



## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177>

© БЛИНОВА Е.А., МАКЕНОВ М.Т., МОРОЗКИН Е.С., ХОЛОДИЛОВ И.С., ФЕДОРОВА М.В., ЖУРЕНКОВА О.Б., РОЕВ Г.В., ХАФИЗОВ К.Ф., КАРАНЬ Л.С., 2023

## Генетические особенности вируса Пуумала (*Hantaviridae*: *Orthohantavirus*), обнаруженного в Московской области

Блинова Е.А.<sup>1,2</sup>, Макенов М.Т.<sup>1</sup>, Морозкин Е.С.<sup>1</sup>, Холодильов И.С.<sup>2</sup>, Федорова М.В.<sup>1</sup>, Журенкова О.Б.<sup>1</sup>, Роев Г.В.<sup>1,3</sup>, Хафизов К.Ф.<sup>1</sup>, Карань Л.С.<sup>1</sup><sup>1</sup>ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;<sup>2</sup>ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), 108819, г. Москва, Россия;<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701, г. Москва, Россия

**Введение.** Вирус Пуумала (семейство *Hantaviridae*, род *Orthohantavirus*) распространен в большинстве регионов Европейской части России. Однако сведения о его генетических вариантах, циркулирующих на территории Центрального федерального округа, крайне скудны.

**Цель работы** – изучение генетических вариантов вируса Пуумала, циркулирующих в грызунах на территории Волоколамского района Московской области.

**Материалы и методы.** Ткани грызунов исследовали методом ПЦР на наличие РНК хантавирусов. Амплифицированные фрагменты сегмента L секвенировали методом Сэнгера. Для двух образцов были получены последовательности всех трех сегментов методом NGS. Филогенетические деревья строили в программе MEGA X.

**Результаты.** В 6 исследуемых образцах был обнаружен вирус Пуумала. Филогенетический анализ, основанный на последовательностях трех сегментов, показал, что обнаруженные генетические варианты принадлежат к сублинии, обозначенной ранее как W-RUS.

**Заключение.** На территории Волоколамского района Московской области циркулирует генетический вариант вируса Пуумала, относящийся к сублинии W-RUS.

**Ключевые слова:** ортохантавирус Пуумала; сублиния W-RUS; рыжая полевка; филогеография

**Для цитирования:** Блинова Е.А., Макенов М.Т., Морозкин Е.С., Холодильов И.С., Федорова М.В., Журенкова О.Б., Роев Г.В., Хафизов К.Ф., Карань Л.С. Генетические особенности вируса Пуумала (*Hantaviridae*: *Orthohantavirus*), обнаруженного в Московской области. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(4): 283–290. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177> EDN: <https://elibrary.ru/nuunok>

**Для корреспонденции:** Блинова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия. E-mail: [blinova.e@cmd.su](mailto:blinova.e@cmd.su)

**Участие авторов:** Блинова Е.А. – концепция исследования, проведение экспериментов, интерпретация данных, подготовка текста; Макенов М.Т. – сбор материала, подготовка текста; Морозкин Е.С. – проведение экспериментов, подготовка текста; Холодильов И.С. – сбор материала, подготовка текста; Федорова М.В. – сбор материала; Журенкова О.Б. – проведение экспериментов; Роев Г.В. и Хафизов К.Ф. – анализ данных секвенирования; Карань Л.С. – концепция исследования, подготовка текста статьи для публикации.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом (Протокол № 92 от 20 мая 2019 г.).

Поступила 07.06.2023

Принята в печать 03.08.2023

Опубликована 31.08.2023

## ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177>

## Genetic features of the Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) identified in the Moscow region

Ekaterina A. Blinova<sup>1,2</sup>, Marat T. Makenov<sup>1</sup>, Evgeny S. Morozkin<sup>1</sup>, Ivan S. Kholodilov<sup>2</sup>, Marina V. Fedorova<sup>1</sup>, Olga B. Zhurenkova<sup>1</sup>, German V. Roev<sup>1,3</sup>, Kamil F. Khafizov<sup>1</sup>, Ludmila S. Karan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of poliomyelitis), 108819, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 141701, Moscow, Russia

**Introduction.** Puumala virus (family *Hantaviridae*, genus *Orthohantavirus*) is distributed in most regions of the European part of Russia. However, information about its genetic variants circulating on the territory of the Central Federal District is extremely scarce.

**Materials and methods.** Rodents' tissue samples were tested after reverse transcription by PCR for the presence of hantaviral RNA. The amplified fragments of the L segment were sequenced by the Sanger method. For two samples, sequences of all three segments were obtained using the NGS method. Phylogenetic trees were built in the MEGA-X software.

**Results.** Puumala virus was found in six samples. Based on the phylogenetic analysis of sequences of three segments, the obtained genetic variants belong to the sublineage previously designated as W-RUS.

**Conclusion.** A genetic variant of the Puumala virus, belonging to the subline W-RUS, circulates on the territory of the Volokolamsk district of Moscow region.

