B. Biosensors for the detection of flaviviruses: A review / A.-B. Blázquez, N. Jiménez De Oya // *Synthetic and Systems Biotechnology*. – 2025. – Vol. 10. – № 1. – P. 194-206. DOI: 10.1016/j.synbio.2024.10.005.
220. Ribeiro, E.M.D.C. Direct Detection of Orthoflavivirus via Gold Nanorod Plasmon Resonance / E.M.D.C. Ribeiro, B.D.P. Dias, C.S. Ferreira [et al.] // *Sensors*. – 2025. – Vol. 25. – № 15. – P. 4775. DOI: 10.3390/s25154775.
221. Cabral-Miranda, G. Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals / G. Cabral-Miranda, A.R. Cardoso, L.C.S. Ferreira [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 113. – P. 101-107. DOI: 10.1016/j.bios.2018.04.058.
222. Blázquez, A.B. Fluorescence-based biosensors for West Nile virus detection / A.B. Blázquez, J.C. Saiz, L. Herrero [et al.] // *Virulence*. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 2597663. DOI: 10.1080/21505594.2025.2597663.
223. Kaushik, A. A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein / A. Kaushik, A. Yndart, S. Kumar [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 9700. DOI: 10.1038/s41598-018-28035-3.
224. Ribeiro, E.M.D.C. Direct Detection of Orthoflavivirus via Gold Nanorod Plasmon Resonance / E.M.D.C. Ribeiro, B.D.P. Dias, C.S. Ferreira [et al.] // *Sensors*. – 2025. – Vol. 25. – № 15. – P. 4775. DOI: 10.3390/s25154775.

225. Олефир Ю. В. Отечественный препарат иммуноглобулина человека для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита / Олефир Ю. В., Меркулов В. А., Воробьева М. С. [и др.]. – 2015. – № №6.
226. Hedin, W. Severe Tick-Borne Encephalitis (TBE) in a Patient with X-Linked Agammaglobulinemia; Treatment with TBE Virus IgG Positive Plasma, Clinical Outcome and T Cell Responses / W. Hedin, P. Bergman, M. Akhirusessa [et al.] // *Journal of Clinical Immunology*. – 2024. – Vol. 44. – № 5. – P. 116. DOI: 10.1007/s10875-024-01718-5.
227. Sawant, J. A Review: Understanding Molecular Mechanisms of Antibody-Dependent Enhancement in Viral Infections / J. Sawant, A. Patil, S. Kurle // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 7. – P. 1240. DOI: 10.3390/vaccines11071240.
228. Roßbacher, L. Effect of previous heterologous flavivirus vaccinations on human antibody responses in tick-borne encephalitis and dengue virus infections / L. Roßbacher, S. Malafa, K. Huber [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95. – № 11. – P. e29245. DOI: 10.1002/jmv.29245.
229. Vasić, A. Knowledge, Attitudes, and Practices on Tick-Borne Encephalitis Virus and Tick-Borne Diseases within Professionally Tick-Exposed Persons, Health Care Workers, and General Population in Serbia: A Questionnaire-Based Study / A. Vasić, J. Bjekić, G. Veinović [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19. – № 2. – P. 867. DOI: 10.3390/ijerph19020867.
230. Kunze, M. Recommendations to Improve Tick-Borne Encephalitis Surveillance and Vaccine Uptake in Europe / M. Kunze, P. Banović, P. Bogović [et al.] // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – № 7. – P. 1283. DOI: 10.3390/microorganisms10071283.
231. Van Heuverswyn, J. Spatiotemporal spread of tick-borne encephalitis in the EU/EEA, 2012 to 2020 / J. Van Heuverswyn, L.K. Hallmaier-Wacker, J. Beauté [et al.]. – [Electronic resource] // *Eurosurveillance*. – 2023. – Vol. 28. – № 11. – Mode of access: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.11.2200543> (date of access: 23.05.2025).
232. Андаев Е.И. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации за 2015–2024 гг. и краткосрочный прогноз заболеваемости на 2025 г. / Андаев Е.И., Никитин А.Я., Толмачева М.И. [и др.] // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2025. – № №1.
233. Klaus C. Evaluation of serological tests for detecting tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in animals Vergleich serologischer Tests zur Bestimmung von Antikörpern gegen das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) bei Tieren / Klaus C, Beer M, Saier R [и др.] // *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* – 2011. – № Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 124: 11-12, 443-449 (2011). – С. 443-449. DOI: 10.2376/0005-9366-124-443.

