

Волынкина Анна Сергеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВАРИАНТОВ ВИРУСА
КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ,
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

03.02.02 – вирусология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2018

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Куличенко Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, директор института

Официальные оппоненты: Беклемишев Анатолий Борисович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБНУ НИИ биохимии ФИЦ ФТМ

Бабкин Игорь Викторович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН

Ведущая организация: ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Защита состоится **26 декабря 2018** года в **09:00** часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) — особо опасная природно-очаговая вирусная инфекция, эндемичная для территории юга европейской части России [Аристова, 2001; Смирнова, 2007; Куличенко, 2012]. В России сохраняется неблагоприятная эпидемическая ситуация по КГЛ, в 1999–2017 гг. в РФ выявлено 2124 больных, уровень летальности составил 4,0 %. Эпидемические проявления КГЛ зарегистрированы в десяти субъектах ЮФО и СКФО, отмечались заносные случаи КГЛ на неэндемичные территории: в г. Москва, г. Воронеж. Заболеваемость КГЛ не имеет тенденций к снижению, при этом наблюдается постепенное расширение границ природного очага КГЛ на юге России и вовлечение в эпидемический процесс новых районов [Куличенко, 2012; 2016].

Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) является одним из наиболее генетически гетерогенных арбовирусов. Методы молекулярно-генетического анализа вируса ККГЛ, основанные на секвенировании участков генома и полноразмерных геномных последовательностей, успешно применяются для идентификации и дифференциации штаммов вируса, используются для решения прикладных эпидемиологических задач на молекулярном уровне, в т.ч. осуществления эпидемиологического анализа случаев заболевания, описания эпидемического и эпизоотического процессов [Atkinson, 2012; Chamberlain, 2013; Mourya, 2012; Yadav, 2013].

Полностью популяция вируса ККГЛ в России не охарактеризована, отсутствуют сведения о генетических особенностях изолятов вируса, циркулирующих на территории Республик Крым, Калмыкия и Дагестан. Накопление и анализ новых данных о генетическом разнообразии вируса ККГЛ в России, в т.ч. полноразмерных геномных последовательностей, позволит объективно оценить современное состояние популяции вируса, определить ареалы распространения генетических вариантов, получить данные об особенностях эволюции вируса ККГЛ в России, уточнить существующие представления об эволюционной истории вируса ККГЛ.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время на основании частичных и полных нуклеотидных последовательностей S сегмента генома вируса ККГЛ выделяют 7 генетических линий вируса, имеющих корреляцию с географическим местом выделения [Bente, 2013]. R. Hewson, Л.В. Гмыль, А.Н. Лукашевым описана возможность рекомбинаций и реассортационного обмена сегментами между штаммами вируса ККГЛ [Гмыль, 2007; Hewson, 2004; Lukashev, 2005].

В результате изучения генетических особенностей штаммов вируса ККГЛ, циркулирующих в России, сотрудниками НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: Д.К. Львовым, А.М. Бутенко, О.И. Вышемирским, В.С. Петровым, Л.Н. Яшиной, И.Д. Петровой, С.В. Серегиним, и др. получены приоритетные данные о генетической гетерогенности вируса ККГЛ в РФ и установлена циркуляция штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-1 [Яшина, 2002;

Yashina, 2003; Петрова, 2003; Seregin, 2004; Серегин, 2004, 2006, 2007; Butenko, 2007]. Охарактеризованы штаммы вируса ККГЛ из Астраханской, Волгоградской, Ростовской областей и Ставропольского края. Л.С. Карань установлено разделение изолятов, выделенных на территории юга России, на три подгруппы в пределах генотипа Европа-1: Ставрополь-Ростов-Астрахань-1, Волгоград-Ростов-Ставрополь и Астрахань-2 [Карань, 2007]. На момент начала исследования для трех штаммов вируса ККГЛ, выделенных на территории РФ, определена полноразмерная нуклеотидная последовательность S, M и L сегментов генома.

С использованием методов Байесовой филогении построены модели глобального пространственно-временного распространения вируса ККГЛ [Zehender, 2013]. А.Н. Лукашев на основании анализа непрерывной филогеографии показал, что вирус ККГЛ был занесен на территорию Астраханской области, откуда распространился по всей территории природного очага КГЛ в России [Lukashev, 2016]

Цель исследования: изучение генетического разнообразия, особенностей территориального распределения и эволюции вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих в России.

Задачи исследования:

1. Выполнить молекулярно-генетическое типирование РНК-изолятов вируса ККГЛ из образцов клинического и полевого материала на основании анализа нуклеотидной последовательности фрагментов S, M и L сегментов генома.

2. Проанализировать особенности территориального распределения генетических вариантов вируса ККГЛ в России, выявить характерные для регионов ЮФО и СКФО варианты вируса.

3. Провести сравнительный анализ полноразмерных нуклеотидных последовательностей S, M и L сегментов генома РНК-изолятов вируса ККГЛ, относящихся к разным генетическим вариантам вируса ККГЛ, циркулирующим в России, выявить аминокислотные замены, специфичные для геновариантов.

4. С использованием методов Байесовой филогении оценить скорость молекулярной эволюции вируса ККГЛ, построить модель пространственно-временного распространения генетических вариантов вируса ККГЛ на территории России, реконструировать эволюционную динамику изменения численности популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 в России.

Научная новизна. Получены новые данные о генетическом разнообразии вируса ККГЛ в России. На территории России выявлены изоляты вируса ККГЛ, относящиеся к трем генетическим линиям: Европа-1, Африка-3, Европа-3. Впервые охарактеризована генетическая структура популяции вируса ККГЛ на территории Республик Калмыкия, Дагестан, Крым и Краснодарского края.

Впервые описана новая генетическая линия вируса ККГЛ Европа-3.

Впервые на территории юга России выявлен изолят вируса ККГЛ генетической линии Африка-3, что подтверждает возможность заноса на территорию России штаммов вируса с других, эндемичных по КГЛ, регионов мира.

Впервые описан новый генетический вариант Крым (Vd) в пределах генотипа Европа-1, выявлены процессы реассортационного обмена сегментами между штаммами генетических подгрупп Ставрополь-Ростов-Астрахань-1 (Va), Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb) и Астрахань-2 (Vc) генотипа Европа-1.

На основании моделирования процесса пространственно-временного распространения вируса ККГЛ показано, что проникновение вируса ККГЛ на территорию России происходило в два этапа: из Африки был занесен вирус генотипа Европа-3, из Западной Азии – вирус генотипа Европа-1. Построена модель динамики изменения «эффективного размера» популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 в России.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В результате работы охарактеризована генетическая гетерогенность популяции вируса ККГЛ в РФ на современном этапе, установлены закономерности географического распределения генетических вариантов вируса ККГЛ на территории регионов юга европейской части России. Дополнена классификация вариантов вируса ККГЛ в пределах генотипа Европа-1. Уточнены современные представления об эволюционной истории вируса ККГЛ: выполнена реконструкция процесса глобального пространственно-временного распространения штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-3, генетического варианта Крым (Vd) в пределах генотипа Европа-1.

Полученные новые данные о генетической гетерогенности вируса ККГЛ в России и мире могут использоваться для проведения эпидемиологического анализа случаев заболевания КГЛ, а также для разработки новых диагностических препаратов.

Зарегистрирована в ФГУ ФИПС база данных «Результаты генотипирования вируса ККГЛ» (свидетельство № 2017620626 от 07 июня 2017 г.) Разработаны методические рекомендации «Генетическое типирование вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки» учрежденческого уровня внедрения (утверждены директором ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора 20.06.2018 г.).