**Keywords:** *Puumala orthohantavirus*; sublineage W-RUS; bank vole; phylogeography

**For citation:** Blinova E.A., Makenov M.T., Morozkin E.S., Kholodilov I.S., Fedorova M.V., Zhurenkova O.B., Roev G.V., Khafizov K.F., Karan L.S. Genetic features of the Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) identified in the Moscow region *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 283–290. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-177> EDN: <https://elibrary.ru/nuunok>

**For correspondence:** Ekaterina A. Blinova, Researcher of the Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia. E-mail: [blinova.e@cmd.su](mailto:blinova.e@cmd.su)

### Information about the authors:

Ekaterina A. Blinova, <https://orcid.org/0000-0002-0735-5627>

Marat T. Makenov <https://orcid.org/0000-0002-6835-4572>

Evgeny S. Morozkin <https://orcid.org/0000-0001-8407-2623>

Ivan S. Kholodilov, <https://orcid.org/0000-0002-3764-7081>

Marina V. Fedorova <https://orcid.org/0000-0002-1232-1624>

Olga B. Zhurenkova, <https://orcid.org/0000-0003-1571-4826>

German V. Roev, <https://orcid.org/0000-0002-2353-5222>

Kamil F. Khafizov, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Ludmila S. Karan, <https://orcid.org/0000-0002-5927-460X>

**Contribution:** Ekaterina A. Blinova. – the study concept, conducting of the experiments, interpretation of the data, preparing of the text; Marat T. Makenov – collection of the material; Evgeny S. Morozkin – conducting of the experiments; Ivan S. Kholodilov – collection of the material; Marina V. Fedorova – collection of the material; Olga B. Zhurenkova – conducting of the experiments; German V. Roev and Kamil F. Khafizov – analysis of sequencing data; Ludmila S. Karan – the study concept, final approval of the article for publication.

**Funding.** The research was funded by the State budget.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Local Ethics Committee (Protocol No. 92 dated 20 May 2019).

Received 07 June 2023

Accepted 03 August 2023

Published 31 August 2023

### Введение

Представители рода *Orthohantavirus* являются одними из важнейших вирусных зоонозов. Они были обнаружены на всех континентах, кроме Антарктиды.

В большинстве случаев каждый вид хантавируса ассоциирован с одним видом мелких млекопитающих, являющихся их природным резервуаром [1]. Патогенные для человека хантавирусы переносятся грызуна-

ми [2], в популяциях которых они циркулируют в виде бессимптомной инфекции. Заражение происходит при вдыхании пылевых аэрозолей, образующихся из выделений зараженных животных, а также при укусах [3]. У человека они могут вызвать геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) либо хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) [2, 4].

В России обнаружены несколько патогенных хантавирусов: вирусы Пуумала, Хантаан, Сеул и Доброва-Белград (варианты Куркино и Сочи) [5]. Наиболее важным возбудителем является вирус Пуумала, на его долю приходится до 98% от всей заболеваемости ГЛПС в России [5]. Он вызывает ГЛПС с низкой летальностью (менее 1%), в Европе более известную как эпидемическая нефропатия. Природным резервуаром вируса Пуумала является рыжая полевка *Myodes glareolus* [6].

Жизнедеятельность популяций грызунов-носителей хантавирусов зависит от климатических условий, влияющих на урожай семян и возможность подснежного размножения, в связи с чем заболеваемость ГЛПС варьируется год от года [7]. Максимальная численность популяции рыжей полевки приходится на широколиственные и хвойно-широколиственные смешанные леса, поэтому наиболее эпидемиологически активные очаги ГЛПС-Пуумала в России расположены на Урале и Среднем Поволжье [5, 7].

Вирионы вируса Пуумала покрыты оболочкой и содержат три геномных сегмента одноцепочечной РНК отрицательной полярности: малый (S), средний (M) и большой (L), их длина составляет приблизительно 1828, 3650 и 6550 нуклеотидов соответственно [8].

Вирус Пуумала разделяют на 8 генетических линий: Центральноевропейская (CE), Альпийско-Адриатическая (ALAD), Датская (DAN), Южно-Скандинавская (S-SCAN), Северо-Скандинавская (N-SCAN), Финская (FIN), Русская (RUS) и Латвийская (LAT) [9, 10]. Генетические линии RUS, FIN и LAT имеют общего предка и происходят из одной рефугии [10]. В России был обнаружен вирус Пуумала, относящийся к линиям RUS и FIN [11, 12], также на территории Курской области был найден вирус, относящийся к ветви, получившей название W-RUS [13].

