

Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в новой перевиваемой линии клеток сибирской ночницы *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905)

Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А.

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Ляпунова Наталья Андреевна, e-mail: nataly2193@mail.ru

Резюме

Обоснование. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) в природе существует за счёт постоянной циркуляции между позвоночными животными и иксодовыми клещами. Для изучения особенностей репродукции ВКЭ в клетках позвоночных хозяев различных видов необходимо моделирование инфекции в перевиваемых клеточных линиях не только естественных, но и случайных хозяев ВКЭ.

Цель исследования. Исследовать возможность репродукции ВКЭ в клеточной линии случайного хозяина вируса – сибирской ночницы *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905).

Методы. Перевиваемая клеточная линия *M. sibiricus* была установлена с помощью серийного пассирования первичной культуры клеток почки. Перевиваемые клетки почки свиньи СПЭВ были использованы в качестве референс-культуры. Клетки заражали штаммом ВКЭ сибирского субтипа 92М и собирали образцы через каждые 2 часа в течение первых суток после заражения. Образцы отбирали ежедневно в течение 5 дней после заражения. Оценку количества внутриклеточной РНК ВКЭ положительной полярности (+РНК) проводили с помощью количественной реал-тайм ПЦР. Концентрацию инфекционного ВКЭ оценивали с использованием метода титрования ВКЭ по бляшкообразующим единицам.

Результаты. Перевиваемая линия клеток, обозначенная как MdbK, была создана после многократного пассирования суспензии клеток почки сибирской ночницы и использована для экспериментов на 20-м пассаже. Линия клеток MdbK способна поддерживать репликацию РНК ВКЭ и продуцировать инфекционный вирус. Концентрация вирусной РНК достигала 9,1 lg копий/мкл на третий день после заражения. Титр инфекционного ВКЭ составлял 5,5 БОЕ/мл и был отмечен на 4-й день. Как сразу после заражения, так и на всех стадиях репродуктивного цикла, концентрация внутриклеточной РНК ВКЭ в клетках MdbK была существенно ниже, чем в клетках СПЭВ. Количество инфекционного вируса в культуральной среде было снижено по сравнению с клетками СПЭВ.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что ВКЭ недостаточно адаптирован к внутриклеточной среде случайного хозяина.

Ключевые слова: флавивирсы, вирус клещевого энцефалита, РНК ВКЭ, инфекционный ВКЭ, репродукция ВКЭ, количественная ОТ-ПЦР, рукокрылые, *Myotis sibiricus*, взаимоотношения «вирус – хозяин»

Для цитирования: Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А. Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в новой перевиваемой линии клеток сибирской ночницы *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905). *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 271-275. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.36.

Features of Reproduction of Tick-Borne Encephalitis Virus in a New Cell Line of the Siberian Bat *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905)

Liapunova N.A., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A.

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Corresponding author: Natalia A. Liapunova, e-mail: nataly2193@mail.ru

Abstract

Background. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) in nature exists due to the constant circulation between vertebrate animals and tick viruses. To study the characteristics of reproduction of TBEV in the cells of vertebrate hosts of various species, it is necessary to simulate infection in the cell lines of both natural and accidental hosts of TBEV.

Aim. To study the possibility of reproduction of TBEV in the cell line of the kidney of Siberian bat *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905) – an accidental host of the virus.

Materials and methods. The cell line of Siberian bat *M. sibiricus* was established by serial passages of primary culture of kidney cells. The SPEV line porcine kidney cells were used as reference. Cells were infected with a strain of TBEV of the Siberian subtype 92M and both cells and cell culture fluids were sampled every 2 hours during first 24 hours post infection. In addition, the samples were collected daily up to 5 days post infection. Evaluation of the amount of intracellular RNA of TBEV of positive polarity (+RNA) was performed using quantitative real-time PCR. The concentration of infectious TBEV was evaluated using the method of titration TBEV on plaque forming units.