Результаты исследования используются при чтении лекций для слушателей курсов первичной специализации врачей и биологов по особо опасным инфекциям в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Положения, выносимые на защиту:

- на юге европейской части Российской Федерации выявлены штаммы вируса ККГЛ, относящиеся к трем генотипам: Европа-1, Европа-3 (описан впервые) и Африка-3;
- на территорию России происходит занос штаммов вируса ККГЛ с других регионов мира, что подтверждается выявлением РНК-изолята генотипа Африка-3;
- между штаммами генетических подгрупп Ставрополь-Ростов-Астрахань-1 (Va), Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb), Астрахань-2 (Vc) генотипа Европа-1

происходит реассортационный обмен сегментами, приводящий к формированию реассортантных генетических вариантов вируса;

- выявлены генетические варианты вируса ККГЛ, характерные для регионов РФ: новый генетический вариант Крым (Vd-Vd-Vd) генотипа Европа-1 — встречается только на территории Республики Крым, реассортантный вариант (Vc-Va-Va) — характерен для Ставропольского края, реассортантный вариант (Vc-Vb-Va) — для Астраханской области;

- распространение вируса ККГЛ на территорию России происходило в два этапа: занос вируса генетической линии Европа-3 с территории Африки и занос вируса генотипа Европа-1 с территории Западной Азии;

- популяция вируса ККГЛ на территории России относительно стабильна, в период наблюдений не выявлено значительных изменений генетической структуры и численности популяции вируса.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы определяется репрезентативностью выборки объектов исследования, длительным сроком наблюдений, использованием методов, адекватных целям и задачам исследования, и методов статистической обработки полученных результатов.

Материалы диссертации были представлены, доложены и обсуждены на: III конференции молодых ученых и специалистов «Новые научные достижения молодых ученых в эпидемиологии, клинике, диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней» (Москва, 2012); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 2014); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (Ставрополь, 2014); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург, 2015); III Всероссийской научно-практической конференции «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2016); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 2017); 1st International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (Thessaloniki, Greece, 2015); 2nd International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (Thessaloniki, Greece, 2017);

Личный вклад автора. Работа выполнялась в рамках НИР «Изучение генетической структуры популяций вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего на юге России» (№ гос. регистрации 01201352053). Основные результаты исследований, представленные в диссертации, получены и проанализированы лично автором. Автор участвовал в проведении лабораторных исследований полевого и клинического материала на наличие РНК-вируса ККГЛ, самостоятельно выполнил молекулярно-генетические исследования РНК-изолятов вируса ККГЛ, анализ и интерпретацию полученных результатов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 186 источников, в т.ч. 28 отечественных и 158 зарубежных авторов. Работа содержит 10 таблиц, иллюстрирована 19 рисунками, включает 5 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили образцы сывороток крови больных КГЛ и пробы суспензий иксодовых клещей видов *Hyalomma marginatum*, *H. scupense*, *Rhipicephallus bursa*, *R. turanicus*, *Haemaphysalis punctata*, *Dermacentor marginatus*, положительные на наличие РНК вируса ККГЛ, собранные на территории 9 субъектов ЮФО и СКФО в 2007–2016 гг. (таблица 1).

Молекулярно-биологические методы. РНК из образцов полевого и клинического материала выделяли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), вирусную кДНК получали с применением набора «РЕВЕРТА-L-100» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Индикацию РНК вируса ККГЛ в исследуемых образцах проводили методом ПЦР с использованием тест-системы «АмплиСенс® ССНФV-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), а также в соответствии с протоколом, описанным А. Jaaskelainen, 2014 г. Генетическую идентификацию РНК-изолятов вируса ККГЛ выполняли на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагментов S, M и L сегментов генома (538 п.н., 435 п.н. и 437 п.н.).

Таблица 1 — Количество исследованных образцов сывороток крови больных КГЛ и суспензий клещей, положительных на наличие РНК вируса ККГЛ

Субъект РФ	Сыворотки крови больных КГЛ		Суспензии иксодовых клещей	
	Год	Кол-во проб	Год	Кол-во пулов
Ставропольский край	2007–2016	264	2012–2016	21
Краснодарский край	–	–	2013, 2016	3
Ростовская область	2011–2016	188	2012–2016	51
Астраханская область	2011–2016	12	2016	9
Волгоградская область	2014–2016	12	–	–
Республика Калмыкия	2012–2016	21	2012, 2016	13
Республика Дагестан	2013	1	–	–
Республика Крым	2015, 2017	2	2015, 2017	9
Кабардино-Балкарская Республика	2016	1	–	–
ИТОГО	2007–2016	501	2012–2016	106

Расшифровку нуклеотидных последовательностей фрагментов генома вируса проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США).

Полноразмерные S, M и L сегменты генома вируса ККГЛ амплифицировали в виде 20 перекрывающихся фрагментов (911–1490 п.н.), эквивалентные количества

ПЦР-продуктов объединяли, осуществляли очистку ДНК с помощью набора AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (Axygen Biosciences, США) и использовали для создания shotgun-библиотек. Подготовку библиотек со средней длиной ридов 200 п.о. выполняли с использованием наборов реагентов: Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit, Ion Xpress Barcode Adapters 1–16, секвенирование проводили на генетическом анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies, США). Сборку контигов и определение их взаимного расположения проводили в программах Newbler Assembler 2.9, Newbler Mapper 2.9 (454 Life Science, USA) и VectorNTI 8.0 (Life Technologies, США).

Филогенетический анализ. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, сравнительный геномный анализ и филогенетический анализ проводили в программе Mega 5. Для построения филогенетических деревьев применяли метод объединения ближайших соседей (Neighbor joining) и максимального правдоподобия (Maximum likelihood), алгоритм Kimura-2. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев проверяли с помощью Bootstrap анализа, вычисления проводили для 1000 повторов.

Анализ молекулярной эволюции вариантов вируса ККГЛ, циркулирующих на территории России, осуществляли с использованием методов Байесовой филогении в программном обеспечении BEAST 2.0. Для построения модели пространственно-временного распространения вируса ККГЛ в процессе эволюции использовали метод дискретной филогеографии, реконструкцию «демографической истории» популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 в России осуществляли на основании анализа Bayesian Skyline Plot (BSP). Для статистической оценки результатов анализа использовали Tracer v 1.6, построение и визуализацию МСС деревьев выполняли в программах Tree Annotator 2.0 и Fig Tree v1.4.2.

Картографический анализ. Привязку координат точек сбора клещей и предполагаемых мест заражения больных КГЛ к топографической карте юга европейской части России и построение карт выполнено с помощью программного обеспечения ArcGIS 10.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение генетического разнообразия вируса ККГЛ в России

Генетическая идентификация изолятов РНК вируса ККГЛ на основании секвенирования фрагментов S, M, и L сегментов генома. Выполнено секвенирование фрагментов S, M и L сегментов генома РНК-изолятов вируса ККГЛ, выявленных в 501 пробе сыворотки крови от больных КГЛ и 106 пробах суспензий клещей, собранных на территории Ставропольского и Краснодарского краев, Ростовской, Астраханской и Волгоградской областей, Республик Дагестан, Калмыкия, Крым и Кабардино-Балкарской Республики.

Исследуемые образцы кластеризовались со штаммами двух описанных ранее генотипов: Европа-1 и Африка-3 (рис. 1). К генотипу Европа-1 относились 600 РНК-

изолятов вируса ККГЛ, к генотипу Африка-3 — один изолят вируса, выявленный в пробе сыворотки крови больной КГЛ из Ставропольского края в 2013 г.