Заболеваемость ГЛПС регистрируется в 52 регионах Европейской территории России [5]. При этом основная ее часть сконцентрирована в Приволжском федеральном округе (ПФО) [14–18]. На Центральный федеральный округ (ЦФО) приходится около 13% всей заболеваемости ГЛПС в России. Количество случаев ГЛПС в ЦФО, большая часть которых вызвана вирусом Пуумала, увеличилась примерно на 1/3 по сравнению с предыдущим десятилетием [19]. Несмотря на относительно высокие показатели заболеваемости, данные о нуклеотидных последовательностях хантавирусов, циркулирующих на этой территории, весьма скудны. В частности, нам не удалось найти в базе данных GenBank (NCBI) полных кодирующих последовательностей S-сегмента, изолированных на территории ЦФО, помимо результатов, полученных в нашем

предыдущем исследовании [13]. В настоящей работе мы исследовали вирусы, которые были выделены от рыжих полевок, отловленных на территории Волоколамского района Московской области.

## Материалы и методы

### Сбор биологического материала

Отлов грызунов проводили в Волоколамском районе Московской области в 2019–2020 гг. с использованием ловушек Щипанова [20]. Сбор проводился в три этапа: 17–18.06.2019 было поймано 42 особи (окрестности с. Новопавловское, 55,935984° с.ш., 36,169937° в.д., 200 ловушко-суток), 18–19.09.2019 – 26 особей (окрестности с. Новопавловское, 90 ловушко-суток) и 28.07–04.08.2020 – 41 особь (окрестности с. Суворово, 56,127875° с.ш., 35,871444° в.д. и с. Алферьево, 450 ловушко-суток). Видовую принадлежность мелких млекопитающих определяли морфологически. Затем животных умерщвляли и от них стерильно забирали участки тканей печени, селезенки, почек и легких. В настоящей работе следовали стандартным методам безопасного обращения и отбора проб от мелких млекопитающих, которые потенциально заражены инфекционными патогенами [21]. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом (Протокол № 92 от 20 мая 2019 г.).

### Экстракция РНК

Экстракцию РНК проводили из 10% суспензии тканей легких, приготовленной на PBS-буфере, с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно инструкции производителя.

### Аmplификация и секвенирование

Для получения кДНК использовали набор «Реверта L» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора согласно инструкции производителя. Далее все образцы были протестированы с помощью «вложенной» полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием родоспецифичных праймеров, амплифицирующих участок L-сегмента [22]. Полученные ампликоны были секвенированы методом Сэнгера с внутренними праймеров «вложенной» ПЦР.

Для получения протяженных последовательностей трех сегментов с помощью праймеров, информация о которых опубликована ранее [13], были получены ампликоны размером около 1200 нуклеотидов с перекрывающимися областями около 500 нуклеотидов.

Полученные ампликоны для каждой из проб были смешаны в эквимолярном соотношении. Для получения индексированных библиотек использовали набор Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Выделение фрагментов ДНК

в диапазоне от 200 до 400 п.н. проводили с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Диапазон длин фрагментов оценивали с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Германия) на биоанализаторе Agilent 2100. Измерение концентрации полученных библиотек проводили при помощи количественной ПЦР (NEBNext Library Quant Kit for Illumina, New England Biolabs, Великобритания). Нормализованные библиотеки секвенировали с помощью прибора MiSeq с использованием MiSeq Reagent Kit v3.

#### Сборка первичных данных

Для предварительной обработки fastq файлов использовали программы Trimmomatic v0.39 [23] и cutadapt v3.4 [24]. Выравнивание ридов на референсы проводили в программе bowtie2 v2.4.4 [25], в качестве референсов использовали последовательности вируса Пуумала NC\_005224.1, NC\_005223.1, NC\_005225.1 для S, M и L-сегментов соответственно. Сборку консенсусов проводили последовательно 2 раза. Сначала – с помощью Lofreq v2.1.5 [26] и bcftools consensus v1.13 [27], после чего полученные консенсусы использовали повторно в качестве референсов в bowtie2. Вторую сборку консенсусов осуществляли с использованием GATK HaplotypeCaller v4.2.0.0 [28] и bcftools consensus.

#### Филогенетический анализ

Для построения филогенетических деревьев и расчета генетических дистанций использовали программу MEGA X [29]. Конструирование филогенетических деревьев проводили методом Maximum Likelihood с применением модели General Time Reversible (G+I). Полученные последовательности были дополнены другими последовательностями вируса Пуумала из базы данных GenBank.

#### Результаты

В ходе полевых работ было отловлено 109 грызунов (табл. 1). В сообществе мелких млекопитающих сме-

шанного леса в отловах преобладали рыжие полевки *M. glareolus*, а на лугу и в кустарниковых зарослях вдоль ручья – малая лесная мышь (*A. uralensis*) и желтогорлая мышь (*A. flavicollis*).

В результате ПЦР-анализа среди отловленных животных в образцах *M. glareolus* было выявлено 6 образцов, содержащих РНК хантавирусов. Три положительные особи были отловлены вблизи села Новопавловское, две – рядом с Суворово, одна – в Алферьево. Доля инфицированных рыжих полевок составила 7,3%.