234. Blacksell, S.D. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: The need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy / S.D. Blacksell, R.G. Jarman, M.S. Bailey [и др.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2011. – Т. 18. – № 12. – С. 2095-2101. DOI: 10.1128/CVI.05285-11.
235. Baryshnikova, V. Recombinant TBEV Protein E of the Siberian Subtype Is a Candidate Antigen in the ELISA Test System for Differential Diagnosis / V. Baryshnikova, Y. Turchenko, K. Tuchynskaya [et al.] // *Diagnostics*. – 2023. – Vol. 13. – № 20. – P. 3277. DOI: 10.3390/diagnostics13203277.
236. Отрашевская Е.В. Ретроспективный серологический анализ распространения flavivirusных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики / Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н. [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2022. – Т. 99. – № 2. – С. 215-224.
237. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. / [Electronic resource] // *Molecular Biology and Evolution*. – 1993. – Mode of access: <https://academic.oup.com/mbe/article/10/3/512/1016366/Estimation-of-the-number-of-nucleotide> (date of access: 22.07.2024).
238. Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – № 6. – P. 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
239. Lowry O. Protein measurement with the folin phenol reagent / Lowry O., Rosebrough N., Farr L., Randall R. – 1951. – Т. 193. – № 1. – С. 265-275.
240. McKeating, J. Neutralization of Virus / J. McKeating. – [Electronic resource] // *Practical Molecular Virology* / DOI: 10.1385/0-89603-191-8:89. – New Jersey : Humana Press, 1991. – Vol. 8. – P. 89-94. – Mode of access: <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-191-8:89> (date of access: 22.07.2024).
241. Reed, L.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // *American Journal of Epidemiology*. – 1938. – Vol. 27. – № 3. – P. 493-497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
242. Spencer, K.-A. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection / K.-A. Spencer, F.A. Osorio, J.A. Hiscox // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – № 30. – P. 5653-5659. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.02.053.
243. Nascimento, I.P. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies / I.P. Nascimento, L.C.C. Leite // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2012. – Т. 45. – № 12. – С. 1102-1111. DOI: 10.1590/S0100-879X2012007500142.

244. Potkonjak, A. Molecular Detection and Serological Evidence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Serbia / A. Potkonjak, T. Petrović, E. Ristanović [et al.] // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2017. – Vol. 17. – № 12. – P. 813-820. DOI: 10.1089/vbz.2017.2167.
245. Denis, J. High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel / J. Denis, S. Attoumani, P. Gravier [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2019. – Vol. 13. – № 9. – P. e0007747. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007747.
246. Chidumayo, N.N. Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins / N.N. Chidumayo, K. Yoshii, N. Saasa [et al.] // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2014. – Vol. 78. – № 4. – P. 373-378. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.014.
247. Rönnberg, B. Compensating for cross-reactions using avidity and computation in a suspension multiplex immunoassay for serotyping of Zika versus other flavivirus infections / B. Rönnberg, Å. Gustafsson, O. Vapalahti [et al.] // *Medical Microbiology and Immunology*. – 2017. – Vol. 206. – № 5. – P. 383-401. DOI: 10.1007/s00430-017-0517-y.
248. Illarionova, V. Inapparent Tick-Borne Orthoflavivirus Infection in *Macaca fascicularis*: A Model for Antiviral Drug and Vaccine Research / V. Illarionova, A. Rogova, K. Tuchynskaya [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 12. – P. 1754. DOI: 10.3390/vaccines11121754.
249. Matveev, A. New Neutralizing Epitope Exposed on the Domain II of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Glycoprotein E / A. Matveev, Y. Khlusevich, I. Kozlova [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 6. – P. 1256. DOI: 10.3390/v15061256.
250. Beasley, D.W.C. Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection / D.W.C. Beasley, M.R. Holbrook, A.P.A. Travassos Da Rosa [и др.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – T. 42. – № 6. – C. 2759-2765. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2759-2765.2004.
251. Wang, D. A multiplex ELISA-based protein array for screening diagnostic antigens and diagnosis of Flaviviridae infection / D. Wang, Y. Zheng, X. Kang [et al.] // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 34. – № 7. – P. 1327-1336. DOI: 10.1007/s10096-015-2353-6.
252. Ludolfs, D. Highly specific detection of antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus in humans using a domain III antigen and a sensitive immune complex (IC) ELISA / D. Ludolfs, M. Reinholz, H. Schmitz // *Journal of Clinical Virology*. – 2009. – Vol. 45. – № 2. – P. 125-128. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.03.016.
253. Ikawa-Yoshida, A. Development of an ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents: ELISA for TBE infection in rodents / A. Ikawa-Yoshida, K. Yoshii, K. Kuwahara [et al.] //