Шесть РНК-изолятов вируса ККГЛ из двух образцов сыворотки крови от больных и четырех проб суспензий клещей *H. marginatum* на филогенетических деревьях, построенных на основе последовательностей фрагментов S и M сегментов, не кластеризовались со штаммами описанных ранее генотипов и образовывали новую генетическую линию — Европа-3 (VII). Участок L сегмента генома РНК-изолятов вируса ККГЛ генетической линии Европа-3 амплифицировать не удалось. Изоляты генетической линии Европа-3 отличались от штаммов других генотипов вируса ККГЛ на 12,1–16,9 % / 3,9–7,8 % — по нуклеотидной/аминокислотной последовательности фрагмента S сегмента, на 24,1–29,7 / 17,2–29,0 % — по нуклеотидной/аминокислотной последовательности фрагмента M сегмента.

В ранее проведенных исследованиях была предложена система классификации штаммов вируса ККГЛ, изолированных в России, в пределах генотипа Европа-1 и выделены 3 генетических подгруппы: Ставрополь-Ростов-Астрахань-1 (типовой штамм — STV/HU29223), Волгоград-Ростов-Ставрополь (типовой штамм — ROS/TI28044) и Астрахань-2 [Yashina, 2003; Карань, 2007]. Данная система классификации штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-1 была взята нами за основу при выполнении данной работы.

На дендрограмме по фрагменту S сегмента в пределах генотипа Европа-1 исследуемые изоляты вируса ККГЛ относились к трем описанным ранее подгруппам: Ставрополь-Ростов-Астрахань-1 (Va) — 450 изолятов, Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb) — 139, Астрахань-2 (Vc) — 5. Шесть изолятов: из сыворотки крови больной КГЛ, зарегистрированной в 2015 г. в г. Воронеже, инфицирование вирусом ККГЛ которой произошло при укусе клещом во время прохождения по туристическому маршруту на территории Республики Крым и 5 проб суспензий клещей *H. marginatum* и *R. bursa*, собранных при проведении эпизоотологического обследования территории Крымского полуострова в июле 2015 г. и мае-июне 2017 г., формировали описанную впервые новую подгруппу в пределах генотипа Европа-1, названную нами Крым (Vd), наиболее генетически близкую к подгруппе Астрахань-2 и штаммам из Турции Eskisehir_23-2012 и Corum_1094-2011.

На дендрограммах по фрагментам M и L сегментов изоляты из России в пределах генотипа Европа-1 принадлежали к трем подгруппам: Va — Ставрополь-Ростов-Астрахань-1, Vb — Волгоград-Ростов-Ставрополь и Vd — Крым. Генетическая подгруппа Астрахань-2 (Vc) на филогенетическом дереве по фрагменту M сегмента не выделялась, на филогенетическом дереве по фрагменту L сегмента представлена единственным штаммом K229-243, выделенным в Астраханской области в 1984 г. Исследуемые изоляты вируса, формирующие подгруппу Vc на филогенетическом дереве по участку S сегмента, при анализе по M сегменту кластеризовались со штаммами к подгрупп Va и Vb, при анализе по L сегменту входили в подгруппу Va.

Большинство исследуемых РНК-изолятов вируса ККГЛ на филогенетических деревьях по фрагментам S, M и L сегментов относились к одной и той же генетической подгруппе и принадлежали к следующим генетическим вариантам генотипа Европа-1: Va-Va-Va (408 изолятов), Vb-Vb-Vb (131 изолят), Vd-Vd-Vd (6 изолятов); генотипа Африка-3 III-III-III (1 изолят); генотипа Европа-3 VII-VII (6 изолятов). Кроме того, в пределах генотипа Европа-1 выявлены реассортантные изоляты вируса, нуклеотидные последовательности фрагментов S, M, и L сегментов генома которых относятся к разным генетическим подгруппам: Va-Vb-Va (40 изолятов), Vb-Va-Vb (1 изолят), Va-Vb-Vb (2 изолята), Vb-Va-Va (5 изолятов), Vb-Vb-Va (2 изолята), Vc-Va-Va (2 изолята), Vc-Vb-Va (3 изолята). Наибольшее количество выявленных реассортантных РНК-изолятов вируса ККГЛ (74,5 %) имели негомологичное расположение M сегмента генома; также были выявлены РНК-изоляты вируса ККГЛ, все три сегмента генома которых относились к разным генетическим подгруппам генотипа Европа-1 (генетический вариант Vc-Vb-Va).

Территориальное распределение генетических вариантов вируса ККГЛ в России. Анализ географического распространения генетических вариантов вируса ККГЛ на юге России, показал наличие локальных популяций вируса, границы которых частично перекрываются.

Изоляты генетического варианта Европа-1 Va-Va-Va распространены на территории Ставропольского края, юге Ростовской и Волгоградской областей, западе Республики Калмыкия, на юге Астраханской области, выявлены единичные изоляты на территории Республики Дагестан и Краснодарского края (рисунок 2А). Изоляты генетического варианта Европа-1 Vb-Vb-Vb циркулируют на территории центральной и южной части Ростовской области, северо-западных районах Республики Калмыкия, юге Волгоградской области, северных районах Ставропольского края, единичные изоляты выявлены в Краснодарском крае (рисунок 2Б). Реассортантные варианты вируса ККГЛ наиболее часто выявляются в районе перекрытия ареалов распространения генетических вариантов Va-Va-Va и Vb-Vb-Vb (рисунок 2В). Изоляты геноварианта Vc-Vb-Va выявлены лишь на территории Астраханской области, изоляты геноварианта Vc-Va-Va в Ставропольском крае. Штаммы вируса ККГЛ генетического варианта Европа-1 Vd-Vd-Vd эндемичны для территории Крымского полуострова. Изоляты вируса ККГЛ генотипа Европа-3 выявлены на территории Республики Калмыкия и Ставропольского края. Вирус ККГЛ генотипа Африка-3 обнаружен в Нефтекумском районе Ставропольского края (рисунок 2Г).

Генетическая структура популяции вируса ККГЛ в России. Установлены различия в соотношении генетических вариантов, циркулирующих в регионах ЮФО и СКФО, однако, при проведении многолетнего мониторинга генетической структуры популяции вируса ККГЛ в России, в период с 2007 по 2017 гг. не выявлено существенных изменений в соотношении циркулирующих геновариантов вируса в субъектах юга России, что свидетельствует об относительной стабильности популяции вируса ККГЛ на территории РФ. Соотношение генетических вариантов вируса ККГЛ в административных районах субъектов ЮФО и СКФО представлено на рисунке 3.