Положительные образцы были секвенированы с праймерами, фланкирующими фрагмент L-гена, длиной 347 п.н. В таблице 2 указаны идентификаторы полученных последовательностей в базе данных GenBank. Все последовательности относились к вирусу Пуумала.

Для образцов № 57 и 79 из окрестностей с. Новопавловское и с. Суворово удалось получить протяженные последовательности всех сегментов (табл. 2). Для построения дендрограмм полученные последовательности были дополнены представителями вируса Пуумала, принадлежащими к генетической линии RUS. Представители других линий были взяты в качестве внешней группы. Филогенетические деревья были построены на основании выравниваний S-сегмента (рисунок а), M-сегмента (рисунок б) и L-сегмента (рисунок в). Для каждой последовательности указан регион изоляции и принадлежность к генетической линии.

Филогенетические деревья демонстрируют, что генетические варианты из Волоколамского района по всем трем сегментам группируются с последовательностями из Курской области, представленными ранее как сублиния W-RUS [13].

Нуклеотидные различия между последовательностями из Волоколамского района составляют менее 4% для каждого из сегментов. А их различие с генетическими вариантами из Курской области составило менее 10%. В таблице 3 указаны генетические дистанции между полученными в этом исследовании последовательностями и генетическими вариантами

Таблица 1. Результаты отлова грызунов и исследования образцов на наличие РНК хантавирусов

Table 1. Results of trapping of rodents and researching samples for the presence of hantaviral RNA

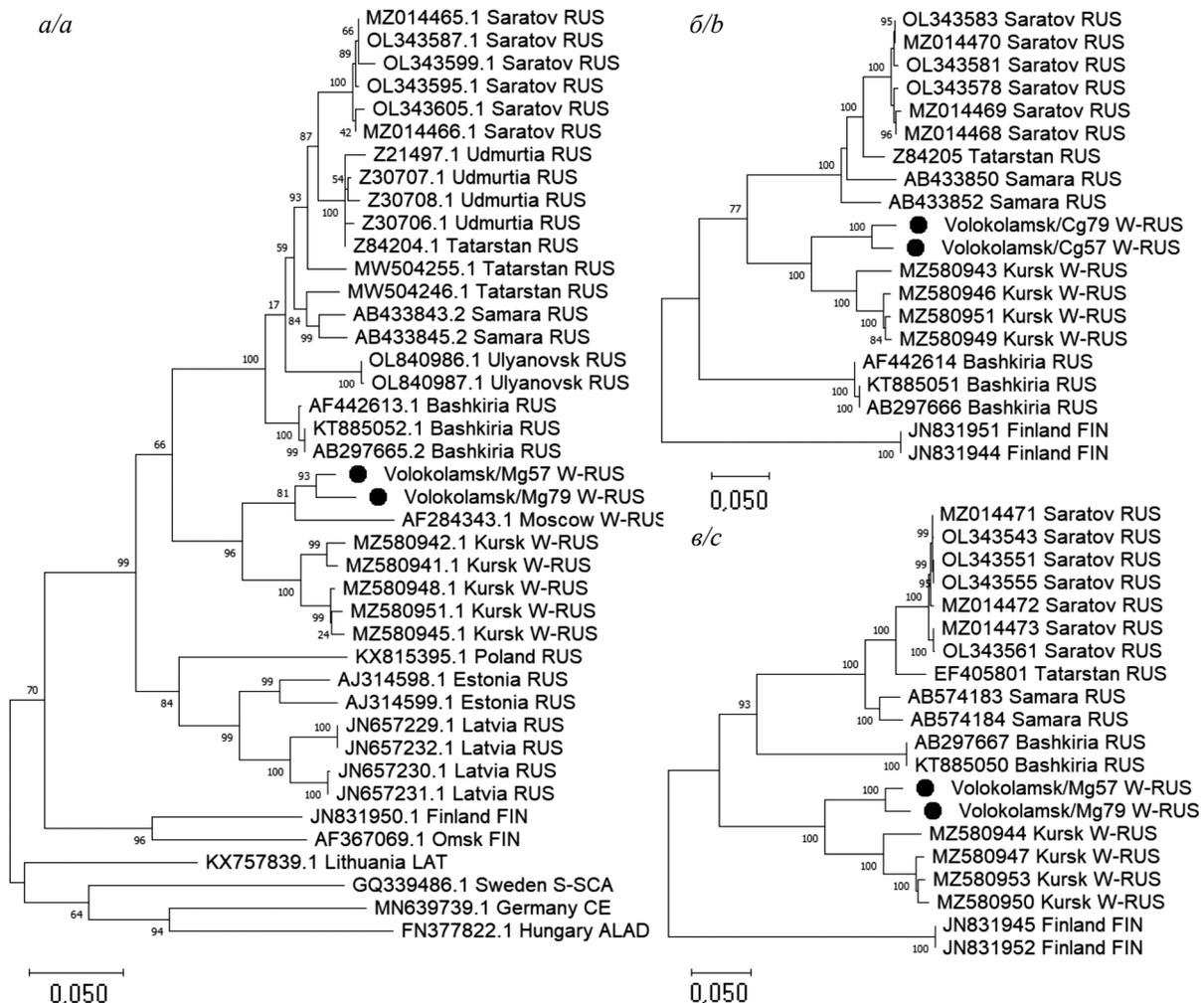
Локация Location	Биотоп Biotope	Ловушко- суток Trap-days	Количество ПЦР-положительных особей/пойманных особей PCR-positive specimens/Trapped specimens						
			всего all	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Microtus oconomus</i>	<i>Microtus</i> sp.	<i>Apodemus flavicollis</i>	<i>Apodemus uralensis</i>	<i>Apodemus agrarius</i>
Новопавловское Novopavlovskoe	Смешанный лес Mixed forest	290	3/68	3/59	0/1	–	0/6	0/2	–
Суворово Suvorovo	Смешанный лес Mixed forest	200	2/21	2/16	–	–	0/2	0/2	0/1
Алферьево Alferevo	Луг, кустарники Meadow, shrubs	250	1/20	1/7	–	0/2	0/1	0/6	0/4
Всего All		740	6/109	6/82	0/1	0/2	0/9	0/10	0/5