Results. The continuous cell line, designated as MdbK, was established from the kidney cell suspension of *M. sibiricus* and was used for experiments after 20 serial passages. MdbK cells were able to support the replication of TBEV RNA and production of infectious virus was also possible. The concentration of intracellular RNA had reached 9.1 lg copies/ μ l by day 3 post infection, whereas highest titer of infectious TBEV in cell culture fluid had comprised 5.5 PFU/ml and was detected by day 4. The concentration of intracellular RNA and the virus infectivity in MdbK cell line was significantly lower than in convenient SPEV line porcine kidney cell.

Conclusions. The results suggest the low fitness of TBEV to the intracellular environment of an accidental host.

Key words: *flavivirus, tick-borne encephalitis virus, TBEV RNA, infectious TBEV, reproduction of TBEV, quantitative RT-PCR in real time bats, Myotis sibiricus, host-virus interaction*

For citation: Liapunova N.A., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A. Features of Reproduction of Tick-Borne Encephalitis Virus in a New Cell Line of the Siberian Bat *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905). *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 271-275. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.36.

ОБОСНОВАНИЕ

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к семейству *Flaviviridae* и в Российской Федерации вызывает до 10 тыс. случаев заболеваний человека [1, 2]. В природе вирус существует за счёт постоянной циркуляции между дикими позвоночными животными и иксодовыми клещами в качестве хозяев и переносчиков. Мелкие грызуны хорошо адаптированы к инфекции ВКЭ и выполняют роль усиливающих и резервуарных хозяев вируса. Многие животные, такие как плотоядные, насекомоядные или рукокрылые, являются случайными хозяевами вируса. Виды животных, являющиеся случайными хозяевами, не так многочисленны, как грызуны, и, в силу своих экологических особенностей, редко подвергаются нападениям иксодовых клещей, поэтому они имеют сравнительно меньший шанс иметь контакт с ВКЭ в естественной среде. И хотя случайные хозяева вируса могут быть инфицированы возбудителем КЭ не только в лабораторных, но и в природных условиях, они не участвуют в циркуляции вируса [3]. Тем не менее, для изучения механизмов естественной циркуляции ВКЭ требуется моделирование инфекции у всех возможных участников экосистемы – как в клетках естественных, так и в клетках случайных позвоночных хозяев вируса. Сравнительный анализ результатов по изучению репродукции ВКЭ в клеточных линиях различных животных может дать дополнительную информацию о механизмах адаптации ВКЭ к определённым видам млекопитающих на эндемичных по КЭ территориях. Ранее нами было проведено исследование по изучению особенностей репродукции ВКЭ в новой клеточной линии восточноазиатской лесной мыши *Apodemus peninsulae* – естественного хозяина вируса [4]. Для изучения особенностей репродукции ВКЭ в клетках случайного хозяина мы создали новую перевиваемую линию клеток почки сибирской ночницы *M. sibiricus* (MdbK). Поскольку репликация вирусной геномной РНК является критичным для существования вируса процессом, который полностью зависит от реакции внутриклеточной среды хозяина и влияет на эффективность воспроизведения инфекционного вируса, в данной работе мы постарались изучить динамику репликации РНК ВКЭ, а также оценить эффективность выхода инфекционного ВКЭ в культуре клеток рукокрылых.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить особенности репродукции ВКЭ в клеточной линии сибирской ночницы *M. sibiricus* – случайного хозяина вируса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры и вирус клещевого энцефалита

Сибирских ночниц отлавливали энтомологическим сачком на местах зимовки в пещере «Охотничья» (Иркутская область, Иркутский район). Видовую принадлежность рукокрылых определяли по морфологическим

признакам согласно [5]. Первичные культуры клеток *M. sibiricus* получали из трипсинизированных гомогенатов почки. Перевиваемая культура была установлена в ходе 20 серийных пассажей. Полученная клеточная линия адгезивная, состоит из клеток эпителиоидной формы, обладает стабильными культуральными и морфологическими характеристиками и в дальнейшем обозначается акронимом MdbK. Культура клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ была приобретена в «Коллекции клеточных линий человека и животных для исследований в области вирусологии» (ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург). Поддержание культуры клеток осуществляли на среде RPMI1640 с добавлением антибиотиков и 5% или 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone (ThermoScientific, Великобритания) для культур СПЭВ и MdbK соответственно. Для заражения использовали монослои клеток, выращенные в 24-луночных планшетах с плотностью 150 000 клеток на лунку.