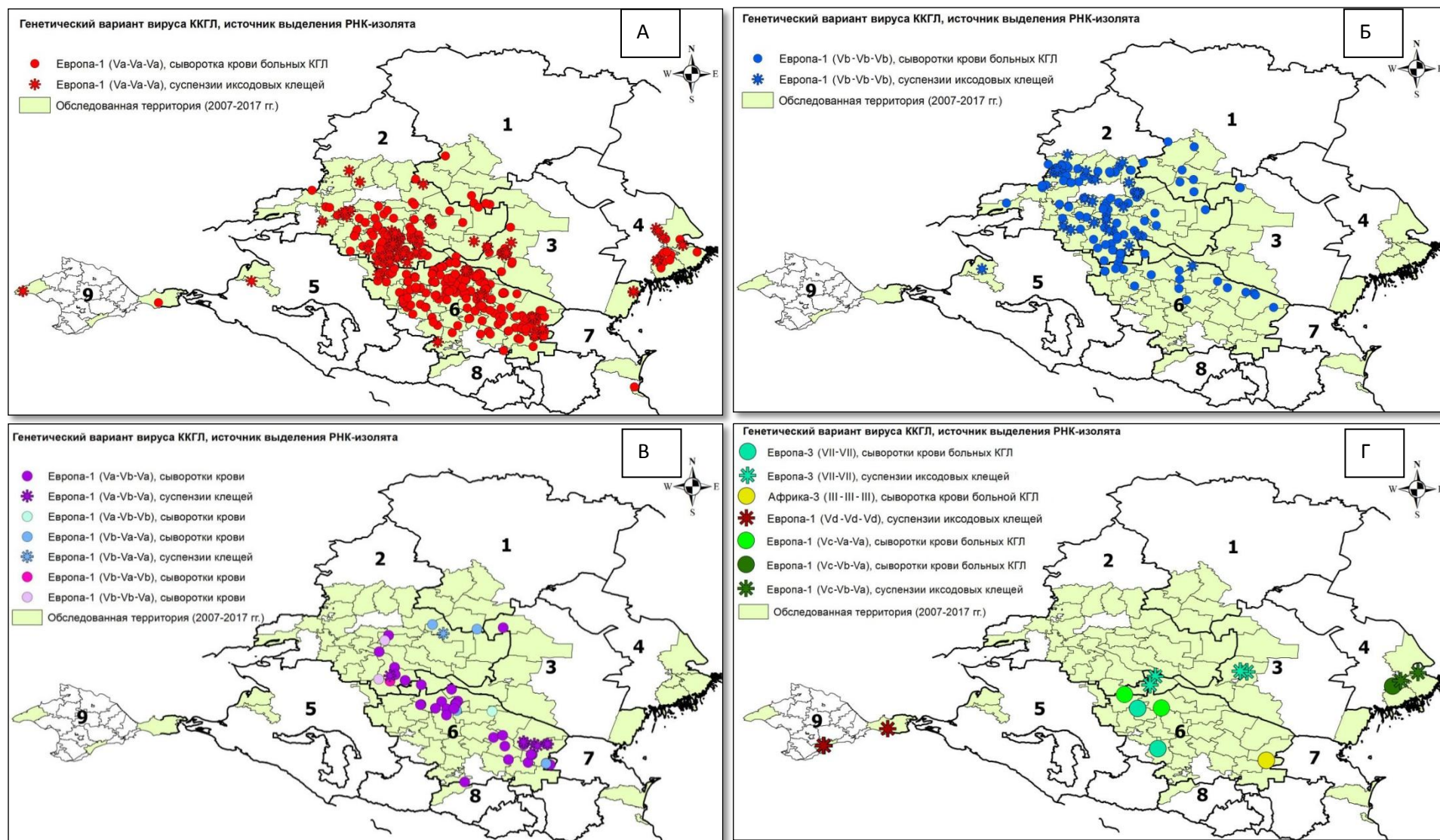


Рисунок 2 — Точки выделения РНК-изолятов вируса ККГЛ, относящихся к разным генетическим вариантам: 1 — Волгоградская область, 2 — Ростовская область, 3 — Республика Калмыкия; 4 — Астраханская область, 5 — Краснодарский край, 6 — Ставропольский край, 7 — Республика Дагестан, 8 — Кабардино-Балкарская Республика, 9 — Республика Крым.

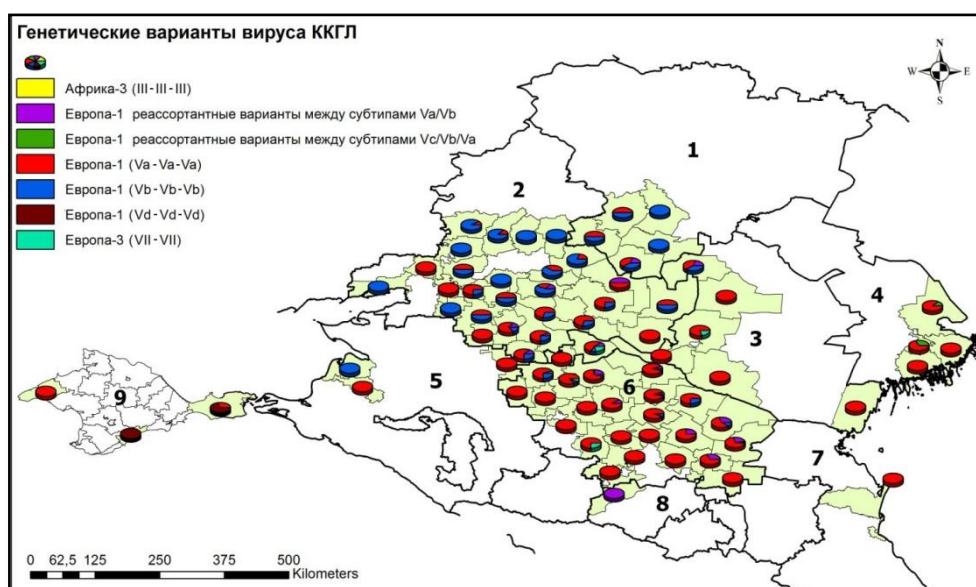


Рисунок 3 — Соотношение генетических вариантов вируса ККГЛ, циркулирующих на территории юга России. 1 — Волгоградская область, 2 — Ростовская область, 3 — Республика Калмыкия; 4 — Астраханская область, 5 — Краснодарский край, 6 — Ставропольский край, 7 — Республика Дагестан, 8 — Кабардино-Балкарская Республика, 9 — Республика Крым.

В северной части природного очага КГЛ преобладали изоляты генетического варианта Vb-Vb-Vb генотипа Европа-1, в южной — изоляты генетического варианта Va-Va-Va.

Сравнительный геномный анализ изолятов вируса ККГЛ, относящихся к основным генетическим вариантам вируса, циркулирующим на территории РФ

Секвенированы полноразмерные последовательности S, M и L сегментов генома 20 РНК - изолятов, относящихся к разным геновариантам генотипа Европа-1. Для 3 РНК-изолятов генотипа Европа-3 и 1 изолята генетической линии Африка-3 выполнено секвенирование полноразмерной нуклеотидной последовательности S сегмента генома. Секвенированные последовательности депонированы в GenBank (номера доступа: KR814833–KR814836, KR814837–KR814893, KU161582–KU161587). Топология филогенетических деревьев, построенных на основе полноразмерных кодирующих областей (ORF) S, M и L сегментов генома вируса ККГЛ сходна с топологией деревьев, построенных по фрагментам S, M и L сегментов генома (рис. 4) и подтверждает выделение генетической линии Европа-3, генетических подгрупп Ставрополь-Ростов-Астрахань-1 (Va), Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb), Астрахань-2 (Vc) и Крым (Vd) в пределах генотипа Европа-1. Несоответствие в кластеровой позиции изолятов 81-ROS/HU-2014, 46-STV/HU-2012, 68-STV/HU-2007, 36-STV/HU-2014, 44-STV/HU-2010 и штамма K229 243 на филогенетических деревьях, построенных по полноразмерным кодирующим областям S, M и L сегментов генома, свидетельствует о протекании процессов реассортационного обмена S и M сегментами генома между штаммами генетических подгрупп Va, Vb и Vc в пределах генотипа Европа-1.