Примечание. «←» – отсутствовали в отловах.

Note. «←» – were absent in the trapping.

Таблица 2. Данные о результатах секвенирования вируса Пуумала  
Table 2. Data on the Puumala virus sequencing results

Зоологический номер ID	Место изоляции Isolation point	Название изолята Isolate name	Сегмент Segment	Длина, п.н. Length, bp	GenBank ID
45	Новопавловское Novopavlovskoye	Volokolamsk/Mg45	L	347	OQ503846
57	Новопавловское Novopavlovskoye	Volokolamsk/Mg57	L	5972	OQ606916
			M	3058	OQ606917
			S	1779	OQ606918
59	Новопавловское Novopavlovskoye	Volokolamsk/Mg59	L	347	OQ503847
			Суворово Suvorgovo	Volokolamsk/Mg79	L
79	Суворово Suvorgovo	Volokolamsk/Mg79	M	3543	OQ606920
			S	1763	OQ606921
			L	347	OQ503849
123	Алферьево Alferevo	Volokolamsk/Mg123	L	347	OQ503850



**Рисунок.** Филогенетические деревья, построенные на основании выравниваний: *a* – 1302 нуклеотидов S-сегмента, соответствующие полной рамке считывания белка нуклеокапсида; *b* – 3050 нуклеотидов M-сегмента (частичная открытая рамка считывания, OPC); *c* – 5960 нуклеотидов L-сегмента (частичная OPC). Последовательности, полученные в этом исследовании, выделены маркером. Конструирования филогенетических деревьев проводили методом Maximum Likelihood с применением модели General Time Reversible (G+I) с помощью программы MEGA X [29].

**Figure.** Phylogenetic trees constructed on the basis of alignments: *a* – 1302 nucleotides of the S segment corresponding to the complete reading frame of the nucleocapsid protein; *b* – 3050 nucleotides of the M segment (partial open reading frame, ORF); *c* – 5960 nucleotides of the L segment (partial ORF). The sequences obtained in this study are marked. Phylogenetic trees were constructed using the Maximum Likelihood method using the General Time Reversible (G+I) model using the MEGA X program [29].

**Таблица 3. Генетическая дистанция между нуклеотидными/аминокислотными последовательностями из Волоколамского района и последовательностями из других локаций (%)****Table 3. P-distance between nucleotide/amino acid sequences from Volokolamsk region and sequences from other locations (%)**

Параметр	Волоколамский район Volokolamsk region		
	S-сегмент, 1302 п.н. S segment, 1302 bp	M-сегмент, 3050 п.н. M segment, 3050 bp	L-сегмент, 5960 п.н. L segment, 5960 bp
Волоколамский район Volokolamsk region	3,31 0,69	3,49 1,19	3,26 0,45
Курская область Kursk region	8,3–9,38 1,15–1,62	9,04–9,54 1,28–1,58	9,47–9,66 1,41–1,61
Другие представители генетической линии RUS Other RUS lineage representatives	10,91–13,91 1,62–3,93	12,69–13,94 1,87–3,46	13,01–14,14 1,06–1,56

**Примечание.** Расчет осуществляли по полной ОРС для S-сегмента и по частичным ОРС для M- и L-сегментов.

**Note.** The calculation was performed according to the complete ORF for the S segment, and partial ORF for the M and L segments.

вируса Пуумала из других локаций. Изолят AF284343 не был включен в расчет из-за недостаточной длины.

