

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ
ПРИМАТОЛОГИИ

На правах рукописи

ЛЕНШИН
СЕРГЕЙ ВИКТОРОВИЧ

АНАЛИЗ ВИРУСНОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ПРИРОДНЫХ РЕЗЕРВУАРАХ
ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ В СУБТРОПИЧЕСКОЙ ЗОНЕ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
03.02.02 — Вирусология

научный доклад

Научный руководитель:
к.м.н., Вышемирский Олег Иванович

Научный консультант:
д.б.н., Альховский Сергей Владимирович

СОЧИ – 2021

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Актуальность темы исследования

Природа никогда не стоит на месте, в ответ на изменяющиеся условия среды, жизнь отвечает новыми формами. Вирусы не исключение. Дикая природа это гигантский экспериментальный котёл в котором отбираются наиболее «эффективные» штаммы.

После введения в повседневную жизнь санитарных норм, изобретения антибиотиков и вакцинации бактериальные и вирусные антропонозные инфекции взяты под контроль и успехи в борьбе с ними связаны с организацией вышеуказанных мер. По этому природно-очаговые вирусные инфекции стали актуальнейшей проблемой для современной медицины.

За последние 30 лет вирусные природно-очаговые инфекции «подарили» миру вирус Хендра в 1994 г., вирус Нипах в 1999 г., ТОРС в 2002, MERS с 2013 по н.в. и, наконец SARS-CoV-2 с 2019 по н.в. Во всех случаях, так или иначе, природными резервуарами являются рукокрылые.

Помимо вышеуказанных инфекций рукокрылые это резервуар для более чем 30 семейств вирусов, из которых следует отметить рабдовирусы (бешенство), филовирусы (Эбола и Марбург).

Ввиду особенностей физиологии рукокрылые не показывают клинической картины при многих инфекциях смертельных для других животных.

Анализируя актуальность проблемы рукокрылых, как источника вирусных природно-очаговых заболеваний нельзя не учесть факт тесных контактов и «наступления» человека на их среду обитания. Человек расширяя селитебельную зону лишает летучих мышей их привычных мест обитания и животным приходится адаптироваться к тем условиям которые предлагает человек. И рукокрылые активно заселяют чердаки и подвалы зданий, так же люди активно посещают места естественного обитания летучих мышей — пещеры, где неизбежно контактируют с выделениями зверьков.

Следует отметить, что последние, наиболее значимые вспышки заболеваний ТОРС, MERS и SARS-CoV-2 относятся к семейству *Coronaviridae*, для которых летучие мыши семейства подковоносовые (*Rhinolophidae*) являются естественным природным резервуаром и, что важно, территория Северного Кавказа это их северная граница.

Другой не менее важный природный резервуар вирусных инфекций это комары. Они являются переносчиками таких эпидемически важных инфекций как Денге, Желтая лихорадка, Чикунгунья, Зика, лихорадка Западного Нила и прочие. Из всех комаров, населяющих Краснодарский край, наиболее значимыми переносчиками вышеперечисленных инфекций являются *Ae. albopictus*. Эти насекомые фиксируются на Кубани с 2012 г.

На территории Европы *Ae. albopictus* обитает в аналогичных климатических зонах и вызывает аутохтонные вспышки вирусных инфекций, таких как Денге (Мадейра 2012-2013 гг., Франция 2010, 2013, 2015 гг.), Чикунгунья (Италия 2007, 2017 гг., Франция 2014 г.), Зика (Франция 2019 г).

Исследование виroma методом *de novo* рукокрылых и комаров *Ae. albopictus* дало широкую картину о вирусном разнообразии этих природных резервуаров.

Комары для исследований отлавливались вдоль побережья Краснодарского края в его субтропической зоне от Адлера до г. Туапсе. Рукокрылые отлавливались на территории Сочинского Национального парка. Было проведено метагеномное исследование вирусного разнообразия комаров *Ae. albopictus* и рукокрылых Сочинского Национального Парка (малого, большого и южного подковоносов).

Таким образом исследование природных резервуаров методом секвенирования *de novo* даёт возможность проанализировать вирусное разнообразие при отсутствии

специфических ПЦР праймеров и видят генотипы вирусов которые могут быть потенциальными источниками заражения для человека.

Цели и задачи исследования

Целью данного исследования было анализ вирусного разнообразия в природных резервуарах субтропической зоны Краснодарского края — комаров *Ae. albopictus* и рукокрылых Сочинского Национального парка методом высокопродуктивного секвенирования нового поколения *de novo*.

Задачи:

1. Сбор биологического материала: самки комаров *Ae. albopictus* на точках вдоль Черноморского побережья Краснодарского края и материал от рукокрылых (мазки из зева и помёт).
2. Проведение метагеномного секвенирования *de novo* полученных образцов.
3. Биоинформационный анализ полученных результатов.
4. Филогенетический анализ выявленных сиквенсов вирусов.
5. Проведение эксперимента по заражению линии комаров, берущих начало с территории г. Сочи по способности переносить вирус лихорадки Западного Нила.

Научная новизна работы

1. Впервые проведен метагеномный анализ комаров *Ae. albopictus* Черноморского побережья Краснодарского края.
2. Впервые проведен метагеномный анализ рукокрылых (сем. Подковоносых, лат. *Rhinolophidae*) Сочинского национального парка.
3. Впервые обнаружены на территории Российской Федерации 2 SARS-подобных коронавируса.
4. Доказана способность линий комаров *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, берущих начало из г. Сочи переносить вирус лихорадки Западного Нила.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе метагеномного исследования рукокрылых Сочинского Национального Парка, впервые на территории России, установлено наличие циркуляции SARS-подобных коронавирусов в популяции подковоносов.

Проведён эксперимент, по результатам которого, была доказана способности линии комаров, отловленных на территории г. Сочи, переносить вирус лихорадки Западного Нила.

Результаты метагеномного исследования рукокрылых Сочинского Национального парка внесены в GenBank были депонированы нуклеотидные последовательности 2 выделенных изолята коронавирусов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты метагеномного исследования комаров *Ae. albopictus* отловленных вдоль Черноморского побережья Краснодарского края, свидетельствуют об отсутствии в них возбудителей вирусных природно-очаговых инфекций, опасных для человека.
2. Результаты метагеномного исследования рукокрылых Сочинского Национального парка зафиксировано, впервые в России, циркуляция двух SARS-подобных коронавирусов.
3. По результатам эксперимента доказана способность линий комаров *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, берущих начало с территории г. Сочи, переносить вирус лихорадки Западного Нила.

Апробация работы

О достоверности результатов свидетельствует использование сертифицированных тест-систем для различных этапов полимеразной цепной реакции, очистки образцов и секвенирования, а также проведение филогенетического анализа.

Результаты диссертационной работы были представлены в материалах международной научно-практической конференции «Молодые ученые в биологии и медицине» (Сочи 18-19 апреля 2019 год).

По теме диссертации опубликовано 2 научных статей, обе статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проводилось на базе ФГБНУ НИИ «Медицинской приматологии», ФГБУ Сочинский Национальный Парк и а базе лаборатории биотехнологии, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы самки комаров *Ae. albopictus*, отловленные в 2018 г; оральные смывы и фекальные образцы летучих мышей, собранные в период с 2018 по 2020 гг.

Отлов комаров

Сбор самок комаров *Ae. albopictus* проводился в Республике Абхазия – г. Гагры, в г. Сочи – Городское кладбище Адлерского района, территория питомника обезьян ФГБНУ НИИ «Медицинской приматологии», в г. Туапсе. Отлов осуществлялся эксгаустером методом «на себе» согласно Методическим указаниям «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней» МУ 3.1.3012-12 в местах выплода (на кладбищах, вблизи водоёмов и проч.) днём и на закате в период с 15 июля по 15 сентября.

В лабораторию комары доставлялись в термоконтейнере при температуре +4 °С.