- Microbiology and Immunology. – 2011. – Vol. 55. – № 2. – P. 100-107. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00296.x.
254. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids / D. Hanahan // Journal of Molecular Biology. – 1983. – Vol. 166. – № 4. – P. 557-580. DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
255. Bertani, G. Studies on lysogenesis I: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli* / G. Bertani // Journal of Bacteriology. – 1951. – Vol. 62. – № 3. – P. 293-300. DOI: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
256. Kram, K.E. Rich Medium Composition Affects *Escherichia coli* Survival, Glycation, and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture / K.E. Kram, S.E. Finkel // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – Vol. 81. – № 13. – P. 4442-4450. DOI: 10.1128/AEM.00722-15.
257. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures / F.W. Studier // Protein Expression and Purification. – 2005. – Vol. 41. – № 1. – P. 207-234. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
258. Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems / K. Terpe // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – Vol. 72. – № 2. – P. 211-222. DOI: 10.1007/s00253-006-0465-8.
259. Rosano, G.L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G.L. Rosano, E.A. Seccarelli. – [Электронный ресурс] // Frontiers in Microbiology. – 2014. – Т. 5. – Режим доступа: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00172/abstract> (дата обращения: 31.10.2024).
260. Gomes, L. The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by *Escherichia coli* Biofilms / L. Gomes, G. Monteiro, F. Mergulhão // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 2. – P. 576. DOI: 10.3390/ijms21020576.
261. Palmer, I. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli* / I. Palmer, P.T. Wingfield. – [Electronic resource] // Current Protocols in Protein Science. – 2004. – Vol. 38. – № 1. – Mode of access: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps0603s38> (date of access: 30.10.2024).
262. Bornhorst, J.A. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags / J.A. Bornhorst, J.J. Falke. – [Electronic resource] // Methods in Enzymology. – Elsevier, 2000. – Vol. 326. – P. 245-254. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687900260588> (date of access: 30.10.2024).

263. Block, H. Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC) / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach [et al.]. – [Electronic resource] // *Methods in Enzymology*. – Elsevier, 2009. – Vol. 463. – P. 439-473. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687909630275> (date of access: 30.10.2024).
264. Tate, J. Interferences in immunoassay / J. Tate, G. Ward // *The Clinical Biochemist. Reviews*. – 2004. – Т. 25. – № 2. – С. 105-120.
265. Singh, A. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process / A. Singh, V. Upadhyay, A.K. Upadhyay [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2015. – Vol. 14. – № 1. – P. 41. DOI: 10.1186/s12934-015-0222-8.
266. Jungbauer, A. Current status of technical protein refolding / A. Jungbauer, W. Kaar // *Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 128. – № 3. – P. 587-596. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.12.004.
267. Clark, E.D.B. Protein refolding for industrial processes / E.D.B. Clark // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2001. – Vol. 12. – № 2. – P. 202-207. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00200-7.
268. Sugrue, R.J. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* / R.J. Sugrue, T. Cui, Q. Xu [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 1997. – Vol. 69. – № 1-2. – P. 159-169. DOI: 10.1016/S0166-0934(97)00151-1.
269. Zhang, Z.-S. High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice / Z.-S. Zhang, Y.-S. Yan, Y.-W. Weng [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2007. – Vol. 143. – № 2. – P. 125-131. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.012.
270. Байков И.К. Влияние различий в третьем домене гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом / Байков И.К., Матвеев А.Л., Емельянова Л.А. [и др.] // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2019. – Т. 23. – № 3. – С. 256-261.
271. Белавин П.А. Создание кандидатной вакцины против клещевого энцефалита на основе гибридного рекомбинантного flagG-protE-белка / Белавин П.А., Кунык Д.А., Протопопова Е.В. [и др.] // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2017. – Т. 21. – № 8. – С. 986-992.
272. Полтавченко А.Г. Рекомбинантный аналог домена III оболочечного гликопротеина вируса клещевого энцефалита и его применение для дифференциальной диагностики флавивирусных инфекций / Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В. [и др.] // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2024. – № 3. – С. 154-162.
273. Crowther, J.R. *ELISA Guidebook, The*. Vol. 149 / J.R. Crowther. – New Jersey : Humana Press, 2000. – Mode of access: <http://link.springer.com/10.1385/1592590497> (date of access: 03.10.2025). – [Electronic resource].