### Обсуждение

Согласно статистическим данным Роспотребнадзора, на территории ЦФО ежегодно наблюдается заболеваемость ГЛПС. Наибольшее количество случаев регистрируется в Ярославской, Рязанской, Костромской, а также Тульской областях. Большая часть случаев приходится на вирус Пуумала, еще 3–5% – на вирус Добрава-Белград [19]. Несмотря на это, генетические варианты, циркулирующие на территории ЦФО, крайне мало изучены: помимо последовательностей из Курской области, полученных в нашей предыдущей работе [13], на момент работы над статьей в базе данных GenBank имелось лишь две последовательности: AF284343 [30] и EU652421 [31].

Последовательность AF284343 была получена от рыжей полевки, отловленной на территории Егорьевского района Московской области во время вспышки ГЛПС-Пуумала в 1995 г. В соответствующей публикации изолят описан как новый генотип вируса Пуумала [30]. Это фрагмент S-сегмента длиной около 700 нуклеотидов, на дендрограмме (рисунок а) он кластеризуется с последовательностями из Курской области и Волоколамского района. Таким образом, по всей видимости, этот изолят также может быть отнесен к сублинии W-RUS.

EU652421 – это короткий (менее 300 нуклеотидов) фрагмент M-сегмента вирусной РНК, которая была выделена от рыжей полевки на территории Липецкой области. Его длина недостаточна для построения дендрограммы с надежной поддержкой, в связи с чем невозможно определить его принадлежность к сублинии W-RUS.

В настоящем исследовании была подтверждена циркуляция вируса Пуумала на территории Московской области [30]. Новые последовательности из Волоколамска кластеризуются с генетическими вариантами из Курской области, обозначенными ранее как ветвь W-RUS [30], по каждому из трех сегментов генома, что демонстрирует их принадлежность к этой же ветви и подтверждается тем, что генетические различия

между последовательностями из Волоколамского района и Курской области меньше, чем таковые между последовательностями из Волоколамского района и другими представителями линии RUS (табл. 3).

Работы, посвященные систематизации разнообразия вируса Пуумала, базировались именно на последовательностях S-сегмента [11], по-видимому, из-за большей представленности в GenBank, а также из-за большей консервативности.

В статье T. Sironen и соавт. (2001) [12] упоминается, что генетическая линия RUS состоит из двух сублиний, сформированных штаммами из Прибалтики и Европейской части России. В настоящем исследовании на филогенетическом дереве по S-сегменту генетическая линия RUS разделяется на три монофилетические группы. Третья ветвь, W-RUS, была описана в нашем предыдущем исследовании и дополнена в настоящей работе последовательностями из Волоколамского района.

Вариабельность внутри генетической линии RUS велика по сравнению с другими генетическими линиями [8]. В недавней работе были описаны систематизация и разделение наиболее представленной в GenBank части генетической линии RUS, относящейся к ПФО, на несколько сублиний [15]. Ветвь W-RUS является внешней группой по отношению ко всем описанным кладам вируса в ПФО, согласно филогенетическому исследованию, основанному на S- и L-сегментах (рисунок а, в).

Интересно, что топология ветвей в дендрограмме по M-сегменту значительно отличается от таковых по S- и L-сегментам. Это характерно для разных видов хантавирусов и обусловлено тем, что M-сегмент генома является наиболее вариабельным и наиболее часто участвует в реассортации [8, 9, 32, 33]. Это подтверждает вывод предыдущего исследования [13] о том, что обмен M-сегментами происходил и в эволюционной истории линии RUS.

Таким образом, представители ветви W-RUS были обнаружены в двух регионах: Курской и Московской областях. На основании этого можно предположить, что они также распространены на прилегающих территориях: в Орловской, Брянской, Калужской и Туль-

ской областях. Для получения полной картины генетического разнообразия вируса Пуумала, циркулирующего на территории Европейской части России, необходимы дополнительные исследования с расширением не только географии работ, но и объемов выборки полевого и клинического материала для оценки всего генетического пейзажа вируса Пуумала, встречающегося на данной территории.

### Заключение

На территории Волоколамского района Московской области в грызунах обнаружена РНК вируса Пуумала сублинии W-RUS.