Пробоподготовка, выделение и выявление РНК из комаров для ПЦР исследования

Пробоподготовка. Для приготовления суспензий комаров использовалась стерильная фарфоровая чашка и стерильный пестик. Предварительно сформированы пулы комаров (не более 50 особей). Комаров гомогенизировали в стерильном фосфатном буфере из расчета на 1 комара – 30 мкл раствора. Центрифугировали пробы при 10 000 g в течение 1 мин. Затем отбирали 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

Выделение. Для выделения РНК применяли комплект реагентов «РИБО-сорб» производства «ИнтерЛабСервис».

Выявление. Использовался набор реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® WNV-FL"R-V53(RG,iQ,Mx) для прибора RotorGene производства «ИнтерЛабСервис» регистрационное удостоверение № ФСР2011/11503 от 05.03.19 г..

Подбор праймеров для обнаружения коронавирусов

Праймеры и зонды для специфического обнаружения обнаруженных коронавирусов были разработаны на основе полученных последовательностей программным обеспечением Beacon 7.0 (Premier Biosoft, США). ОТ-ПЦР в реальном времени проводили с помощью

TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix (ThermoFisher Scientific, США) и тотальной РНК, выделенной реагентом TRIzol LS из отдельных мазков из полости рта и образцов кала.

Постановка эксперимента по способности лабораторных линий комаров родов *Aedes*, *Culex* и *Anopheles*, происходящих из Сочи, переносить вирус лихорадки Западного Нила.

Лабораторные линии комаров имели свое начало от диких особей самок, отловленных в Адлерском районе города Сочи в 2013 году.

Для заражения использовали штамм вируса ЛЗН Eg 101, который предварительно пассировали в мозге беспородных белых мышей-сосунков.

Эксперимент включал следующие этапы:

1. Интрацеребральное заражение мышей-сосунков (1-2 сут.) вирусом ЛЗН штамм Eg 101 в разведении 1:10. На 5-7 сутки, после появления клинических признаков заражения из мозга мышей-сосунков была приготовлена суспензия.
2. 10% суспензией мозга мышей-сосунков были заражены внутрибрюшинно самки беспородных белых мышей весом 20-24 г. (6 шт.) 0,1 мл. 5-6 дневные цыплята бройлеры также заражались 10% суспензией мозга мышей-сосунков внутримышечно в бедро в объеме 0,1 мл. (6 шт.) в бедро в разведении 1:10.
3. Каждый вид комаров допускали к питанию на одной мыши и одном цыпленке в течение ночи. Движения мышей и цыплят в садке с комарами были ограниченными, при этом доступ к воде и корму был постоянным.
4. Напитавшихся самок комаров держали в отдельных садках с подкормкой раствором сахара и доступом к воде.
5. Через 96 часов, после полного переваривания крови, из комаров готовили суспензию, которую обследовали real-time ПЦР на наличие РНК вируса ЛЗН.

Отлов рукокрылых и сбор биоматериала

Места отлова. Отлов рукокрылых проводился в пещерах Сочинского национального парка, (Колокольная, Хоста-1, Хоста-2 («Музейная»), Партизанская, «Чёртова нора», грот. «Очажный»), так же рукокрылые отлавливались в подвале лабораторного корпуса ФГБНУ НИИ «Медицинской приматологии», в здании клуба пос. Измайловский (г. Сочи), «Домик пачечника» и руинах бомбоубежища времен ВОВ оба в районе пос. Макопсе.

Биоматериал. Отлов рукокрылых для сбора оральных смывов, помёта и эктопаразитов проводился в местах естественного обитания, в летних местах днёвок и зимовок. Летом – чердаки зданий, заброшенные дома. Ввиду активности зверьков их отлов осуществлялся сетями при вылете на охоту. В зимний период отлов происходил непосредственно в местах зимовок – пещеры, подвалы зданий. Отлов осуществлялся вручную либо сочком.

Оральные смывы собирались стерильным урогинетальным зондом типа «А», после взятия образца кончик зонда, помещался в транспортную среду (0,5 мл физиологического раствора с добавлением 2% р-ра гентамицина) и обламывался, доставлялся в лаборатория в термосумке при +4 °С.

Сбор помёта летучих мышей осуществлялся следующим методом. Отловленный зверёк помещался в бязевый мешочек, в котором он находился около 20-60 минут, за это время животное опорожняло кишечник. Собраный помёт транспортировался в пробирке типа эппиндорф при +4 °С в термосумке. Хранение биоматериала осуществлялось при -70 °С.

Органы. По договорённости с сотрудниками ГКУ КК «Природный орнитологический парк в Имеретинской низменности», рукокрылые, попавшиеся в сети для отлова птиц и погибшие в них летучие мыши передавались для изъятия органов для дальнейшего исследования. В работу брались только животные, погибшие менее суток. Для исследования использовались следующие органы: головной мозг, лёгкие и сердце.

Отобранные органы хранились в криопробирках при минус 70 °С до этапа пробоподготовки на метагеномное секвенирование.

Выделение РНК для метагеномного секвенирования и получение ДНК-библиотек

РНК выделяли набором «RNeasy mini kit» (QIA-GEN, Германия) на автоматической станции QIAcube (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией. Концентрацию РНК измеряли с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, США). Подготовка библиотек и секвенирование. 100 нг тотальной РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы (50 мМ трис-НСl (рН 8,3, температура 25°С), 50 мМ КСl, 4 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, dNTP (1 мМ каждого) и гексапраймер (0,2 мкг)) при 85 °С в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium (Thermo Scientific, США) и 20 ед. ингибитора РНаз RNasin (Promega, США). Инкубировали при 25 °С 10 мин, далее при 42 °С 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70 °С 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с использованием набора NEBNext® mRNA Second Strand Synthesis Module (NEB, США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали, используя набор MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Германия), на автоматической станции QIAcube.

Для получения ДНК-библиотек из дцДНК использовали набор TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 (Illumina, США) в соответствии с инструкцией. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза «QIAxcel Advanced System» (QIAGEN, Германия). Измерение молярности полученных библиотек проводили методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве «Sequencing Library qPCR Quantification Guide» (Illumina, США).

Секвенирование библиотек проводилось на приборе HiSeq4000 (Illumina, США) на базе Ресурсного центра «БиоБанк» Научно-исследовательского парка Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург, Россия). Считывания были отфильтрованы по качеству, обрезаны для удаления последовательностей адаптера и собраны de novo с помощью программного обеспечения CLC Genomics Workbench 7.0 (Qiagen). Полученные последовательности (contig) были проанализированы с помощью алгоритма blastx на программном обеспечении DIAMOND по базе данных нг «Вирусы», которая включала все эталонные вирусные последовательности, доступные в GenBank по состоянию на декабрь 2020 года. Нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности были выровнены с помощью ClustalW, реализованного в программном обеспечении MEGAX. Наилучшая модель замещения оценивалась для каждого выравнивания с помощью модуля выбора модели в программном обеспечении MEGAX.

Филогенетические деревья были сформированы методом «максимального правдоподобия» с использованием соответствующей модели с 1000 загрузочными репликами программного обеспечения MEGAX. Анализ графика сходства проводился с помощью программного обеспечения SimPlot. Возможную рекомбинацию анализировали с помощью программного обеспечения RDP5.

Биоинформационный анализ

Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили, применяя программу CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей проводили с использованием сервиса BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для подбора праймеров, множественного выравнивания, анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ Lasergene Core Suite (DNASTAR, США). Выравнивание последовательностей

осуществляли по алгоритму ClustalW. Филогенетический анализ и построение дендрограмм проводили с использованием программы MEGA5.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент по способности лабораторных линий комаров родов *Aedes*, *Culex* и *Anopheles*, происходящих из г. Сочи, переносить вирус лихорадки западного нила

Эксперимент проводился на базе лаборатории биотехнологии, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В постановке использовались линии комаров отловленные на территории г. Сочи: *Ae. albopictus*, *Ae. aegypt*, *Culex pipiens molestus*, *Culex pipiens pipiens*, *Anopheles maculipennis* и *Anopheles stephensi*. Линии указанных комаров велись на базе института медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е. И. Марциновского.