274. Hayrapetyan, H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications / H. Hayrapetyan, T. Tran, E. Tellez-Corrales, C. Madiraju. – [Electronic resource] // *ELISA : Methods in Molecular Biology* / R.S. Matson ed. . – New York, NY : Springer US, 2023. – Vol. 2612. – P. 1-17. – Mode of access: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-2903-1_1 (date of access: 03.10.2025).
275. Bezerra, M.F. Evaluation of a multi-species Protein A-ELISA assay for plague serologic diagnosis in humans and other mammal hosts / M.F. Bezerra, C.C. Xavier, A.M.P.D. Almeida, C.R.D.S. Reis // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2022. – Vol. 16. – № 5. – P. e0009805. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009805.
276. Pruvot, M. The modification and evaluation of an ELISA test for the surveillance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in wild ruminants / M. Pruvot, T.L. Forde, J. Steele [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2013. – Vol. 9. – № 1. – P. 5. DOI: 10.1186/1746-6148-9-5.
277. Garnier, R. Interpreting ELISA analyses from wild animal samples: Some recurrent issues and solutions / R. Garnier, R. Ramos, A. Sanz-Aguilar [et al.]. – [Electronic resource]. – 2017. – Mode of access: <https://www.repository.cam.ac.uk/handle/1810/269816> (date of access: 03.10.2025).
278. Онищенко Г.Г. Российская Федерация. Протокол «О совершенствовании эпидемиологического надзора и профилактике клещевого вирусного энцефалита в Российской Федерации» Приложение к протоколу заседания коллегии Роспотребнадзора от 2 июня 2010 г. / Онищенко Г.Г., Белых С.В. – 2010.
279. Андаев Е.И. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. / Андаев Е.И., Никитин А.Я., Толмачева М.И. [и др.] // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2023. – № №1.
280. Ackermann-Gäumann, R. Defining the “Correlate(s) of Protection” to tick-borne encephalitis vaccination and infection – key points and outstanding questions / R. Ackermann-Gäumann, P. Lang, K.D. Zens // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1352720. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1352720.
281. Bakker, J.W. Infection of wild-caught wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and yellow-necked mice (*A. flavicollis*) with tick-borne encephalitis virus / J.W. Bakker, E.L. Pascoe, S. Van De Water [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 21627. DOI: 10.1038/s41598-023-47697-2.
282. Барышникова, В. Рекомбинантный белок Е вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа как кандидат в качестве антигена в ИФА тест-системе для дифференциальной серодиагностики ортофлавивирусных инфекций / В. Барышникова, Ю. Турченко, К. Тучинская [и др.]. – [Электронный ресурс] // X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов — 2023: Сб. тез. X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов,

- биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов — 2023. – Novosibirsk State University, 2023. – С. 437-438. – Режим доступа: https://openbio.ru/openbio_tezis_2023.pdf (дата обращения: 14.05.2026).
283. Worku, D.A. Tick-Borne Encephalitis (TBE): From Tick to Pathology / D.A. Worku // *Journal of Clinical Medicine*. – 2023. – Vol. 12. – № 21. – P. 6859. DOI: 10.3390/jcm12216859.
284. Petrova, I.S. The case of imported Japanese encephalitis (JE) in a Russian traveler (2014) / I.S. Petrova, O.B. Muravev, T.N. Kuzmenko [и др.] // *Epidemiology and Infectious Diseases*. – 2014. – Т. 19. – № 4. – С. 60-62. DOI: 10.17816/EID40833.
285. Henderson, B.E. Immunologic Studies with Yellow Fever and Selected African Group B Arboviruses in Rhesus and Vervet Monkeys / B.E. Henderson, P.P. Cheshire, G.B. Kirya, M. Lule // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1970. – Т. 19. – № 1. – С. 110-118. DOI: 10.4269/ajtmh.1970.19.110.
286. Shinde, D.P. Potential role of heterologous flavivirus immunity in preventing urban transmission of yellow fever virus / D.P. Shinde, J.A. Plante, D. Scharon [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 9728. DOI: 10.1038/s41467-024-54146-9.
287. Gaythorpe, K.A. The global burden of yellow fever / K.A. Gaythorpe, A. Hamlet, K. Jean [et al.] // *eLife*. – 2021. – Vol. 10. – P. e64670. DOI: 10.7554/eLife.64670.
288. Garske, T. Yellow Fever in Africa: Estimating the Burden of Disease and Impact of Mass Vaccination from Outbreak and Serological Data / T. Garske, M.D. Van Kerkhove, S. Yactayo [et al.] // *PLoS Medicine*. – 2014. – Vol. 11. – № 5. – P. e1001638. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001638.
289. WHO. Eliminate yellow fever epidemics (EYE) strategy 2017-2026 [сайт] URL: <https://www.who.int/initiatives/eye-strategy#:~:text=The%20EYE%20strategy%20is%20a,contain%20outbreaks%20rapidly>. (дата обращения 19.06.2025) / WHO.
290. Hansen, C.A. The Present and Future of Yellow Fever Vaccines / C.A. Hansen, A.D.T. Barrett // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14. – № 9. – P. 891. DOI: 10.3390/ph14090891.
291. De Heus, P. West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria / P. De Heus, J. Kolodziejek, Z. Hubálek [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. 1873. DOI: 10.3390/v13091873.
292. Gomes Da Silva, P. Serological Cross-Reactivity in Zoonotic Flaviviral Infections of Medical Importance / P. Gomes Da Silva, J.A. Seixas Dos Reis, M. Nogueira Rodrigues [et al.] // *Antibodies*. – 2023. – Vol. 12. – № 1. – P. 18. DOI: 10.3390/antib12010018.
293. Chernokhaeva, L.L. 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 / L.L. Chernokhaeva, Y.V. Rogova, L.I. Kozlovskaya [и др.]. – [Электронный ресурс] // *Frontiers in*

Microbiology. – 2018. – Т. 9. – Режим доступа: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01487/full> (дата обращения: 11.07.2025).

294. Lai, C.-Y. 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 / C.-Y. Lai, W.-Y. Tsai, S.-R. Lin [et al.] // *Journal of Virology*. – 2008. – Vol. 82. – № 13. – P. 6631-6643. DOI: 10.1128/JVI.00316-08.

295. Agudelo, M. Broad and potent neutralizing human antibodies to tick-borne flaviviruses protect mice from disease / M. Agudelo, M. Palus, J.R. Keefe [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2021. – Vol. 218. – № 5. – P. e20210236. DOI: 10.1084/jem.20210236.

ПРОТОКОЛ ПОСТАНОВКИ ИФА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА sE ШТАММА СУХАР ВКЭ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНА

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Положительный рекомбинантный антиген (sE) (АГ+), отрицательный антиген (АГ-), контрольные положительная (С+) и отрицательная (С-) сыворотки, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), твин 20, сухое обезжиренное молоко, раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 2 М серная кислота (H₂SO₄), 96-луночный планшет для ИФА с высокой степенью связывания (Corning), пленка липкая для заклеивания планшета (4 штуки), пипетки и наконечники, спектрофотометр, термостат на 37 °С, холодильник на 4 °С, вторичные антитела конъюгированные пероксидазой хрена (HRP) соответствующие исследуемым антителам.