Для изучения репликации ВКЭ в клетках использовали изолят сибирского субтипа ВКЭ 92М [6]. Исходный препарат вируса приготавливали путём однократного пассажа в клетках СПЭВ. После этого стоковую вирусную суспензию аликвотировали и хранили при -80°C . Концентрацию инфекционного вируса в стоковой суспензии определяли титрованием бляшкообразующих единиц (БОЕ) в культуре клеток СПЭВ [7] и выражали в виде десятичного логарифма БОЕ в миллилитре суспензии (\log_{10} БОЕ/мл). Заражение культур клеток производили с расчётной множественностью инфекции 1 БОЕ на клетку. Вирус адсорбировали при температуре 37°C в течение 1 часа. После этого инокулят удаляли, клетки промывали трижды средой RPMI1640 без добавления ЭТС и наслаивали сверху среду поддержки (RPMI1640 с добавлением антибиотиков и 2%-ной ЭТС). Отбор образцов для оценки внутриклеточной концентрации РНК ВКЭ положительной полярности (+РНК) производили сразу после нанесения среды поддержки (0 часов после заражения), а также через 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20 и 24 часов, а также на второй, третий, четвёртый и пятый день после заражения. При отборе образцов среду поддержки удаляли, монослой клеток промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,4), отделяли от дна лунки, ресуспендировали в 100 мкл ФСБ и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Выделение РНК производили немедленно после сбора из равных для обеих культур количеств клеток. Выделенную РНК до исследования хранили в изопропанолу при -80°C . Все эксперименты проводили в трёх независимых повторах.

Очистка РНК, обратная транскрипция и ПЦР

Выделение РНК проводили с помощью коммерческого комплекта реагентов «РИБО-преп» (Amplisens, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Для удаления случайных фрагментов ДНК, которые могли послужить в качестве неспецифичных праймеров при обратной транскрипции, полученную РНК обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазой I (Thermo

Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Итоговую очистку РНК производили методом фенольной экстракции с использованием набора RNeasy Total RNA isolation system (Promega, США). Очищенную суммарную РНК растворяли в 30 мкл стерильной бидистиллированной воды и немедленно использовали для синтеза кДНК. Комплементарную ДНК к вирусной РНК положительной полярности (кДНК) получали с помощью набора для обратной транскрипции RevertAid M-Mlv reverse transcriptase (Fermentas, Литва). В качестве праймера использовали олигонуклеотид 11154R 5'-AGCGGTGTTTTCCG-3'. В количественной ПЦР использовали 1 мкл полученной кДНК.

Количественную ПЦР проводили согласно методике M. Schwaiger и P. Cassinotti с модификациями [8]. Реакцию проводили в объёме 25 мкл в амплификаторе C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Реакционная смесь содержала 1 ед. полимеразы HSTaq (Евроген, Москва), 2,5 мкл оптимизированного реакционного буфера (Евроген, Москва), 0,25 ммоль каждого dNTP, праймеры F-TBE1 5'-GGGCGGTCTTGTCTCC-3' и R-TBE1 5'-ACACATCACCTCTTGTACAGACT-3' в концентрации 50 нмоль и 300 нмоль соответственно, а также зонд TBE-Probe-WT 5'-(FAM)TGAGCCACCATCACCCAGACACA(RTQ1)-3' в концентрации 200 нмоль (Синтол, Москва). Режим ПЦР включал предварительный прогрев при 95 °C в течение 10 мин с последующими 45 циклами: 95 °C – 15 с, 60 °C – 1 мин. Регистрацию результатов проводили по каналу FAM на стадии 60 °C. Циклом количественного определения (quantification cycle, Cq) считали первый цикл, при котором интенсивность флуоресцентного сигнала превышала 10 стандартных отклонений от фона. Фоновая составляющая учитывалась с 1-го по 10-й цикл. Расчёты выполняли с помощью программы BioRad CFX Manager v3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Относительное количество РНК в тестируемых образцах определяли на основе стандартной кривой, полученной при параллельной амплификации ранее разработанной нами панели стандартных образцов синтетической вирусной +РНК [9].