Выбор видов комаров, используемых в эксперименте был следующим. Комары *Culex pipiens molestus* и *Culex pipiens pipiens* являются естественными переносчиками вируса ЛЗН в случае эксперимента это положительная контрольная группа. Комары рода *Anopheles* не способны переносить вирус ЛЗН (данные об этом в научной литературе отсутствуют), в эксперименте *Anopheles maculipennis* и *Anopheles stephensi* – отрицательный контроль. *Ae. albopictus*, *Ae. aegypt* – испытываемая группа.

Результаты исследования представлены в таблице № 1:

Таблица № 1. Результаты эксперимента по способности лабораторных линий комаров родов *Aedes*, *Culex* и *Anopheles*, происходящих из г. Сочи, переносить вирус ЛЗН

№ пула	Вид комаров	Число напитавшихся особей в пуле	Объект питания (инфицированное животное)	Количество копий РНК вируса ЗН
1.	<i>Aedes albopictus</i>	11	цыпленок	1100
2.	<i>Aedes albopictus</i>	14	белая мышь	30000
3.	<i>Aedes aegypti</i>	55	белая мышь	13000
4.	<i>Aedes aegypti</i>	19	цыпленок	18000
5.	<i>Aedes aegypti</i>	45	белая мышь	900
6.	<i>Culex pipiens molestus</i>	46	белая мышь	7000
7.	<i>Culex pipiens molestus</i>	130	белая мышь	12000
8.	<i>Culex pipiens molestus</i>	90	белая мышь	1400
9.	<i>Culex pipiens pipiens</i>	9	белая мышь	25000
10.	<i>Culex pipiens pipiens</i>	2	цыпленок	21000
11.	<i>Anopheles maculipennis</i>	1	белая мышь	0
12.	<i>Anopheles stephensi</i>	31	цыпленок	0
13.	<i>Anopheles stephensi</i>	60	белая мышь	0

Из результатов эксперимента видно, что комары рода *Anopheles* не способны переносить вирус ЛЗН, а роды *Aedes* и *Culex* способны к заражению и накоплению вирусов.

Таким образом комары *Aedes albopictus* и *Aedes aegypti*, населяющих территорию г. Сочи способны поддерживать природный очаг и быть переносчиками ЛЗН.

Метагеномный анализ природных резервуарах зоонозных инфекций в субтропической зоне Краснодарского края

Исследование комаров *Ae. albopictus*

По результатам метагеномного исследования вирома комаров *Ae. albopictus* были получены следующие результаты. Возбудителей инфекций, переносимых комарами и вызывающих заболевания у человека не выявлено. Наиболее полные сиквенсы представлены в таблице 2.

Данные анализа показывает географическое распределение вирусов от Республике Абхазия (г. Гагара) до г. Туапсе. Эта территория соответствует субтропической климатической зоне Краснодарского края России.

Выявленные вирусные сиквенсы:

- *Aedes albopictus negev-like virus* (Viruses; Riboviria; unclassified Riboviria; unclassified ssRNA) — не классифицированный вирус. Обнаружен во всех образцах от г. Гагара до г. Туапсе. Гомология с референсной последовательностью 99-100 %. Обнаруженные сиквенсы длиной от 9145 (Абхазия) до 10953 (Адлерское кладбище) нуклеотидов. Вирус впервые обнаружен в комарах *Aedes aegypti* в Австралии (образцы от «09» июля 2018 г.)
- *Wenzhou sobemo-like virus 4* (Viruses; Riboviria; unclassified Riboviria) – не классифицированный вирус. Обнаружен во всех образцах от г. Гагара до г. Туапсе. Гомология с референсной последовательностью 99-100 %. Обнаруженные сиквенсы длиной от 2955 (Абхазия) до 3081 (Адлерское кладбище) нуклеотидов. Вирус впервые обнаружен в комарах *Aedes albopictus* в США, Калифорния (образцы от «24» октября 2018 г.)

- *Wuhan Ant Virus* (Riboviria; Negarnaviricota; Narploviricotina; Monjiviricetes; Mononegavirales; Rhabdoviridae; unclassified Rhabdoviridae) – не классифицированный вирус. Обнаружен во всех образцах от г. Гагра до г. Туапсе. Гомология с референсной последовательностью 38,9-44,6 %. Важно отметить длина референсной последовательности 7202 нуклеотида, а обнаруженные сиквенсы в образцах комаров, отловленных в г. Туапсе и в питомнике НИИ «Медицинской приматологии» 12575 и 12590 нуклеотидов соответственно. Вирус впервые обнаружен в *Camponotus japonicus* (Японский муравей-древоточец), в Китае (образцы 2013 г.)
- *Flen bunya-like virus* (Riboviria; Negarnaviricota; Polyploviricotina; Ellioviricetes; Bunyavirales; unclassified Bunyavirales) – не классифицированный вирус. Обнаружен в г. Гагра, Адлерском городском кладбище и г. Туапсе. Отсеквенированы сегменты L и S 6636 и 2161 нуклеотидов соответственно. Сегмент M ни в одном образце не обнаружен. Гомология с референсной последовательностью составляет 32.8-55,6 для RdRp и 36.2-48.4 для нуклеопротеина. Вирус впервые обнаружен в комарах *Ochlerotatus cantans* в Швеции (образцы 2017 г.)
- *Whidbey virus* (ssRNA viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae; unclassified Orthomyxoviridae) – не классифицированный вирус. Обнаружен во всех исследуемых локациях. Полноразмерные сиквенсы получены для сегментов PB1, PB2, PA и NP — 2539, 2405, 2237, 1911 нуклеотидов соответственно. Гомология сегментов с референсной последовательностью существенно различается в образцах из г. Туапсе от прочих. Так для для сегмента PB1 туапсинского сиквенса она составляет 27.6 %, для PB2 — 29.5, PA — 28.4 и NP 33.1, а для образцов из г. Сочи и Абхазии PB1 – 79.6, PB2 – 68.1 , PA – 72.8, NP – 67.5. Вирус впервые обнаружен в комарах *Aedes dorsalis* в США (образцы от 2016 г.)
- *Merida-like virus KE-2017a* (Riboviria; Negarnaviricota; Narploviricotina; Monjiviricetes; Mononegavirales; Rhabdoviridae; unclassified Rhabdoviridae) — не классифицированный вирус. Обнаружен во всех исследуемых образцах. Длина полученных сиквенсов 7630-10397 нуклеотидов. Гомология с референсной последовательностью 38.4 % (г. Туапсе) и 45.1 % в г. Гагра, НИИ «Медицинской приматологии» и Адлерском городском кладбище. Впервые обнаружен в комарах *Culex pipiens* в Турции (образцы от 2015 г.).
- *Shayang Fly Virus 1* (Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Negarnaviricota; Narploviricotina; Monjiviricetes; Jingchuvirales; Chuviridae; Mivirus; Shayang mivirus). Обнаружены в г. Туапсе и г. Сочи (НИИ «МП» и Адлерское кладбище). Длина полученных сиквенсов 7606 нуклеотидов (г. Туапсе), 11128 (НИИ «Медицинской приматологии») и 11104 (Адлерское кладбище). Гомолгия с референской последовательностью составляет 69.0 % для г. Туапсе и 29.5 % для г. Сочи. Впервые обнаружен в плодовой мушке *Atherigona orientalis* в Китае (образцы 2013 г.).

Интерес представляют три отсековеннированные последовательности:

Приведённые последовательности, обнаруженные в образцах, являются наиболее полными. Большая часть прочтений длиной до 1000 нуклеотидов с различной степенью гомологии.