Рисунок 4 — Филогенетическое дерево, построенное **А** — по нуклеотидной последовательности полноразмерной кодирующей области S сегмента (1449 bp), **Б** — по нуклеотидной последовательности полноразмерной кодирующей области M сегмента (5124 bp), **В** — по нуклеотидной последовательности полноразмерной кодирующей области L сегмента (11838 bp), методом Neighbor joining по алгоритму Kimura-2, указаны индексы поддержки bootstrap >85, рассчитанные для 1000 повторов. Маркерами отмечены образцы, исследованные в рамках данной работы. Цвет маркера соответствует генетической подгруппе, к которой относится образец при анализе по нуклеотидной последовательности кодирующей области S сегмента. Жирным шрифтом выделены реассортантные РНК-изоляты/штаммы вируса.

В результате сравнительного анализа установлено, что уровень различий полноразмерных нуклеотидных/аминокислотных последовательностей S сегмента РНК-изолятов генотипа Европа-3 и штаммов вируса ККГЛ других генотипов составляет 15,5–18,5 % / 6,2–8,5 %.

Выявлено 14 группоспецифичных аминокислотных замен, отличающих РНК-изоляты генотипа Европа-3 от штаммов вируса ККГЛ других генотипов: 6E/V, 23G/V, 150N/S, 251K/R, 255 E/D, 263K/R, 266D/E, 272S/N, 281L/F, 342K/R, 398A/D, 420S/A, 439T/A, 445D/E. Аминокислотная замена 266D/E приводит к мутации в области сайта DEVD (позиции 266–269 аминокислотной последовательности нуклеопротеина), являющимся сайтом действия каспазы-3.

Различия полноразмерной нуклеотидной и аминокислотной последовательности S сегмента РНК-изолята 73-STV/HU-2013 с последовательностями остальных штаммов генотипа Африка-3 составили 2,7–4,5 % и 0,4–2,3 % соответственно. Выявлена аминокислотная замена в последовательности белка нуклеопротеина 482 N/I, отличающая РНК-изолят 73-STV/HU-2013 от остальных штаммов генотипа Африка-3.

Сравнительный анализ полноразмерных нуклеотидных последовательностей S, M и L сегментов РНК-изолятов, формирующих разные генетические подгруппы в пределах генетической линии Европа-1 показал, что штаммы генотипа Европа-1, различаются между собой на 0,5–6,1 % и 0–2,1 % по нуклеотидной и аминокислотной последовательности S сегмента, на 3,3–6,3 % и 2,8–6,5 % — по нуклеотидной и аминокислотной последовательности M сегмента, на 1,0–4,7 % по нуклеотидной и 0,4–1,7 % — по аминокислотной последовательности L сегмента.

Выявлено 3 аминокислотных замены в последовательности нуклеопротеина, отличающих штаммы генетической подгруппы Vc: 108D/E, 187G/E, 195H/R. В 47 позициях последовательности M-полипротеина обнаружены группоспецифичные аминокислотных замены, характерные для штаммов подгрупп Va (17 замен), Vb (7 замен) и Vd (23 замены). В 40 позициях аминокислотной последовательности L-протеина выявлены группоспецифичные аминокислотных замены, отличающие штаммы подгрупп Va (3 замены), Va и Vb (3 замены), Vd (12 замен) и Vc (23 замены). Аминокислотные замены в последовательностях M- и L-протеинов, уникальные для штаммов разных генетических подгрупп генотипа Европа-1, распределены неравномерно в пределах аминокислотных последовательностей белков и расположены в области различных функциональных доменов белков вируса. Не выявлено аминокислотных замен в области трансмембранных доменов M-протеина, изменения в которых приведут к нарушению цикла репликации вируса.

Эволюция популяции вируса ККГЛ на территории России

Реконструкция пространственно-временной эволюционной истории штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-3. Выполнен анализ дискретной филогеографии вируса ККГЛ на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей кодирующей области S сегмента генома. Скорость эволюции

вируса ККГЛ, рассчитанная на основании анализа нуклеотидной последовательности кодирующей области S сегмента составила $8,9 \cdot 10^{-5}$ нуклеотидных замен/ на сайт/ в год [HPD 95% интервал $5,0 \cdot 10^{-5}$ – $1,3 \cdot 10^{-4}$].

Установлено, что штаммы генетических линий Европа-3, Европа-2 и Африка-1, произошли от общего предка наиболее вероятно, циркулировавшего на территории Африки (pp=0,65) (рисунок 5). Ближайший общий предок штаммов генотипа Европа-3 был занесен с территории Африки и в дальнейшем (с 1889 г.) циркулировал и эволюционировал на территории юга европейской части России (pp=0,98).

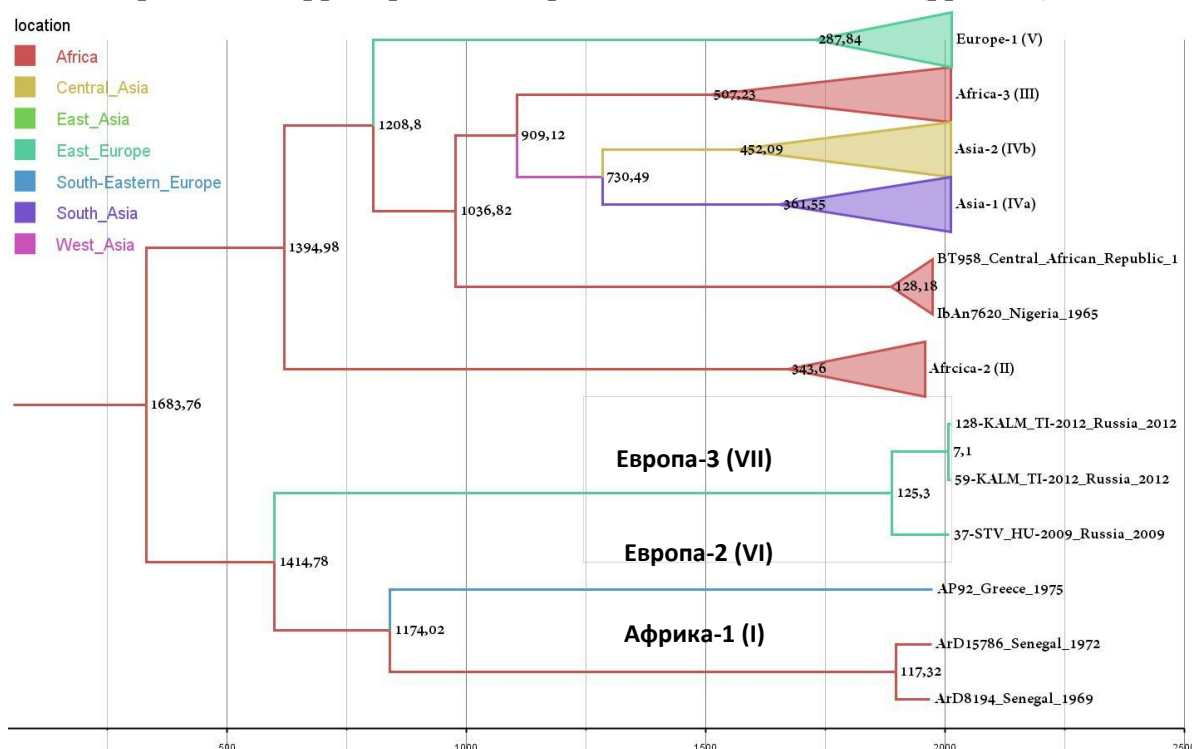


Рисунок 5 — Байесовское датированное филогенетическое дерево (MCC) для штаммов вируса ККГЛ, построенное на основании анализа полноразмерных последовательностей ORF S сегмента генома вируса. Цветом указаны наиболее вероятные регионы происхождения кладов и кластеров. У основания узла указан возраст клады.