В качестве отрицательного антигена (АГ-) используется очищенная суспензия клеток *E. coli*, трансфецированных плазмидой pQE-32 (без вставки) после ИПТГ-индукции, солибилизации, аффинной хроматографии и обессоливания (12 нг на лунку)

Контрольная положительная сыворотка (С+) – сыворотка, содержащая антитела к ВКЭ.
Контрольная отрицательная сыворотка (С-) – сыворотка, не содержащая антитела к ВКЭ.

ПОДГОТОВКА, ПРОВЕДЕНИЕ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИФА

1. Подготовка планшета. Подготовить положительный антиген (sE) (АГ+) и отрицательный антиген (АГ-), разведенный в ФСБ из расчета необходимого количества лунок, по 90 мкл с концентрацией 12 нг на лунку. Использовать по две лунки для каждой исследуемой сыворотки. В лунки планшета внести положительный антиген и отрицательный антиген (АГ-). Планшет закрыть пленкой и убрать на 4 °С на 12 часов.

2. После инкубации, планшет промыть три раза ФСБ. В каждую лунку вносить не менее 300 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. После трех промывок отобрать ФСБ-Т дополнительно до полного осушения лунок, если требуется.

3. Приготовить раствор для блокировки неспецифических сайтов связывания: развести 4% обезжиренное молоко в ФСБ-Т (ФСБ с 0,05% Твин 20). Добавить по 90 мкл на лунку. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 час при температуре 37 °С.

4. Развести исследуемые и контрольные сыворотки в 4% обезжиренном молоке в ФСБ-Т. Минимальное разведение сывороток 1:50.

5. По окончании инкубации повторить п. 2.

6. В две лунки внести по 90 мкл отрицательного контрольного образца сыворотки (С-). В две лунки внести 90 мкл положительного контрольного образца (С+) для качественного анализа.

7. В остальные лунки внести по 90 мкл исследуемых образцов. Время внесения образцов не должно превышать 20 мин при использовании всех лунок планшета.

8. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 час при температуре 37 °С. По окончании инкубации повторить п. 2.

9. Внести во все используемые лунки планшета по 90 мкл вторичных антител, меченных пероксидазой хрена (HRP), соответствующих исследуемым первичным антителам.

10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 час при температуре 37 °С. По окончании инкубации повторить п. 2.

11. Внести во все используемые лунки планшета (в т.ч. со всеми контрольными образцами) ТМБ по 90 мкл. Для внесения раствора ТМБ следует использовать одноразовую пластиковую ванночку и наконечники. Время внесения образцов не должно превышать 20 мин при использовании всех лунок планшета. После внесения раствора убрать планшет в темное место, не пропускающее свет на 20 минут.

12. По истечении времени инкубации достать планшет и внести по 45 мкл 2М раствора серной кислоты (H₂SO₄) для остановки реакции.

13. Оптическую плотность определить путем измерения при длине волны равной 450 нм на спектрофотометре. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 минут.

14. Вычислить коэффициент порогового значения (K) для отрицательной (С-) и положительной (С+) сывороток по формуле:

$$K = \frac{\overline{OD}_{AG+}}{\overline{OD}_{AG-}}$$

где $\overline{OD}_{(AG+)}/\overline{OD}_{(AG-)}$ – это соотношение оптических плотностей, определенных при исследовании сывороток (С+) и (С-) с положительным антигеном (АГ+) к оптической плотности, определенной с теми же сыворотками с отрицательным антигеном (АГ-).

15. Результаты ИФА считать валидными при значениях K:

$$K_{C-} < 2$$

$$K_{C+} \geq 2$$

16. Если результат двух контролей соответствует валидности (п. 15), то можно проводить анализ исследуемых сывороток, как описано в п.14. Исследуемую сыворотку считать **положительной** при значении К больше или равной двум и **отрицательной** при значении К меньше двух, также как в п. 14.