Таблица 2, Результаты метагеномного секвенирования комаров *Ae. albopictus*, отловленных вдоль Черноморского побережья Краснодарского края

Вирус	Туансе		НИИ МП		Адлер		Абхазия		Организм	Страна
	Длина, н.о	Гомология, %	Длина, н.о	Гомология, %	Длина, н.о	Гомология, %	Длина, н.о	Гомология, %		
Aedes albopictus negev-like virus	9532**	100.0	9558**	99.0	10953*	99.0	9145**	99.0	<i>Aedes aegypti</i>	Australia
Wenzhou sobemo-like virus 4	2993*	100.0	2998*	99.0	3081*	99.8	2955*	99.0	<i>Aedes albopictus</i>	USA (California)
Wuhan Ant Virus	12575*	44.6	12590*	38.9	11755*	38.9	6841**	38.9	<i>Camponotus japonicus</i> (Японский муравей-древоточец)	China
Flen bunya-like virus	6606*	32.8	Не обнаружен	Не обнаружен	6635*	55.6	6636*	55.6	<i>Ochlerotatus cantans</i>	Sweden
Whidbey virus	2439*	27.6	2441*	79.6	2433*	79.6	2539*	79.6	<i>Ochlerotatus dorsalis</i>	USA
Shayang Fly Virus 1	7606**	69.0	11128**	29.5	11104**	29.5	Не обнаружен	Не обнаружен	<i>Atherigona orientalis</i> (плодовая мушка)	China
Yongsan bunyavirus 1	2145	36.5	2161*	48.8	1989*	49.0	2132*	47.9	<i>Aedes vexans nipponii</i>	South Korea

Исследование летучих мышей Сочинского Национального Парка

Результаты секвенирования образцов

В общей сложности было получено 124 522 978 считываний для трех пулов кала и 170 112 341 считывание для пяти пулов мазков из полости рта. Считывания были собраны *de novo* в контиги и проанализированы алгоритмом blastx на наличие вирусных последовательностей. Результаты поиска выявили два расширенных контига длиной около 29 Кб с открытыми рамками считывания (ORFs) со сходством с представителями рода *Betacoronavirus* в пулах 1 и 3 образцов фекалий, соответственно. При дальнейшем анализе был секвенирован почти полный геном двух новых SARS-like коронавирусов. Соответствующие контиги также были обнаружены в парных образцах мазков из полости рта, но с меньшей длиной и охватом. Два обнаруженных SARS-like коронавируса, были названы BtCoV/Khosta-1/Rh/Russia/2020 и BtCoV/Khosta-2/Rh/Russia/2020 и помещены в GenBank под присвоенными номерами MZ190137 и MZ190138 соответственно. Ниже они называются Хоста-1 и Хоста-2 соответственно.

Генетический и филогенетический анализ

Геномная организация Хосты-1 и Хосты-2 аналогична геномной организации других SARS-like коронавирусов, (рис. 1). Примерно две трети генома коронавирусов занимают гены ORF1a и ORF1b, которые кодируют белки реплицирующего комплекса и транслируются как полипротеин ORF1ab из-за рибосомального сдвига. Остальная часть генома содержит гены структурных белков (S, E, M и N), которые образуют вирион, а также несколько неструктурных белков (ORF3, ORF6, ORF7, ORF8, ORF9 и ORFX), присутствие и структура которых различаются у разных вирусов. Организация генома Хосты-1 и Хосты-2 имеет наибольшее сходство с вирусами BtCoV/BM48-31/2008 и BtKY72 – двумя SARS-like коронавирусами, обнаруженными у подковоносых летучих мышей в Болгарии и Кении в 2008 и 2007 годах соответственно. Их особенностью является отсутствие гена ORF8, который часто встречается у летучих мышей, имеющих SARS-like коронавирусы из Восточной и Юго-Восточной Азии (рис. 1).



Рис. 1 Схема генома вирусов Хоста-1 и Хоста-2 с обозначением основных ORF

Попарное выравнивание выведенных белков вирусов Хоста-1 и Хоста-2 с белками других SARS-like коронавирусов, показало их наибольшее сходство с вирусами BtCoV/BM48-31/2008 и BtKY72 таблица № 3. Хоста-1 наиболее близок к BtCoV/BM48-31/2008 с идентичностью 92,5% aa и 99% aa в консервативных белках ORF1a и ORF1b соответственно. Сходство Хосты-1 с SARS-CoV и родственными вирусами из Китая составляет в среднем 81,5% идентичности aa в белке ORF1a и 96% в белке ORF1b. Сравнение Хоста-1 с вирусами SARS-CoV-2 выявило 77,5% и 94,2% идентичности aa для белков ORF1a и ORF1b соответственно. Несмотря на высокое сходство белков Хоста-1 и BtCoV/BM48-31/2008 в белках ORF1a и ORF1b, структурные белки S, E и M Хоста-1 более похожи на белки кенийского вируса BtKY72. Хоста-1 и BtKY72 имеют 89,1%, 98,7% и 97,29% идентичности aa для белков S, E и M, тогда как эти значения для Хосты-1 и BtCoV/BM48-31/2008 составляют 84,37%, 89,47 и 95% соответственно. Белок N Хосты-1 более похож на белок BtCoV/BM48-31/2008 (96,64% идентичности aa), чем BtKY72 (92,6% идентичности aa).

Напротив, Хоста-2 не имеет такого повышенного сходства с какой-либо группой сарбековирусов и имеет 79-81% идентичности aa с вирусами SARS-CoV и 76-77% с вирусами SARS-CoV-2 в белке ORF1a. Белок ORF1b Хосты-2 на 93,5-95% идентичен aa со всеми другими SARS-like коронавирусами летучих мышей. Сравнение белков Хосты-1 и Хосты-2 показало, что эти вирусы отличаются друг от друга примерно на том же уровне, на каком Хоста-2 отличается от других SARS-like коронавирусов летучих мышей таблица № 3.

таблица № 3 Сходство (%) выведенных аминокислотных последовательностей белков вирусов Хоста-1 и Хоста-2 с некоторыми представителями подрода сарбековирусов (линия В бетакоронавирусов).

Белок	Вирусы	Совпадение по аминокислотам (%)								
		Bat SARS-CoV-like BGR/2008 (Bulgaria, 2008)	Bat SARS-CoV-like BtKY72 (Kenya, 2007)	Bat SARS-CoV-like (China, 2005-2016)*	Civet SARS-CoV-like SZ3 (China, 2003)	SARSCoV Urbani (2003)	Bat SARSCoV-2-like RatG13 (China, 2013)	Pangolin SARS-CoV-2like (China, 2017)	SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (2019)	Khosta-1 vs Khosta-2
ORF1a	Khosta-1	92,95	84,6	81,53-81,6	81,67	81,53	77,2	77,89	77,32	82
	Khosta-2	81,1	80,9	79,4-79,6	79,5	79,4	76,3	77,1	76,45	
ORF1b	Khosta-1	99,07	96,3	95,82-96,3	96,15	96,15	94,22	94,22	94,21	94,75
	Khosta-2	94,7	93,7	94,9-95,17	95,02	94,9	93,44	93,47	93,5	
S	Khosta-1	84,37	89,11	75,5-76,2	75,7	75,7	73,0	72,4	72,22	82
	Khosta-2	79,54	79,7	73,03-73,9	73,2	73,0	72,5	71,74	72,54	
ORF3	Khosta-1	85,98	86,7	66,8-72,3	70,8	70,8	65,1	66,2	64,7	81,8
	Khosta-2	77,9	82,22	67,9-69,34	67,15	67,5	64,5	65,8	63,27	
E	Khosta-1	89,47	98,7	87,0	87	87	93,42	93,42	93,42	94,7
	Khosta-2	88,16	94,74	90,7	90,7	90,7	89,5	89,5	89,5	
M	Khosta-1	95,0	97,29	91,86-92,31	92,31	91,86	88,24	87,73	88,13	91
	Khosta-2	90,9	90,5	88,7-89,6	90,5	89,6	87,3	87,27	87,0	
ORF6	Khosta-1	68,25	63,0	49,21-52,38	49,21	49,21	50,82	50,82	50,82	58,73
	Khosta-2	58,1	58,1	44,4-47,6	46,03	46,03	46,7	46,7	46,7	
ORF7a	Khosta-1	69,7	70,6	58-59,7	61,34	61,34	58,5	59,32	58,5	73,5
	Khosta-2	63,25	70,34	58,2-59,26	60,0	60,0	60,0	58,3	59,13	
ORF7b	Khosta-1	86,05	81,4	71,8	71,8	71,8	61,5	71,8	74,4	70,7
	Khosta-2	71,4	73,1	64,2	64,2	64,2	64,2	64,2	64,2	
N	Khosta-1	96,64	92,6	88,36-88,9	89,1	89,1	87,9	87,6	87,4	91,85
	Khosta-2	91,13	90,21	85,75-86,73	86,5	86,5	85,5	86,4	85,24	