Реконструкция пространственно-временной эволюционной истории штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-1. Проведен анализ дискретной филогеографии на основе полноразмерных нуклеотидных последовательностей кодирующих областей S, M и L сегментов генома штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-1. Наиболее репрезентативная выборка штаммов проанализирована на основе нуклеотидной последовательности S сегмента.

Скорость эволюции штаммов вируса ККГЛ генетической линии Европа-1, составила $4,7 \cdot 10^{-5}$ нуклеотидных замен/на сайт/в год [HPD 95 % интервал $1,5 \cdot 10^{-5}$ – $8,2 \cdot 10^{-5}$] при анализе нуклеотидной последовательности ORF S сегмента, возраст генотипа Европа-1 составил 562 года [HPD 95% интервал 201–1086 лет]. При анализе по S сегменту установлено, что распространение генетических вариантов вируса ККГЛ генотипа Европа-1 происходило через территорию Западной Азии (Турции и Ирана) (Рисунок 6, 7).

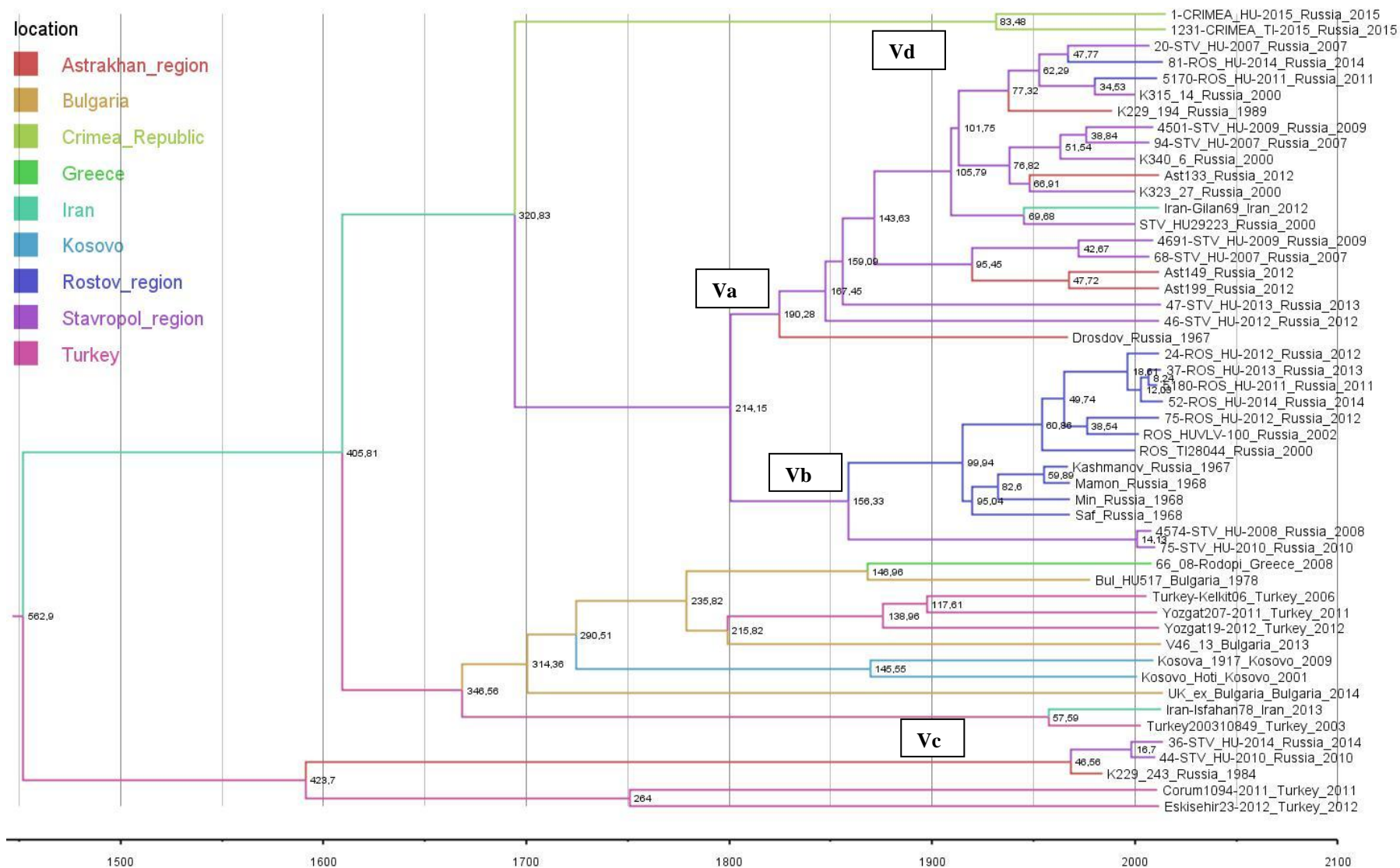


Рисунок 6 — Байесовское датированное филогенетическое дерево (MCC), построенное на основании анализа полноразмерных последовательностей ORF S сегмента генома штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-1. Цветом указаны наиболее вероятные регионы происхождения кладов и кластеров. У основания узла указан возраст клады.

Регионом циркуляции ближайшего общего предка штаммов генотипа Европа-1 является Турция ($pp=0,26$) или Иран ($pp=0,23$). Общий предок штаммов генетических подгрупп Астрахань-2 (Vc) и Турция-2 циркулировал в Турции ($pp=0,3$), откуда распространился на территорию Астраханской области ($pp=0,72$), где сформировались штаммы генетической подгруппы Астрахань-2 (Vc), проникшие позже на территорию Ставропольского края. Распространение штаммов генетических подгрупп Ставрополь-Ростов-Астрахань-1 (Va), Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb) и Крым (Vd) на территорию РФ происходило с территории Ирана ($pp=0,26$), откуда вирус был занесен на территорию Ставропольского края и Крымского полуострова. В Ставропольском крае ($pp=0,62$) сформировались штаммы генетических подгрупп Ставрополь-Ростов-Астрахань (Va) и Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb), распространившиеся в дальнейшем по территории юга европейской части России. На территории полуострова Крым сформировались штаммы подгруппы Крым (Vd) ($pp=0,85$).

Необходимо отметить, что через территорию Турции (вдоль побережья Черного моря), Ирана (вдоль южного и западного побережье Каспийского моря) и Астраханской области (вдоль русла Волги) проходят основные пути сезонных миграций птиц из Южной и Восточной Европы в Северную Африку, что подтверждает возможность заноса вируса ККГЛ из Африки в эти регионы (Турцию, Иран) и дальнейшего его распространения на территорию регионов юга европейской части России, Крымского полуострова и стран Балканского полуострова.