На ранних сроках инфекции (0–24 часа после заражения) полученную концентрацию РНК пересчитывали на количество клеток, использованных для выделения РНК. Концентрацию РНК выражали в количестве копий +РНК на одну клетку. Из-за разного цитопатического действия ВКЭ на исследуемые культуры клеток на более поздних сроках инфекции (1–5-й день после заражения) оценивали относительную концентрацию РНК в 1 мкл раствора после экстракции из 100 мкл клеточной суспензии. В каждом тесте были предусмотрены положительный и отрицательный контроли.

Способ представления результатов исследования

Результаты представлены в виде средних значений трёх независимых воспроизведений эксперимента. Эффективность ПЦР выражали в процентах и рассчитывали по формуле $\{(10^{[-1/k]-1}) \times 100\}$, где k – угловой коэффициент (slope) стандартной кривой. Соответствие определения концентрации ДНК линейной модели оценивали по коэффициенту детерминации R^2 , реакцию считали линейной при $R^2 > 0,98$. Для оценки вариабельности наблюдений рассчитывали стандартное отклонение средних значений. Выпадающие значения концентрации РНК

исключали с помощью квартильного метода [10]. Оценку статистической значимости межгрупповых различий производили с помощью t-критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Расчёты производили с помощью программы MS Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Репликация РНК ВКЭ в культурах клеток MdbK и СПЭВ

На начальном этапе инфицирования (0 часов после заражения) в клетках MdbK концентрация внутриклеточной +РНК была существенно ниже, чем в клетках СПЭВ – в среднем 1,2 копии на каждую клетку против 7,6 копий соответственно ($p = 0,0005$, рис. 1). Через 4 часа после заражения не отмечено существенных отличий в концентрации РНК между культурами клеток, причём выравнивание концентраций произошло за счёт возрастания количества вирусной +РНК в клетках MdbK ($p = 0,301$, рис. 1). Через 8 часов после заражения в клетках MdbK концентрация +РНК осталась на уровне 4 часов, тогда как в клетках СПЭВ существенно возросла ($p = 0,0007$). В культуре клеток MdbK нарастание +РНК ВКЭ впервые отмечено через 10 часов после заражения, и к 12 часам её концентрация достигла $2 \log_{10}$ копий на клетку. В клетках СПЭВ в период с 8 до 12 часов после заражения количество +РНК росло более интенсивно и увеличилось примерно в 20 раз с 1,4 до 2,7 \log_{10} копий на клетку, что существенно больше, чем в клетках MdbK ($p = 0,00014$). В интервале между 12 и 14 часами после заражения отмечалось либо некоторое снижение концентрации +РНК (MdbK), либо сильное замедление скорости её нарастания (СПЭВ), после чего интенсивное увеличение количества +РНК продолжалось в обеих культурах клеток. На 16-м часу после заражения различия между MdbK и СПЭВ достигали максимума – 2,7 \log_{10} и 4,4 \log_{10} копий на клетку соответственно ($p = 0,0000002$). Далее эти различия незначительно уменьшались (рис. 1).