Рекомбинационный анализ

Сходство последовательностей генома между Хостой-1, Хостой-2, VtCoV/BM48-31/2008 и VtKY72 было проанализировано с помощью программного обеспечения Simplot и RDP5 (рис. 1, 2, 3). Симплет-анализ показал высокую степень сходства генов Хоста-1 и VtCoV/BM48-31/2008 в генах ORF1ab и N и снижение сходства в области S-ORF7b. Результаты анализа, проведенного программным обеспечением RDP5 с использованием различных методов, реализованных в программе, показали четкие сигналы событий рекомбинации в эволюционной истории Хосты-1 (рис. 3). События рекомбинации, предположительно, включали приобретение области S-ORF7b предком вируса Хоста-1 от вируса, тесно связанного с VtKY72.

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ, основанный на последовательностях белка ORF1ab, показал, что Хоста-1, Хоста-2, VtCoV/BM48-31/2008 и VtKY72 образуют монофилетическую линию, расположенную между линиями SARS-CoV и SARS-CoV-2 подрода сарбековируса (рис. 4). Отдельный кластер эта группа вирусов также сформировала на филогенетическом дереве на основе нуклеотидных последовательностей гена S (рис. 5). Топология дерева подтверждает вероятное событие рекомбинации в эволюционной истории Хосты-1. В дереве ORF1ab Хоста-1 группируется вместе с VtCoV/BM48-31/2008, а в дереве генов S с VtKY72.

Анализ мотива связывания рецепторов (MCP) белка S

Выравнивание аминокислотных последовательностей MCP Хосты-1 и Хосты-2 с некоторыми сарбековирусами представлено на рис. 4. Это очень изменчивая область, где происходят множественные замены и делеции среди вирусов, связанных с SARS-CoV. Хоста-1 и Хоста-2, а также VtCoV/BM48-31/2008 имеют общее исключение четырех aa в N-части MCP. Эта делеция частично перекрывается с делецией, характерной для HKU3-1 и родственных штаммов вирусов SARS-CoV-like летучих мышей, которые не способны связывать рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). Мы проанализировали позиции aa в MCP, которые, как полагают, имеют решающее значение для связывания рецептора ACE2 и, следовательно, важны для адаптации SARS-like коронавирусов летучих мышей, к человеку. Только в положении 442 Хоста-1 и Хоста-2 имеют общую аминокислоту (L), которая также присуща SARS-CoV-2 и родственным вирусам. Несмотря на значительное генетическое расстояние между Хостой-1 и VtKY72, ключевые позиции в MCP и их контекст совпадают между ними. Напротив, позиции 479, 480 и 487 Хосты-2 плохо совпадают с другими группами вирусов (рис. 6).

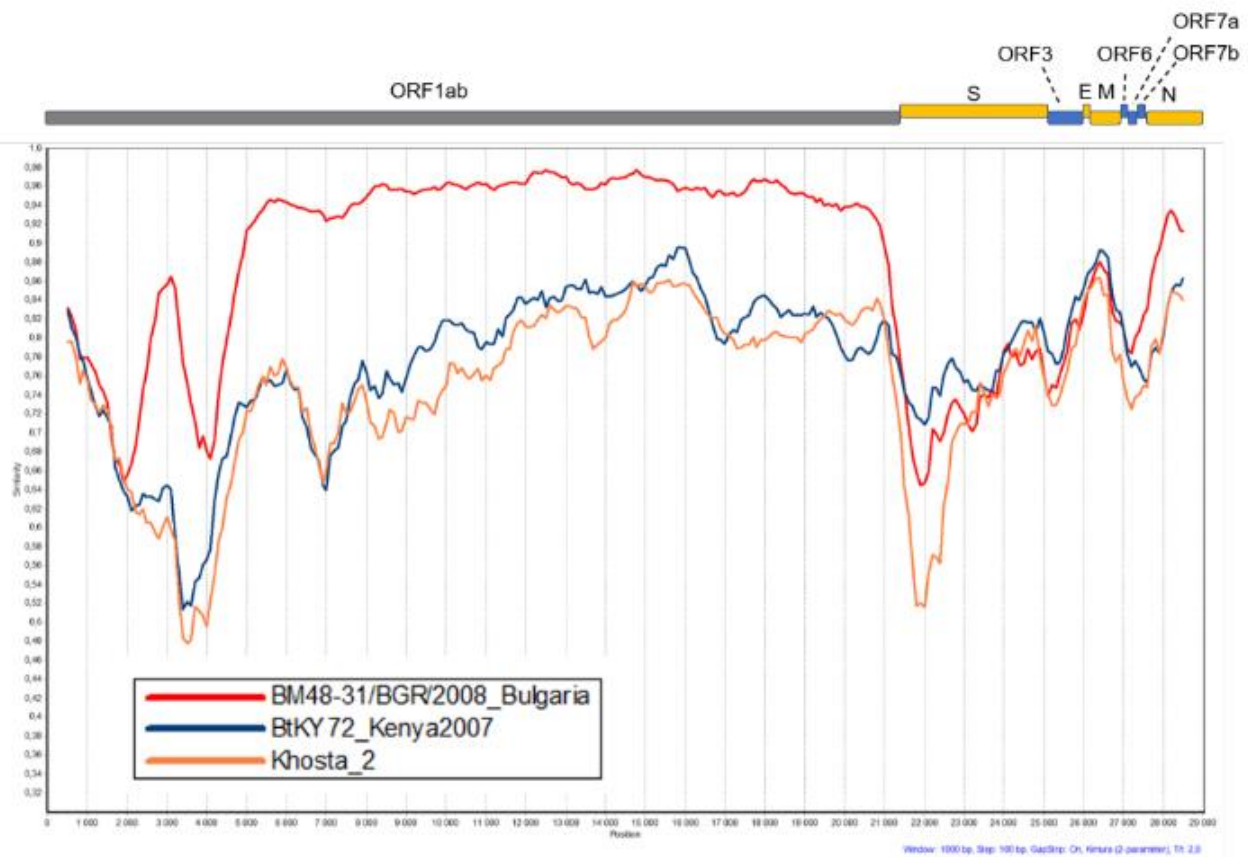
ПЦР-тестирование образцов биоматериала от летучих мышей

Были разработаны праймеры и зонды для специфического обнаружения вирусов Хоста-1 и Хоста-2 в образцах кала и оральных смывах методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Результаты ОТ-ПЦР-тестирования образцов представлены в таблице 4 РНК Хоста-1 была обнаружена, в основном, у больших подковоносов, собранных в пещере Колокольная. Все четыре найденных положительных мазка из полости рта принадлежали животным с положительными образцами кала. В других местах вирус Хоста-1 был обнаружен только в двух образцах фекалий – у большого подковоноса из пещеры Хоста-1 и малого подковоноса из пещеры Партизанская, соответственно. РНК вируса Хоста-2 была обнаружена у двух подковоносов, собранных в подвале здания Научно-исследовательского института медицинской приматологии. У одного животного РНК Хоста-2 была обнаружена как в кале, так и в мазках с полости рта, а у другого только в оральном смыве.

Таблица № 4 Собранные образцы летучих мышей и результаты ОТ-ПЦР-тестирования на вирусы Хоста-1 и Хоста-2.