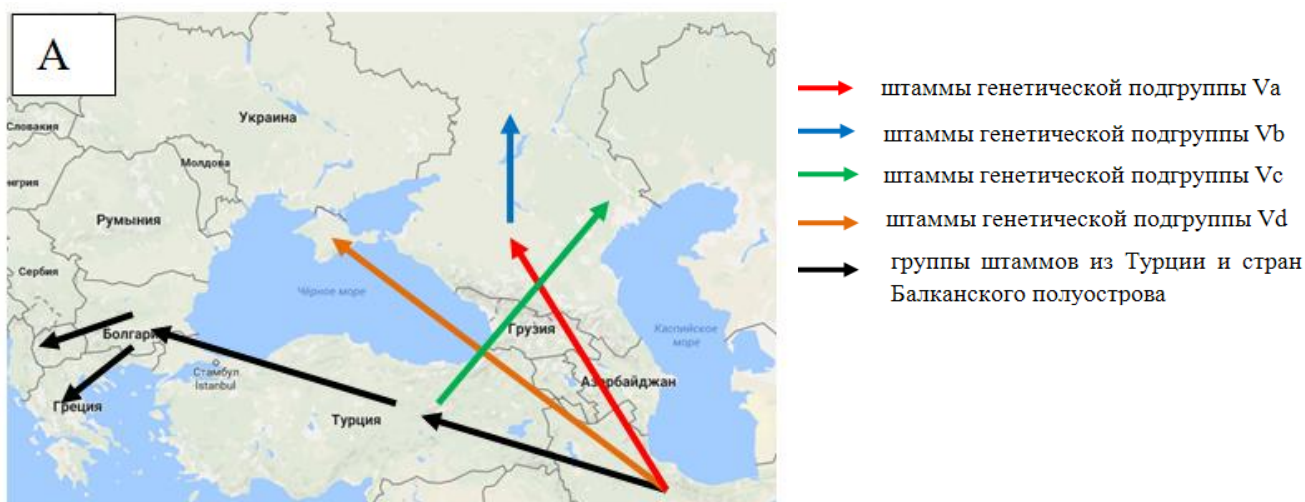


Рисунок 7 — Карта-схема распространения генетических вариантов вируса ККГЛ генотипа Европа-1, построенная на основе анализа нуклеотидных последовательностей ORF А — S сегмента генома, Б — М сегмента генома, В — L сегмента генома.

Реконструкция демографической истории популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 в России. С целью реконструкции демографической истории популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 на территории России, выявления изменений размера популяции с течением времени выполнен Bayesian Skyline Plot

(BSP) анализ объединенных нуклеотидных последовательностей фрагментов S, M и L сегментов генома штаммов и РНК-изолятов вируса генотипа Европа-1. График, отображающий изменения «эффективного размера» популяции вируса ККГЛ представлен на рисунке 8.

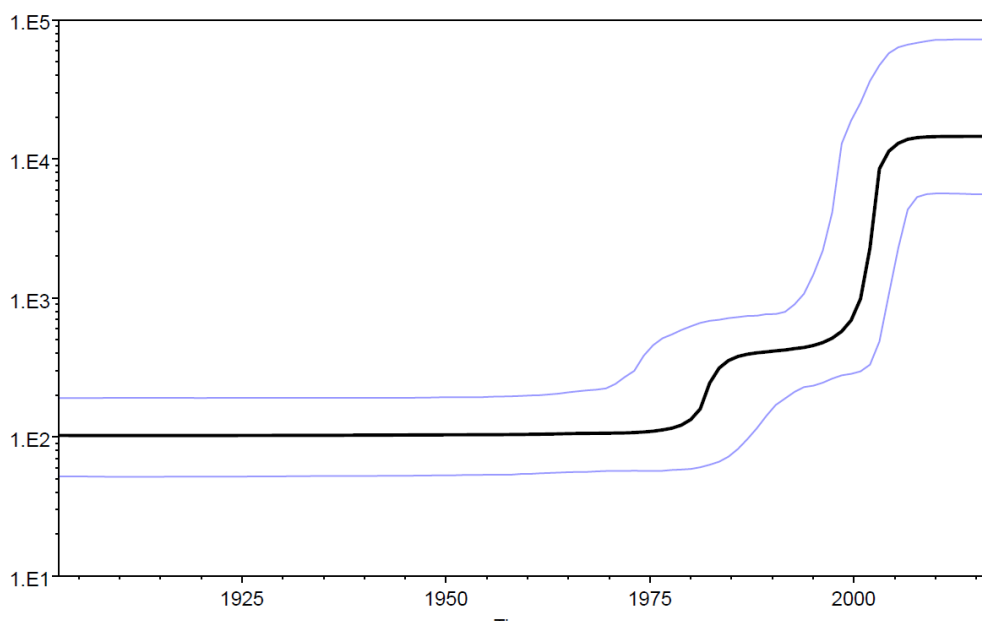


Рисунок 8 — График изменения «эффективного размера» популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 на территории РФ в течение времени.

В результате анализа выявлено резкое увеличение численности вирусной популяции в периоды с 1980 г. по 1985 г. и с 2000 г. по 2005 г. В регионах юга России с 1999 г. по н.в. отмечаются эпидемические проявления КГЛ (пик заболеваемости зарегистрирован в 2007–2008 гг.) Период активизации природного очага КГЛ в РФ в 1999 г. совпадает с периодом резкого увеличением размера популяции вируса ККГЛ в 2000–2005 гг., выявленным в результате анализа BSP. С 2005 г. по 2017 г. «эффективный размер» популяции не изменяется, что свидетельствует об относительной стабильности популяции вируса ККГЛ на территории России в настоящее время.

В результате выполнения данной работы получены новые сведения о генетическом разнообразии вируса ККГЛ, особенностях территориального распределения и эволюции вариантов вируса, циркулирующих в России.

ВЫВОДЫ

1. Получены новые данные о генетическом разнообразии вируса ККГЛ в России. Впервые на молекулярном уровне охарактеризованы РНК-изоляты вируса ККГЛ, циркулирующие на территории Республик Калмыкия, Крым, Дагестан, Краснодарского края. На территории РФ выявлены варианты вируса ККГЛ, относящиеся к трем генетическим линиям. Впервые на территории РФ выявлены РНК-изоляты новой генетической линии Европа-3 и генотипа Африка-3. В пределах

генотипа Европа-1 впервые описана новая генетическая подгруппа Крым (Vd). Выявлены реассортантные варианты вируса ККГЛ в пределах генотипа Европа-1.

2. Определены ареалы распространения генетических вариантов вируса ККГЛ на территории России. Показано преобладание в северной части природного очага КГЛ генетического варианта Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb-Vb-Vb) генотипа Европа-1, в южной части — генетического варианта Ставрополь-Ростов-Астрахань (Va-Va-Va) генотипа Европа-1. Доля реассортантных геновариантов составляет 9 %, изолятов генетической линии Европа-3 — 1 %. Выявлены генетические типы вируса ККГЛ, характерные для регионов РФ: генетический вариант Крым (Vd-Vd-Vd) — встречается только на территории Республики Крым, реассортантный геновариант (Vc-Va-Va) — характерен для Ставропольского края, реассортантный вариант (Vc-Vb-Va) — для Астраханской области.

3. На основании сравнительного анализа полноразмерных последовательностей S, M и L сегментов генома вируса ККГЛ выявлены специфичные аминокислотные замены для штаммов генотипа Европа-3 и группоспецифичные аминокислотные замены для штаммов генетических подгрупп Va, Vb, Vc и Vd генотипа Европа-1.

4. В результате анализа дискретной филогеографии вируса ККГЛ дополнены представления о пространственно-временном распространении вируса ККГЛ. Показано, что распространение вируса ККГЛ на территорию России происходило в два этапа: в 1803–1968 гг. из Африки были занесены штаммы генетической линии Европа-3, в 1825–1967 гг. из Западной Азии — штаммы генетической линии Европа-1.

