

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»  
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И  
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

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

*На правах рукописи*

БЛИНОВА

Екатерина Алексеевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА –  
ОСНОВНОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С  
ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук  
Дзагурова Тамара Казбековна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1 Хантавирусы и хантавирусные лихорадки.....	12
1.2 Ареал возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом ..	19
1.3 Геном и молекулярные основы изменчивости хантавирусов .....	23
1.3.1 Строение вириона хантавирусов .....	23
1.3.2. Жизненный цикл хантавирусов.....	26
1.3.3 Взаимоотношения хантавирусов и их резервуарных хозяев .....	27
1.3.4 Реассортация и рекомбинация хантавирусов.....	34
1.3.5. Генетическое разнообразие хантавируса Пуумала .....	36
1.3.6 Распространение хантавируса Пуумала на территории России .....	41
Глава 2. Материалы и методы.....	44
2.1 Материалы .....	44
2.2 Иммунологические исследования .....	45
2.3 Экстракция вирусной РНК.....	45
2.4 Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени с флуоресцентной детекцией .....	46
2.5 Амплификация и секвенирование .....	48
2.5.1. Амплификация протяженных последовательностей .....	48
2.5.2 Амплификация участка L сегмента родоспецифичными праймерами ....	52
2.5.3 Электрофорез в агарозном геле .....	53
2.5.4. Секвенирование.....	53
2.6 Обработка первичных данных секвенирования .....	54
2.7 Анализ нуклеотидных последовательностей .....	55
2.8 Анализ географического происхождения последовательностей .....	56
2.9 Статистическая обработка результатов метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции .....	57

Глава 3. Результаты и обсуждение .....	58
3.1 Расследование летального случая геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Курской области.....	58
3.2 Секвенирование нуклеотидных последовательностей .....	61
3.3. Разработка методики выявления хантавируса Пуумала методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени ..	65
3.3.1. Анализ разработанной методики .....	65
3.3.2. Диагностические характеристики новой методики .....	66
3.3.3. Аналитические характеристики новой методики.....	74
3.4. Анализ полученных последовательностей.....	78
3.4.1 Филогенетический анализ.....	78
3.4.2 Анализ вариабельности нуклеотидных и аминокислотных последовательностей хантавируса Пуумала.....	83
3.4.3 Географическое распространение представителей новых сублиний .....	86
3.5 Генетическая линия RUS.....	89
3.5.1 Сублиния W-RUS.....	90
3.5.2 Сублиния Volga-RUS.....	96
3.5.3 Сигналы реассортации в пределах линии RUS.....	97
3.6. Генетическая линия FIN .....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	106
ВЫВОДЫ .....	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	109
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Представители рода *Orthohantavirus* к настоящему времени обнаружены на всех континентах, кроме Антарктиды, и являются одними из важнейших вирусных зоонозов. Большинство видов хантавирусов связаны с одним, реже несколькими, видами мелких млекопитающих, в популяциях которых они циркулируют в виде бессимптомной инфекции. Данные о патогенности для человека известны только для хантавирусов, природными резервуарами которых являются грызуны [1,2]. У человека такие хантавирусы могут вызывать геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) – хантавирусы Старого Света, либо хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) – хантавирусы Нового Света [3].

На территории России обнаружены шесть патогенных для человека хантавирусов - возбудителей ГЛПС: Пуумала, Хантаан, Амур, Сеул, Куркино и Сочи.

Наиболее распространенным является хантавирус Пуумала, на долю которого приходится около 98% от числа всех случаев заболевания людей ГЛПС в России [4,5]. Клинический анализ случаев заболевания ГЛПС, вызываемой хантавирусом Пуумала (ГЛПС-Пуумала) на территории наиболее активных природных очагов России показал, что по тяжести заболевания примерно 25% случаев протекают в тяжелой клинической форме, 50% – в среднетяжёлой и 25% - в легкой форме [6]. При этом, численность летальных исходов при тяжёлом течении болезни составляет около 1%. Резервуарным хозяином хантавируса Пуумала является рыжая полевка *Myodes glareolus* [7,8], в результате чего наиболее эпидемиологически активные природные очаги ГЛПС, вызываемой этим хантавирусом, определены ареалом рыжей полевки, обитающей, в основном, в широколиственных и хвойно-широколиственных смешанных лесах на Урале и Среднем Поволжье [4,9,10]. Следует отметить, что абсолютное большинство изолированных в России к настоящему времени генетических вариантов хантавируса Пуумала относятся к территории Приволжского федерального округа

[11–16]. В то же время, в регионах с относительно низкой заболеваемостью ГЛПС имеются лишь единичные данные о нуклеотидных последовательностях вируса Пуумала.