### ЛИТЕРАТУРА

- Бернштейн А.Д., Гавриловская И.Н., Апекина Н.С., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Особенности природной очаговости хантавирусных зоонозов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (2): 5–13. <https://elibrary.ru/micwyl>
- Kuhn J.H., Schmaljohn C.S. A brief history of bunyaviral family hantaviridae. *Diseases*. 2023; 11(1): 38. <https://doi.org/10.3390/diseases11010038>
- Lee G.Y., Kim W.K., Park K., Lee S.H., Hwang J., No J.S., et al. Phylogeographic diversity and hybrid zone of Hantaan orthohantavirus collected in Gangwon Province, Republic of Korea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(10): e0008714. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008714>
- Vetter P., L'Huillier A.G., Montalbano M.F., Pigny F., Eckerle I., Torriani G., et al. Puumala virus infection in family, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(2): 658–60. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203770>
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
- Szabó R., Radosa L., Ličková M., Sláviková M., Heroldová M., Stanko M., et al. Phylogenetic analysis of Puumala virus strains from Central Europe highlights the need for a full-genome perspective on hantavirus evolution. *Virus Genes*. 2017; 53(6): 913–7. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1484-5>
- Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
- Kabwe E., Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Garanina E., Martynova E., Kitaeva K., et al. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens. *Pathogens*. 2020; 9(9): 775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
- Klempa B. Reassortment events in the evolution of hantaviruses. *Virus Genes*. 2018; 54(5): 638–46. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1590-z>
- Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses*. 2019; 11(8): 679. <https://doi.org/10.3390/v11080679>
- Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morozov V., Nikitin P., Khasanova S., et al. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3(4): 245–57. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00088-1)
- Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. Molecular evolution of Puumala hantavirus. *J. Virol.* 2001; 75(23): 11803–10. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11803-11810.2001>
- Blinova E., Deviatkin A., Kurashova S., Balovneva M., Volgina I., Valdokhina A., et al. A fatal case of haemorrhagic fever with renal syndrome in Kursk Region, Russia, caused by a novel Puumala virus clade. *Infect. Genet. Evol.* 2022; 102: 105295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105295>
- Яшина Л.Н., Трегубчик Т.В., Малышев Б.С., Сметанникова Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А. и др. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (4): 150–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-150-156> <https://elibrary.ru/dxxsey>
- Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F., Ismagilova R.K., Martynova E.V., Ohlopko O.V., et al. Analysis of Puumala orthohantavirus genome variants identified in the territories of Volga federal district. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022; 7(3): 46. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7030046>
- Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Kabwe E., Ismagilova R., Martynova E., Belyaev A., et al. Prevalence of the Puumala orthohantavirus strains in the Pre-Kama area of the Republic of Tatarstan, Russia. *Pathogens*. 2020; 9(7): 540. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070540>
- Davidyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Knyazeva A.V., Martynova E.V., Ismagilova R.K., et al. The Distribution of Puumala orthohantavirus genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan. *Pathogens*. 2021; 10(9): 1169. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091169>
- Martynova E., Davidyuk Y., Kabwe E., Garanina E.E., Shakirova V., Pavelkina V., et al. Cytokine, chemokine, and metalloprotease activation in the serum of patients with nephropathia epidemic from the Republic of Tatarstan and the Republic of Mordovia, Russia. *Pathogens*. 2021; 10(5): 527. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050527>
- Савицкая Т.А., Иванова А.В., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Трифонов В.А., Зиятдинов В.Б. и др. Оценка эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом, прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 62–70. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-62-70> <https://elibrary.ru/oqmbzo>
- Щипанов Н.А. Универсальная живоловка для мелких млекопитающих. *Зоологический журнал*. 1987; 66(5): 759–61.
- Mills J., Childs J., Ksiazek T., Peters C., Velleca W. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing; 1995. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11507>
- Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5): 838–40. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*. 2011; 17(1): 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. 2012; 9(4): 357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Wilm A., Aw P.P., Bertrand D., Yeo G.H., Ong S.H., Wong C.H., et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(22): 11189–201. <https://doi.org/10.1093/nar/gks918>
- Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021; 10(2): giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Van der Auwera G.A., O'Connor B.D. *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra*. O'Reilly Media; 2020.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Иванов А.П., Деконенко А.Е., Дзагурова Т.К., Малкин А.Е., Шерварли И.В., Барановский П.М. и др. Анализ вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Егорьевском районе Московской области. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(4): 33–6.
- Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
- Razzauti M., Plyusnina A., Niemimaa J., Henttonen H., Plyusnin A. Co-circulation of two Puumala hantavirus lineages