Место (пещера)	Вид летучих мышей	Количество собранных образцов		Образцы положительные к Khosta-1 virus %		Образцы положительные к Khosta-2 virus %	
		Ротовые смывы	Помёт	Ротовые смывы	Помёт	Ротовые смывы	Помёт
Подвал лабораторного корпуса НИИ «Медицинской приматологии»	Малый подковонос	27	24	0	0	1 (3,7%)	2 (8,3%)
	Южный подковонос	1	1	0	0	0	0
Музейная	Большой подковонос	4	2	0	0	0	0
	Малый подковонос	3	2	0	0	0	0
Хоста-1	Большой подковонос	21	13	0	1 (7,7%)	0	0
	Длиннокрыл обыкновенный	3	1	0	0	0	0
Колокольная	Большой подковонос	36	24	4 (11%)	15 (62,5%)	0	0
	Южный подковонос	2	0	0	0	0	0
Партизанская	Большой подковонос	2	1	0	0	0	0
	Малый подковонос	5	3	0	1 (33%)	0	0
Чердак дома	Малый подковонос	6	4	0	0	0	0
Красноалександровская	Большой подковонос	1	0	0	0	0	0
	Малый подковонос	6	0	0	0	0	0
	Ночницы	3	0	0	0	0	0
Чердак дома в пос. Измайловка	Малый подковонос	0	2	0	0	0	0
ИТОГО		120	77	4	17	1	2

Рисунок 1 Схема генома вирусов Хоста-1 и Хоста-2 с обозначением основных ORF, а также результаты симплотанализа. Хоста-1 использовалась в качестве исследуемой



последовательности, а вирусы Хоста-2, BM48-31/BGR/2008 и BtKy72 использовались в качестве референтных последовательностей.

Рисунок 2 Схема генома вирусов Хоста-1 и Хоста-2 с обозначением основных ORF, и симплотанализа. Хоста-2 использовалась в качестве исследуемой последовательности, а Хоста-1, BM48-31/BGR/2008 и BtKy72 использовались в качестве референтных последовательностей.

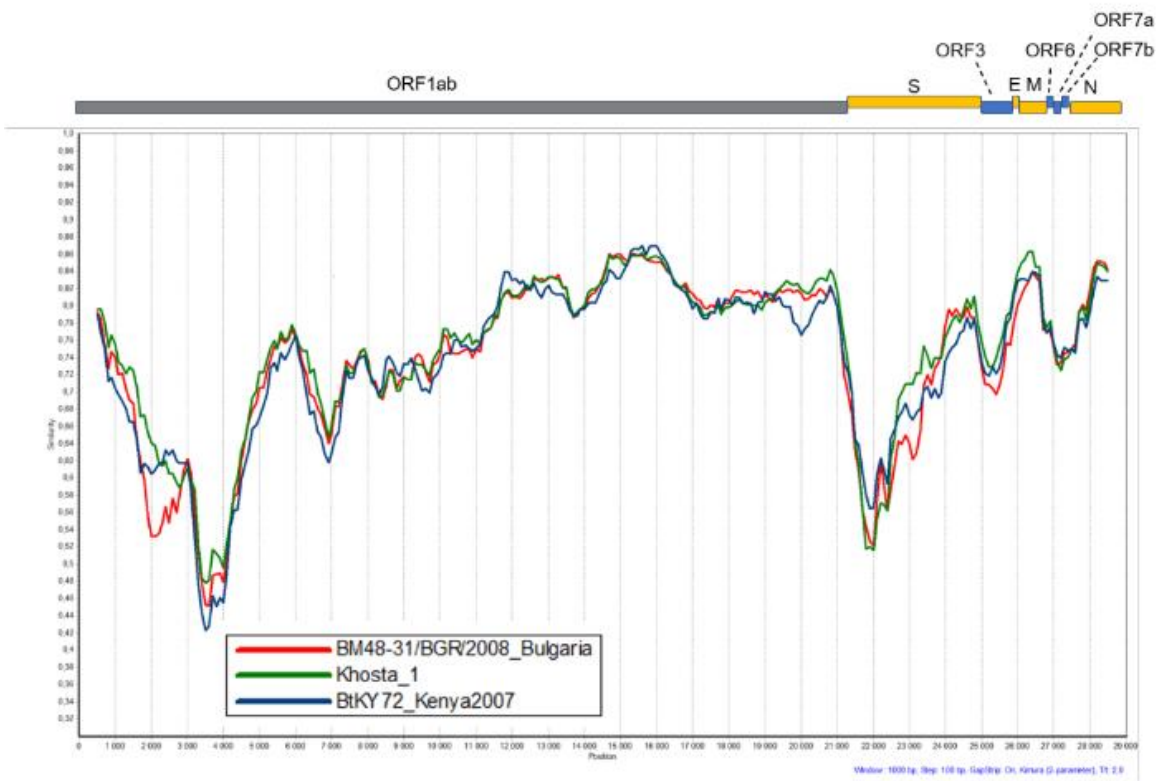


Рисунок 3 Результаты бутстрэп – анализа событий рекомбинации в геноме Хосты-1 с помощью программного обеспечения RDP5.

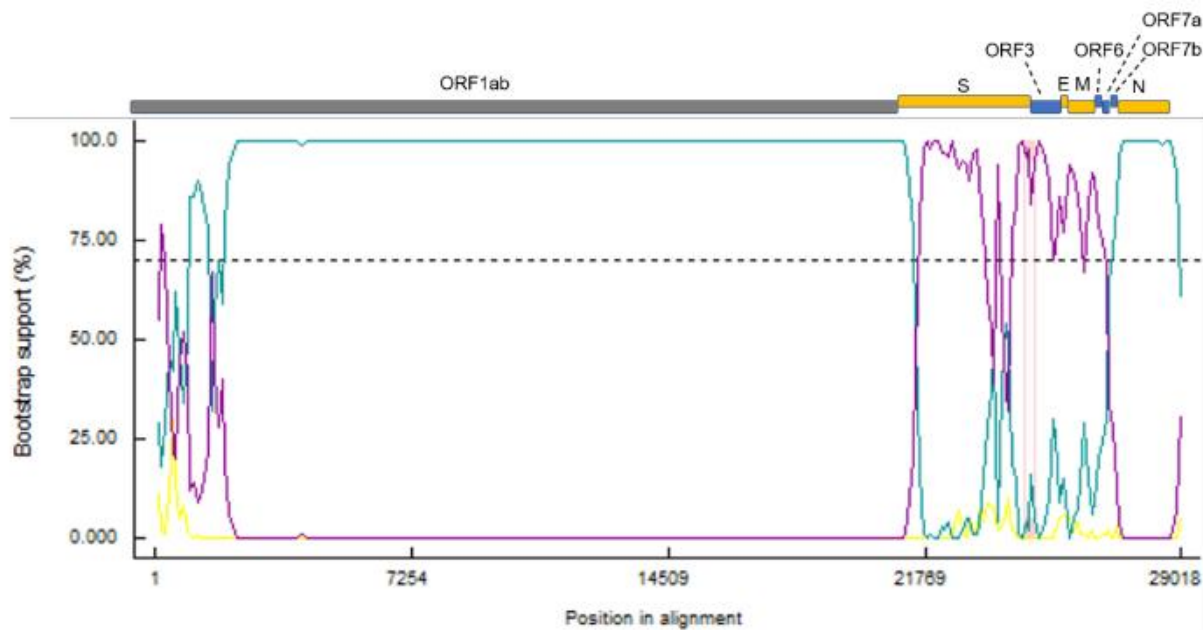


Рисунок 4 Филогенетические деревья, выведенные методом максимального правдоподобия на основе анализа аминокислотных последовательностей белка ORF1ab. Вирусы, описанные в настоящей работе, отмечены черным кружком.