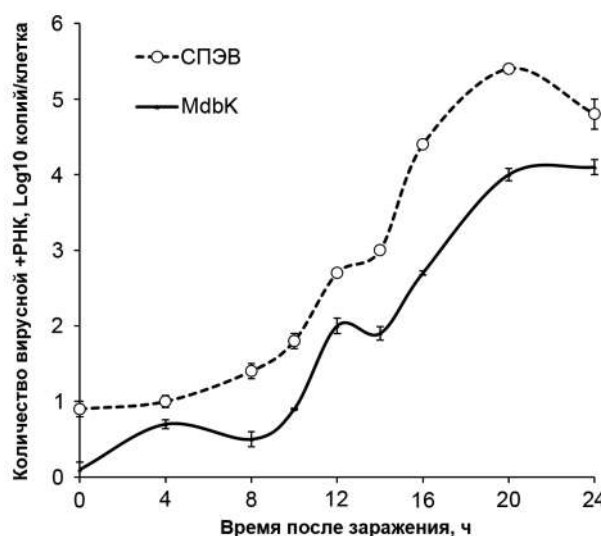


Рис. 1. Репликация РНК ВКЭ в культурах клеток. Динамика репликации +РНК ВКЭ на ранних стадиях инфекции. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

Fig. 1. Replication of TBEV RNA in cell cultures. Dynamics of TBEV +RNA replication in the early stages of infection. Error bars display standard deviation based on three independent repetitions

После первого дня инфекции концентрация +РНК в клетках MdbK продолжала нарастать, хотя и была существенно ниже, чем в клетках СПЭВ ($p = 0,006$, рис. 2). На третий день после заражения в клетках MdbK отмечены максимальные концентрации +РНК – $9,1 \log_{10}$ копий/мкл, причём в клетках СПЭВ относительная концентрация +РНК ВКЭ в это же время была примерно в 100 раз выше – $11 \log_{10}$ копий/мкл ($p = 0,04$, рис. 2). К четвёртому дню после заражения концентрация РНК ВКЭ в клетках MdbK стабилизировалась чуть ниже максимальных значений и далее оставалась неизменной (рис. 2). В клетках СПЭВ концентрация РНК продолжала нарастать и выходила на плато только на 5-й день после заражения (рис. 2).

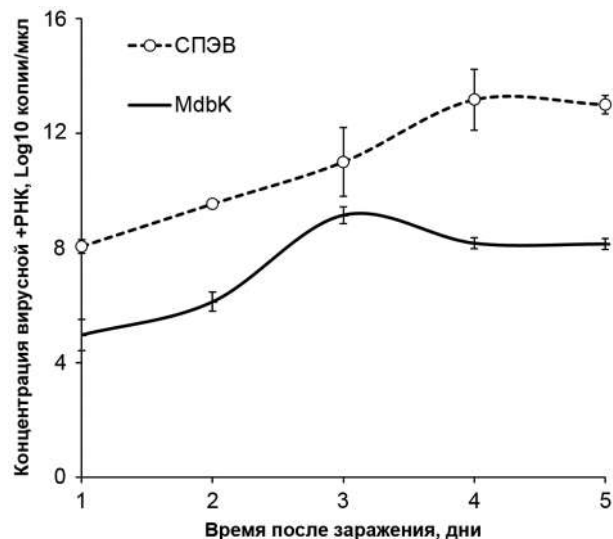


Рис. 2. Концентрация внутриклеточной +РНК ВКЭ в ходе длительной инфекции. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

Fig. 2. Concentration of intracellular +RNA of TBEV during prolonged infection. Error bars display standard deviation based on three independent repetitions