- in Latvia: a Russian lineage described previously and a novel Latvian lineage. *J. Med. Virol.* 2012; 84(2): 314–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.22263>
33. Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Suleimanova S., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Shakirova V.G., et al. Puumala orthohantavirus reassortant genome variants likely emerging in the watershed forests. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1018. <https://doi.org/10.3390/ijms24021018>
- ### REFERENCES
1. Bernshteyn A.D., Gavrillovskaya I.N., Apekina N.S., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Features of the natural focality of hantavirus zoonoses. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2010; (2): 5–13. <https://www.elibrary.ru/micwyl> (in Russian)
  2. Kuhn J.H., Schmaljohn C.S. A brief history of bunyaviral family hantaviridae. *Diseases.* 2023; 11(1): 38. <https://doi.org/10.3390/diseases11010038>
  3. Lee G.Y., Kim W.K., Park K., Lee S.H., Hwang J., No J.S., et al. Phylogeographic diversity and hybrid zone of Hantaan orthohantavirus collected in Gangwon Province, Republic of Korea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(10): e0008714. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008714>
  4. Vetter P., L'Huillier A.G., Montalbano M.F., Pigny F., Eckerle I., Torriani G., et al. Puumala virus infection in family, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(2): 658–60. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203770>
  5. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshteyn A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
  6. Szabó R., Radosa L., Ličková M., Sláviková M., Heroldová M., Stanko M., et al. Phylogenetic analysis of Puumala virus strains from Central Europe highlights the need for a full-genome perspective on hantavirus evolution. *Virus Genes.* 2017; 53(6): 913–7. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1484-5>
  7. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
  8. Kabwe E., Davidiyuk Y., Shamsutdinov A., Garanina E., Martynova E., Kitaeva K., et al. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens. *Pathogens.* 2020; 9(9): 775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
  9. Klempa B. Reassortment events in the evolution of hantaviruses. *Virus Genes.* 2018; 54(5): 638–46. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1590-z>
  10. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses.* 2019; 11(8): 679. <https://doi.org/10.3390/v11080679>
  11. Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morozov V., Nikitin P., Khananova S., et al. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infect. Genet. Evol.* 2003; 3(4): 245–57. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00088-1)
  12. Sironen T., Vaheri A., Plyusnin A. Molecular evolution of Puumala hantavirus. *J. Virol.* 2001; 75(23): 11803–10. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11803-11810.2001>
  13. Blinova E., Deviatkin A., Kurashova S., Balovneva M., Volgina I., Valdokhina A., et al. A fatal case of haemorrhagic fever with renal syndrome in Kursk Region, Russia, caused by a novel Puumala virus clade. *Infect. Genet. Evol.* 2022; 102: 105295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105295>
  14. Yashina L.N., Tregubchak T.V., Malyshev B.S., Smetannikova N.A., Grishchenko I.V., Dol'skiy A.A., et al. Study of the exosomal microrna-126 and microrna-218 expression profiles in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (hfrs). *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2021; (4): 150–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-150-156> <https://elibrary.ru/dxxsey> (in Russian)
  15. Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F., Ismagilova R.K., Martynova E.V., Ohlopokova O.V., et al. Analysis of Puumala orthohantavirus genome variants identified in the territories of Volga federal district. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022; 7(3): 46. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7030046>
  16. Davidiyuk Y., Shamsutdinov A., Kabwe E., Ismagilova R., Martynova E., Belyaev A., et al. Prevalence of the Puumala orthohantavirus strains in the Pre-Kama area of the Republic of Tatarstan, Russia. *Pathogens.* 2020; 9(7): 540. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070540>
  17. Davidiyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Knyazeva A.V., Martynova E.V., Ismagilova R.K., et al. The Distribution of Puumala orthohantavirus genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan. *Pathogens.* 2021; 10(9): 1169. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091169>
  18. Martynova E., Davidiyuk Y., Kabwe E., Garanina E.E., Shakirova V., Pavelkina V., et al. Cytokine, chemokine, and metalloprotease activation in the serum of patients with nephropathia epidemica from the Republic of Tatarstan and the Republic of Mordovia, Russia. *Pathogens.* 2021; 10(5): 527. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050527>
  19. Savitskaya T.A., Ivanova A.V., Isaeva G.Sh., Reshetnikova I.D., Trifonov V.A., Ziatdinov V.B., et al. Assessment of epidemiological situation on hemorrhagic fever with renal syndrome around the world and in Russia, forecast for 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2020; (2): 62–70. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-62-70> <https://elibrary.ru/oqmbzo> (in Russian)
  20. Shchipanov N.A. Universal live-trap for small mammals. *Zoologicheskii zhurnal.* 1987; 66(5): 759–61. (in Russian)
  21. Mills J., Childs J., Ksiazek T., Peters C., Velleca W. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing; 1995. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11507>
  22. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5): 838–40. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
  23. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
  24. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal.* 2011; 17(1): 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
  25. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 2012; 9(4): 357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
  26. Wilm A., Aw P.P., Bertrand D., Yeo G.H., Ong S.H., Wong C.H., et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(22): 11189–201. <https://doi.org/10.1093/nar/gks918>
  27. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience.* 2021; 10(2): giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
  28. Van der Auwera G.A., O'Connor B.D. *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra.* O'Reilly Media; 2020.
  29. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
  30. Ivanov A.P., Dekonenko A.E., Dzagurova T.K., Malkin A.E., Shervarli I.V., Baranovskiy P.M., et al. Analysis of an outbreak of hemorrhagic fever with the renal syndrome in the Egoryevsk district of the Moscow region. *Voprosy virusologii.* 2000; 45(4): 33–6. (in Russian)
  31. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., et al. Genetic diversity and geographic distribution of hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56(6-7): 297–309. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x>
  32. Razzauti M., Plyusnina A., Niemimaa J., Henttonen H., Plyusnin A. Co-circulation of two Puumala hantavirus lineages in Latvia: a Russian lineage described previously and a novel Latvian lineage. *J. Med. Virol.* 2012; 84(2): 314–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.22263>
  33. Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Suleimanova S., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Shakirova V.G., et al. Puumala orthohantavirus reassortant genome variants likely emerging in the watershed forests. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1018. <https://doi.org/10.3390/ijms24021018>