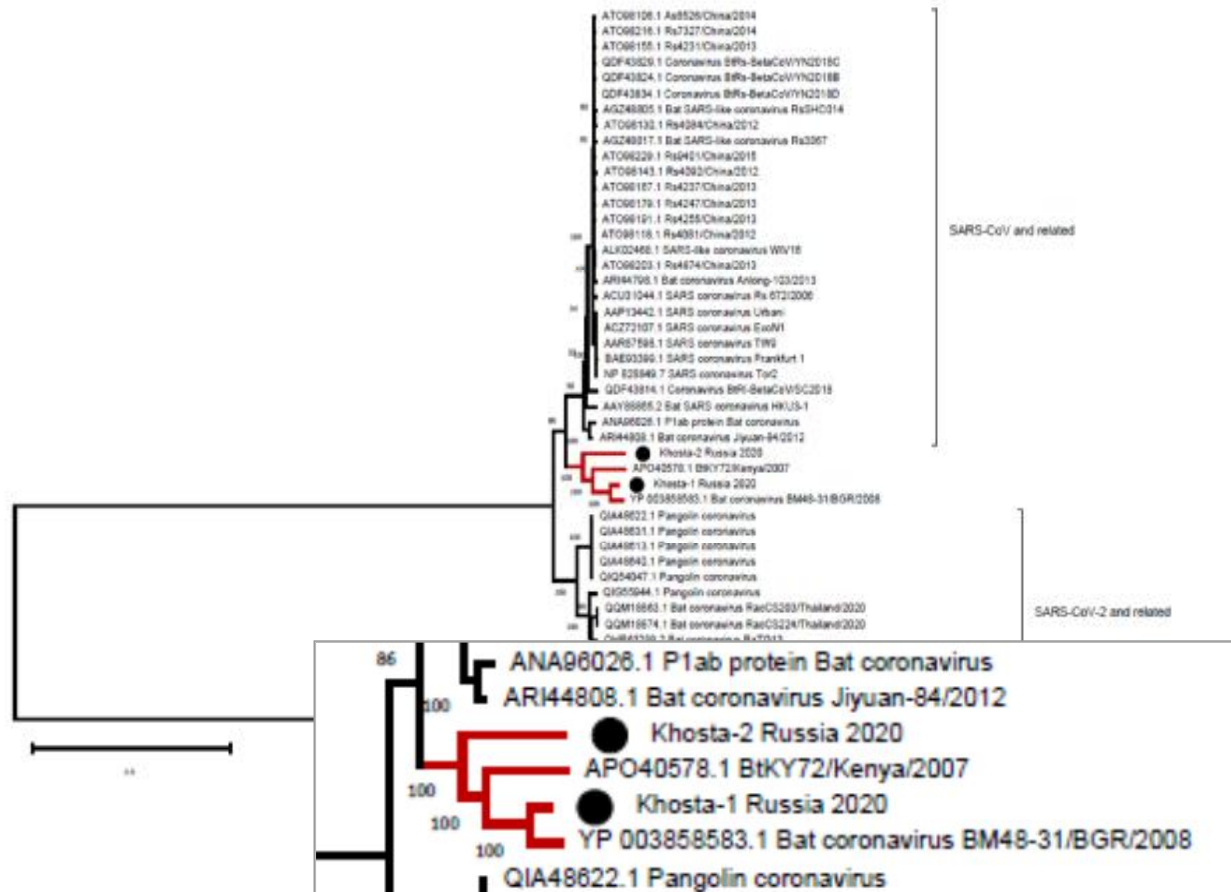
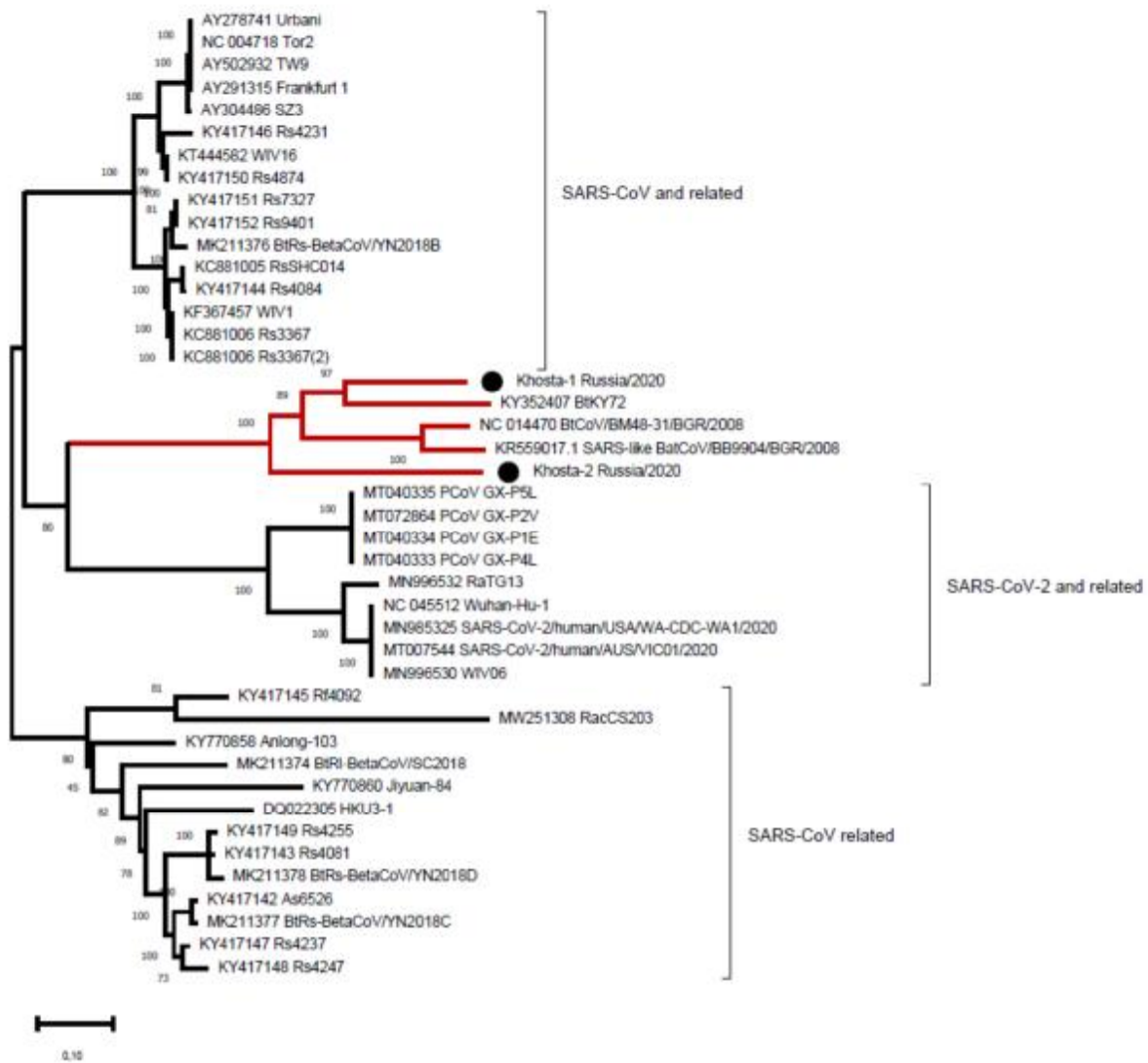


Рисунок 5 Филогенетические деревья, выведенные методом максимального правдоподобия на основе анализа аминокислотных последовательностей белка гена S. Вирусы, описанные в настоящей работе, отмечены черным кружком.



отмечены черным кружком.

Рисунок 6 Выравнивание мотива связывания рецепторов (PCM) домена связывания рецепторов (PCM) белка S Хосты-1 и Хосты-2 с некоторыми сарбековирuсами. Позиции (442, 472, 479, 480, 487, 491 нумерация по SARS-CoV Urbani) в PCM, которые считаются важными для адаптации SARS-CoV-подобных вирусов к рецептору ACE2 человека, выделены жирным шрифтом. SARS-CoV-like вирусы летучих мышей, которые способны или не способны использовать рецептор ACE2, помечены "ACE2(+)" или "ACE2 (-)" соответственно.