Динамика репродукции инфекционного ВКЭ в культурах клеток MdbK и СПЭВ

Как видно из графика, практически на протяжении всего эксперимента концентрация инфекционного вируса была ниже в клеточной линии случайного хозяина MdbK, чем в клетках СПЭВ (рис. 3). На начальном этапе исследования (0–4 часа после заражения) в клеточных линиях MdbK и СПЭВ была отмечена небольшая разница в количестве инфекционного ВКЭ и варьировала от $0,7–0,9 \log_{10}$ БОЕ/мл в пользу СПЭВ. Разница концентраций двух клеточных линий начала увеличиваться уже через 8–12 часов после заражения. В этом интервале времени в клеточной линии СПЭВ отмечается первичный интенсивный рост концентрации инфекционного ВКЭ, обусловленный выходом из клеток первой генерации вирионов в клетках СПЭВ в этом интервале времени. В клетках MdbK появление первой генерации было отмечено через 12–16 часов после заражения. Интересно, что в обеих культурах клеток через 14 часов после заражения отмечается стабилизация (СПЭВ) или снижение (MdbK) концентрации внутриклеточной РНК, что может быть связано с её выведением из внутриклеточной среды в виде геномной РНК вирионов (рис. 3).

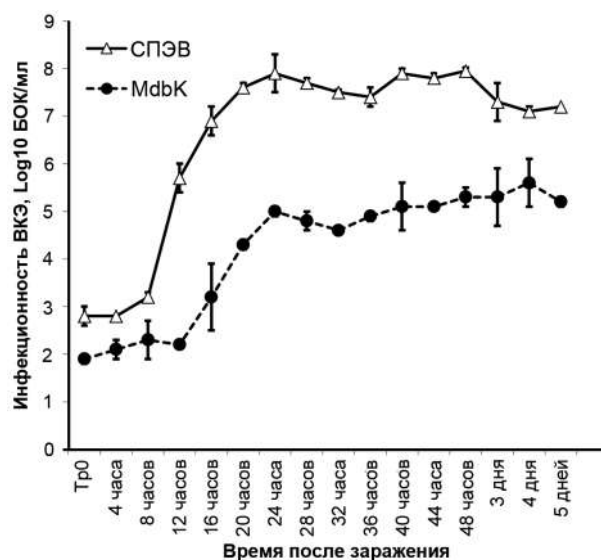


Рис. 3. Динамика репродукции инфекционного ВКЭ в культурах клеток MdbK и СПЭВ. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

Fig. 3. The dynamics of reproduction of infectious TBEV in MdbK and PS cell cultures. Error bars display standard deviation based on three independent repetitions

Первые сутки инфекции количество БОЕ в обеих клеточных линиях продолжало увеличиваться вплоть до 24 часов инфекции, достигнув на этой точке своего максимума. При этом по истечении 16 часов было достигнуто максимальное различие в показателях концентрации инфекционного ВКЭ в двух рассматриваемых клеточных линиях, составившее $3,7 \log_{10}$ БОЕ/мл. В промежутке от 24 до 48 часов разница в количестве БОЕ клеточных линий MdbK и СПЭВ варьировала от $2,5–2,9 \log_{10}$ БОЕ/мл с тенденцией к уменьшению. На вторые сутки инфекции было отмечено небольшое снижение концентрации инфекционного ВКЭ в рассматриваемых клеточных линиях: через 36 часов – в клетках СПЭВ, через 32 часа – в клетках MdbK. В течение оставшейся части вторых суток в обеих клеточных линиях вновь наблюдался рост количества инфекционного вируса. При исследовании более длительной инфекции – от 3 до 7 дней – в клеточной линии СПЭВ было отмечено заметное снижение количества инфекционного ВКЭ, какое не наблюдалось в клеточной линии случайного хозяина MdbK.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что перевиваемая линия клеток почки сибирской ночницы MdbK способна поддерживать репликацию ВКЭ Сибирского субтипа. Однако проникновение вируса внутрь клеток, эффективность репликации РНК и продукция инфекционного вируса были снижены по сравнению с репликацией в культуре клеток почки эмбриона свиньи, которая является общепринятой лабораторной моделью инфекции ВКЭ. Воспроизведение инфекционного вируса с явным замедлением и в меньших титрах по сравнению с таковым в клетках СПЭВ может быть следствием того, что в клетках случайного хозяина, вдобавок к сниженной эффективности репликации РНК, затруднены этапы сборки вириона и выхода зрелого инфекционного вируса из клетки.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 129-146. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1
2. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008; 371(9627): 1861-1871. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4
3. Süß J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 2003; 21(Suppl 1): S19-S35. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00812-5
4. Хаснатинов М.А., Болотова Н.А., Миловидов К.С., Кондратов И.Г., Данчинова Г.А. Репликация РНК вируса клещевого энцефалита в новой перевиваемой линии клеток естественного хозяина *Apodemus peninsulae*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2018; 36(1): 41-45. doi: 10.18821/0208-0613-2018-36-1-41-45
5. Krusko SV, Borisenko AV, Ivanova NV, Lim BK, Eger JL. Genetic diversity of northeastern palaeartic bats as revealed by DNA barcodes. *Acta Chiropterologica.* 2012; 14(1): 1-14. doi: 10.3161/150811012X654222
6. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Злобин В.И., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А. и др. Вирус клещевого энцефалита в Монголии. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2012; (4): 9-12.
7. Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of Togaviruses. In: Mahy BWJ (ed.). *Virology: A Practical Approach.* IRL Press; 1985: 43-48.
8. Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol.* 2003; 27(2): 136-145. doi: 10.1016/S1386-6532(02)00168-3
9. Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А. Оптимизация методики количественной ОТ-ПЦР для оценки концентрации геномной +РНК вируса клещевого энцефалита. *Acta biomedica scientifica.* 2019; 4(5): 116-121. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.18