5. Впервые выполнена реконструкция демографической истории популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 на территории России, в результате установлено, что динамика изменения размера вирусной популяции согласуется с периодами подъема заболеваемости КГЛ в РФ. С 2005 г. размер популяции вируса ККГЛ генотипа Европа-1 не изменяется, что свидетельствует об относительной стабильности популяции вируса ККГЛ в России.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные статьи:

1. **Волынкина А.С.**, Куличенко А.Н. Генетический мониторинг Крымской-Конго геморрагической лихорадки на юге Европейской части России в 2011 году // Проблемы особо опасных инфекций. - 2012. - Вып. 4 (114). - С. 80-85.
2. **Волынкина А.С.**, Пакскина Н.Д., Яценко Е.В., Котенев Е.С., Леванцова Я.В., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Тохов Ю.М., Куличенко А.Н. Анализ эпидемиологической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2013 г. и прогноз на 2014 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – № 2. – С. 40–43.

3. Яшина Л.Н., Малышев Б.С., Нетесова Н.А., **Волынкина А.С.**, Василенко Н.Ф. Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулировавший в Ставропольском крае в 2011 г. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 4. – С. 25–29.
4. **Волынкина А.С.**, Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Куличенко А.Н. Крымская геморрагическая лихорадка в Российской Федерации в 2014 г., прогноз эпидемиологической обстановки на 2015 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. - № 1. - С. 42-45.
5. Куличенко А.Н., **Волынкина А.С.**, Котенев Е.С., Писаренко С.В., Шапошникова Л.И., Лисицкая Я.В., Василенко Н.Ф., Цыганкова О.И., Евченко Ю.М., Тохов Ю.М., Савельев В.Н., Тихонов С.Н., Пеньковская Н.А. Новый генетический вариант вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выявленный в Крыму // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – Т. 34, № 2. – С. 76-80.
6. **Волынкина А.С.**, Куличенко А.Н. Современные методы молекулярно-генетического анализа крымской геморрагической лихорадки в системе эпидемиологического надзора // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2016. - № 1. – С. 53-60.
7. **Волынкина А.С.**, Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 1. - С. 24-28.

Тезисы научных конференций:

1. **Волынкина А.С.**, Карань Л.С., Василенко Н.Ф., Варфоломеева Н.Г. Генетическая идентификация вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, вызвавшего внутрибольничное заражение // Материалы X съезда Всерос. науч.-практич. общества эпидемиол., микробиол. и паразитол. «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации». Москва, 12-13 апр. 2012 г. // Инфекция и иммунитет. - 2012. - Т. 2, № 1-2. - С. 475-476.
2. **Волынкина А.С.**, Мисетова Е.Н., Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Генотипирование вируса Крымско-Конго геморрагической лихорадки, циркулировавшего на территории Ставропольского края, Ростовской и Астраханской областей в 2011 г. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных : матер. Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием (23-24 мая 2012 г. Ставрополь). - Ставрополь, 2012. - С. 116-117.
3. Яшина Л.Н., Малышев Б.С., Нетесова Н.А., **Волынкина А.С.**, Василенко Н.Ф. Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки в Ставропольском крае, 2011 // Диагностика и профилактика инфекционных болезней: материалы научно-практической конференции (26-28 сентября 2013 г., Новосибирск). – Новосибирск: Изд-во «Ареал», 2013. – С.116-117.

4. **Волынкина А.С.**, Котенев Е.С., Леванцова Я.В. Молекулярно-генетическая идентификация вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих на юге России // Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Причерноморском регионе: матер. региональной науч.-практ. конф. с международным участием, 24-25 сентября 2013 г.
5. **Волынкина А.С.**, Леванцова Я.В. Молекулярная детекция и генетическая характеристика вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выявленного в клещах на юге России // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: матер. VI Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2014. – С. 56.
6. Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., **Волынкина А.С.**, Дубянский В.М., Евченко Ю.М. Комплексное использование молекулярного типирования штаммов возбудителей особо опасных инфекций и ГИС-технологий в эпидемическом анализе // Молекулярная диагностика: сборник трудов VIII Всерос. научно-практ. конференции с международ. участием. – М., 2014. – Т. 1. – С. 487-488.
7. **Volynkina A.**, Levantsova Y., Kotenev E. Molecular Detection and Genetic Characterization of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks from South Russia / Joint Meeting of the German Society for Medical Entomology and Acarology (DGMEA) and the Workshop on Tick-borne Diseases of the National Reference Laboratory for Q-Fever, in Berlin, September 30th – October 2nd. - Jena, 2014. – P. 60.
8. **Волынкина А.С.**, Лисицкая Я.В., Бурлаченко А.В., Котенев Е.С., Куличенко А.Н. Новые и реассортантные варианты вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующие на юге России // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: матер. международ. конф. (23-24 июня 2015 г., Москва). – М., 2015. – С. 95-98.
9. **Volynkina AS**, Kotenev ES, Lisitskaya YaV Genetic Analysis Of The Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus In The South Of Russia // 1-st International Conference of Crimean-Congo hemorrhagic fever (13-14 february 2015, Thessaloniki, Greece).
10. **Волынкина А.С.** Лисицкая Я.В., Котенев Е.С. Молекулярная эпидемиология вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки на юге России 87-89 // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: матер. III Всероссийской науч.-практ. конф. с международ. участием, Сочи, 1-4 нояб. 2016 г. – Сочи, 2016. – С. 87-89.
11. **Волынкина А.С.** Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Писаренко С.В., Куличенко А.Н. Генетическое разнообразие и эволюция вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки на Юге России // Молекулярная диагностика 2017:

- сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием : В 2-х т. / под ред. В.И. Покровского. Т. 1. – М.; Тамбов : Юлис, 2017. – С. 301–302.
12. **Volynkina A.**, Kotenev E., Maletskaia O., Kulichenko A.N. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Russia // 2nd International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, 10-12 sept., 2017, Thessaloniki. – Thessaloniki, 2017. - С. 36.
13. Вакалова Е.В., **Волинкина А.С.**, Котенев Е.С., Куликова Л.Н., Викторова Н.В. Детекция и генетическая характеристика рнк-изолятов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выделенных из клещей *Hyalomma marginatum* в Астраханской области (2016 г.) // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: матер. IV всерос. науч.-практ. конф. с международным участием, Сочи, 1-4 ноября 2017 г. – Краснодар: Полиграф-ЮГ, 2017. – С. 39-40.
14. **Волинкина А.С.**, Лисицкая Я.В., Котенев Е.С. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выделенных на территории Республики Крым в 2015–2017 гг. // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения : матер. XI съезда Всерос. науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 16–17 ноября 2017 г. / под ред. А.Ю. Поповой. - СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2017. – С. 195.

Монография:

1. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., **Волинкина А.С.** и др. Крымская геморрагическая лихорадка / Воронеж: ООО «Фаворит», 2018 – 288 с.

Благодарности

Автор благодарит своих коллег, в плодотворном сотрудничестве с которыми была выполнена диссертационная работа: к.б.н. Котенева Е.С., к.б.н. Лисицкую Я.В., к.х.н. Писаренко С.В.

Автор выражает благодарность коллегам, предоставившим образцы полевого материала для данного исследования: к.б.н. Шапошниковой Л.И., д.б.н. Тохову Ю.М., к.б.н. Цапко Н.В., к.б.н. Заикиной И.Н.

Особую благодарность автор выражает д.б.н., проф. Василенко Н.Ф. за помощь в выборе темы, направления исследований и всестороннюю поддержку.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю члену-корреспонденту РАН, д.м.н., проф. Куличенко А.Н. за осуществление общего руководства, а также активную поддержку в планировании, проведении и интерпретации результатов исследования.