		442	472	479-80	487	491
	Khosta-1	NTRSIDK---GQGFYR L FRHGKIKPYERDTSNVPYNAQGGTCTDTSQ L NCYQPL K SYDFTDTVGVGYQPY				
	Khosta-2	NTRTIDS---KRGFYR L FRHGNIIRPYERDTSNVPYNAAGGTCNQPGT H NCYEPL Q DYGFSTSGVGYQPF				
	NC_014470_BM48-31/BGR/2008	NTNSLDS---SNEFFYR R FRHGKIKPYGRDLSNVLFPNSG-GTCSAEG L NCYKPL A SYGFTQSSGIGYQOPY				
	KR559017_BB9904/BGR/2008	NTNALDS---NKDFYR L FRHGKIKPYGRDLSNIPYSPSG-TCSTIN L NCFAP L KSYGFTQSSGISYQOPY				
	KY352407_BtKY72	NTNSVDSKS--GNNFYR L FRHGKIKPYERDISNVLNSAGGTCSSISQ L SCYEPL K SYGFTPTVGVGYQOPY				
SARS-CoV	AY278741_SARS_Urbani	NTRNIDATSTGNYNKYR L FRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPC T PP-AL N CYWPL N DYGFYTTGIGYQOPY				
	AY304486_Civet_S23	NTRNIDATSTGNYNKYR L FRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPC T PP-AL N CYWPL K DYGFYTTSGIGYQOPY				
SARS-CoV-2	MT040335_Pangolin_SARS-2	NSVKQDALTGGNYGYL R LFRKSKL K PFERDISTEIQAGSTPCNGQV G LNCY P L E RYGFRPTTGVNYQPF				
	MN996532_RaTG13	NSKHIDAKEGGNFNYL R LFRKANL K PFERDISTEIQAGSKPC N CGT G LNCY P L R YGFYPTDGVGHOPY				
	NC_045512_SARS-CoV-2	NSNLDL S KVGGNYNYL R LFRKSNL K PFERDISTEIQAGSTPCNGVE G ENCY F L Q SYGFQPTNGVGYQOPY				
	KT444582_WIV16	NTRNIDATSTGNYNKYR L FRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPC T PP-AL N CYWPL N DYGFYITNGIGYQOPY				
Bat SARS-CoV	KF367457_WIV1	NTRNIDATSTGNYNKYR L FRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPC T PP-AL N CYWPL N DYGFYITNGIGYQOPY				
ACE2(+)	KC881005_RsSHC014	NTNSKDSSTSGNYNYL R LFRRSKLN P YERDLSNDIYSPGGQ S CSAV-G P NCYN P L R YGFYTTA S GVGHOPY				
	KY417151_Rs7327	NTRNIDATSTGNYNKYR L FRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPC T PP-AL N CYWPL N DYGFYTTNGIGYQOPY				
	DQ022305_HKU3-1	NTAKHDTGN-----YYR S HRK T KL K PFERDLS S DDG-----NGVY T L S TYDFNPN V PVAYQAT				
Bat SARS-CoV	KY417145_Rf4092	NTAKQDVGS-----YYR S HR S SKL K PFERDLS S DE-----NGV R T L S T YDFNPN V PLDYQAT				
ACE2(-)	KY417147_Rs4237	NTAKQDGGQ-----YYR S SR R K T KL K PFERDLS S DE-----NGV R T L S T YDFYPT V PLDYQAT				
	KY417148_Rs4247	NTAKQDTGH-----YYR S HR R K T KL K PFERDLS S DDG-----NGVY T L S TYDFNPN V PVAYQAT				

ВЫВОДЫ

1. По результатам эксперимента была подтверждена способность линии комаров *Ae. albopictus*, отловленных на территории г. Сочи переносить вирус лихорадки Западного Нила.
2. По результатам проведённого метагеномного исследования комаров *Ae. albopictus*, отловленных вдоль Черноморского побережья Краснодарского края и Абхазии (г. Гагра, г. Сочи, г. Туапсе), не обнаружено вирусов известных природно-очаговых инфекций, опасных для человека.
3. Обнаружены и генетически описали два новых, SARS-подобных коронавируса, в фекалиях и мазках из полости рта больших (*R. ferrumequinum*) и малых (*R. hipposideros*) подковоносых летучих мышах в южном регионе России. Им были даны названия BtCoV/Khosta-1/Rh/Russia/2020 и BtCoV/Khosta-2/Rh/Russia/2020. Вирусы помещены в GenBank под присвоенными номерами MZ190137 и MZ190138 соответственно.
4. Проведён генетический анализ обнаруженных SARS-подобных вирусов. Парное выравнивание выведенных белков вирусов Хоста-1 и Хоста-2 с белками других SARS-like коронавирусов, показало их наибольшее сходство с вирусами BtCoV/BM48-31/2008 (Болгария) и BtKY72 (Кения).
5. Проведен рекомбинационный анализ обнаруженных вирусов. Симплет-анализ показал высокую степень сходства генов Хоста-1 и BtCoV/BM48-31/2008 в генах ORF1ab и N и снижение сходства в области S-ORF7b. Результаты анализа, показали четкие сигналы событий рекомбинации в эволюционной истории Хосты-1. События рекомбинации, предположительно, включали приобретение области S-ORF7b предком вируса Хоста-1 от вируса, тесно связанного с BtKY72.
6. Проведённый филогенетический анализ по белку ORF1ab, показал, что Хоста-1, Хоста-2, BtCoV/BM48-31/2008 и BtKY72 образуют монофилетическую линию, расположенную между линиями SARS-CoV и SARS-CoV-2 подрода сарбековируса. Так же отдельный кластер эта группа вирусов также сформировала на филогенетическом дереве по нуклеотидной последовательностей гена S.
7. Проведён анализ мотива связывания рецепторов (MCP) белка S. Выравнивание аминокислотных последовательностей MCP Хосты-1 и Хосты-2 показало, что только в положении 442 Хоста-1 и Хоста-2 имеют общую аминокислоту (L), которая также присуща SARS-CoV-2 и родственным вирусам. Несмотря на значительное генетическое расстояние между Хостой-1 и BtKY72, ключевые позиции в MCP и их контекст совпадают между ними. Напротив, позиции 479, 480 и 487 Хосты-2 плохо совпадают с другими группами вирусов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ НАУЧНО КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. ЗАВОЗНЫЕ ВИДЫ КОМАРОВ НА ЧЕРНОМОРСКОМ ПОБЕРЕЖЬЕ КАВКАЗА: СОВРЕМЕННЫЕ АРЕАЛЫ. Федорова М.В., Швец О.Г., Патраман И.В., Медяник И.М., Отставнова А.Д., Леншин С.В., Вышемирский О.И. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2019. № 1. С. 47-55.
2. ЭКСПЕРИМЕНТ ПО СПОСОБНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЙ КОМАРОВ РОДОВ Aedes, Culex И Anopheles, ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ СОЧИ, ПЕРЕНОСИТЬ ВИРУС ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА. Леншин С.В., Ганушкина Л.А., Патраман И.В., Вышемирский О.И. В сборнике: Молодые ученые в медицине и биологии. Электронный ресурс. 2019. С. 124-129.
3. ЭКТОПАРАЗИТЫ РУКОКРЫЛЫХ СОЧИНСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА. Ромашин А.В., Леншин С.В. В сборнике: Актуальные проблемы экологии и природопользования. сборник научных трудов XXI Международной научно-практической конференции : в 3 т.. 2020. С. 167-170.
4. ЛЕТУЧИЕ МЫШИ СУБТРОПИЧЕСКОЙ ЗОНЫ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ РОССИИ КАК ВОЗМОЖНЫЙ РЕЗЕРВУАР ЗООНОЗНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. Леншин С.В., Ромашин А.В., Вышемирский О.И., Львов Д.К., Альховский С.В. Вопросы вирусологии. 2021. Т. 66. № 2. С. 112-122.
5. ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕНОСИМЫЕ КОМАРАМИ, – РИСКИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АУТОХТОННЫХ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ (СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР). Леншин С. В., Патраман И. В., Альховский С. В. и др. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021;20(3): . <https://doi:10.31631/2073-3046-2021-20-3->