Сведения об авторах

Ляпунова Наталья Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nataly2193@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Хаснатинов Максим Анатольевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Данчинова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: dan-chin@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6705-3070>

Information about the authors

Natalya A. Liapunova – Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nataly2193@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Maxim A. Khasnatinov – Cand. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Laboratory of Arthropod Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Galina A. Danchinova – Dr. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: dan-chin@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6705-3070>

10. Walpole RE, Myers RH, Myers SL, Ye K. *Probability & Statistics for Engineers & Scientists, 8th ed.* Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.; 2007.

REFERENCES

1. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 129-146. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1
2. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008; 371(9627): 1861-1871. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4
3. Süß J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 2003; 21(Suppl 1): S19-S35. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00812-5
4. Khasnatinov MA, Bolotova NA, Milovidov KS, Danchinova GA, Kondratov IG. Replication of RNA of tick-borne encephalitis virus in new transferable cell lines of the natural host *Apodemus peninsulae*. *Molecular genetics, microbiology and virology.* 2018; 33(1): 49-54. doi: 10.3103/S0891416818010068. (in Russ.)
5. Krusko SV, Borisenko AV, Ivanova NV, Lim BK, Eger JL. Genetic diversity of northeastern palaeartic bats as revealed by DNA barcodes. *Acta Chiropterologica.* 2012; 14(1): 1-14. doi: 10.3161/150811012X654222
6. Khasnatinov MA, Danchinova GA, Zlobin VI, Lyapunov AV, Arbatskaya YeV, Chaporgina YeA, et al. Tick-borne encephalitis virus in Mongolia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk).* 2012; (4): 9-12. (In Russ.)
7. Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of Togaviruses. In: Mahy BWJ (ed.). *Virology: A Practical Approach.* IRL Press; 1985: 43-48.
8. Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol.* 2003; 27(2): 136-145. doi: 10.1016/S1386-6532(02)00168-3
9. Lyapunova NA, Khasnatinov MA, Danchinova GA. Optimization of a quantitative real-time RT-PCR technique for evaluation of concentration of genomic +RNA of tick-borne encephalitis virus. *Acta biomedica scientifica.* 2019; 4(5): 116-121. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.18. (In Russ.)
10. Walpole RE, Myers RH, Myers SL, Ye K. *Probability & Statistics for Engineers & Scientists, 8th ed.* Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.; 2007.

Статья получена: 05.06.2020. Статья принята: 16.09.2020. Статья опубликована: 26.12.2020.

Received: 05.06.2020. Accepted: 16.09.2020. Published: 26.12.2020.