Таким образом, с учётом имеющихся в литературе данных, необходимо получить более исчерпывающие сведения о возможном существовании на территории Российской Федерации ранее неизвестных генетических вариантов хантавируса Пуумала.

Получение таких данных представляет научный интерес относительно эволюции и распространения генетических вариантов хантавируса Пуумала, расширяющих возможности усовершенствования известных и создания новых препаратов для специфической диагностики ГЛПС методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), что и обуславливает актуальность данной диссертационной работы.

#### Степень разработанности темы исследования

Хантавирус Пуумала впервые был выделен в 1980 году от рыжей полевки, отловленной в окрестностях Финского озера Пуумала [17].

Его вирионы содержат три сегмента рибонуклеиновой кислоты (РНК) отрицательной полярности. Опубликованные в 2001 году данные по генетической систематизации хантавируса Пуумала [18], свидетельствовали о существовании семи генетических линий этого вируса. Разделение генетических линий проводилось на основании дендрограмм, построенных на основании нуклеотидных последовательностей S сегмента, кодирующего белок нуклеокапсида. В 2012 была описана еще одна генетическая линия, обнаруженная на территории Латвии [19].

Таким образом, современное разнообразие вируса Пуумала описывают как восемь генетических линий: Центрально-европейская (CE), Альпийско-Адриатическая (ALAD), Датская (DAN), Южно-Скандинавская (S-SCAN), Северо-Скандинавская (N-SCAN), Финская (FIN), Русская (RUS) и Латвийская (LAT) [20].

В работе Кастеля в 2019 году были высказаны предположения, относительно распространения генетических линий во время схождения ледника около 18 000 лет назад [21]. Согласно этой гипотезе, хантавирус Пуумала находился в трех рефугиях, из которых пошло дальнейшее распространение вируса по территории Европы. Различные биоинформатические методы дали некоторые расхождения, однако все они показали, что линии RUS, FIN и LAT имеют общее происхождение и распространились из одного рефугия.

К началу нашей диссертационной работы на территории России были известны две генетические линии: RUS и FIN.

Линия RUS была выявлена на территории Приволжского федерального округа, где располагаются основные очаги заболеваемости ГЛПС-Пуумала: в Республике Башкортостан [22], Республике Татарстан [23,24], Удмуртской Республике [25], Самарской области [26]. Еще несколько представителей линии RUS были обнаружены за пределами России в странах Балтии и в Польше. Для них известны лишь S сегментные последовательности.

Финская линия была обнаружена в Карелии (три изолята с известными последовательностями S сегмента [27]), и несколько изолятов из Омска, с известными последовательностями S и M сегментов [22]. Также имелись данные о циркуляции Финской ветви в Тюменской области на основании неполных S сегментных последовательностей [28].

Отсутствие системных исследований генетического разнообразия хантавируса Пуумала на территориях России, не относящихся к Приволжскому федеральному округу, предопределили цель и задачи настоящей работы.

### Цель исследования

Исследование генетических вариантов хантавируса Пуумала на территории Российской Федерации и разработка кандидатной тест-системы для дифференциальной диагностики данного возбудителя.

### Задачи исследования

1. Разработать методику пробоподготовки образцов для секвенирования кодирующих последовательностей всех сегментов хантавируса Пуумала из минимального количества исходного биоматериала.
2. Секвенировать геноизоляты хантавируса Пуумала от рыжих полевок, отловленных в различных природных очагах ГЛПС, а также из аутопсийных материалов погибшего от ГЛПС больного.
3. Разработать кандидатную тест-систему для дифференциальной диагностики хантавируса Пуумала.
4. Провести филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей хантавируса Пуумала.

### Научная новизна

Установлена циркуляция на территории Курской, Ивановской, Московской областей генетических вариантов вируса Пуумала, кластеризующихся в виде отдельной сублинии W-RUS в составе генетической линии RUS. Обнаружение представителей этой клады позволило также выявить события реассортации с участием предков штаммов хантавируса Пуумала, циркулирующих на территории Приволжского федерального округа.

Впервые выявлена циркуляция Финской генетической линии хантавируса Пуумала в Архангельской области, а также впервые получены более 90% кодирующих последовательностей всех сегментов для представителей Финской линии на территориях Тюменской и Архангельской областей.

Впервые показано, что популяция генетических вариантов хантавируса Пуумала в Саратовской области (Саратовский район) была занесена из Удмуртской Республики.

### Теоретическая и практическая значимость работы

В результате диссертационной работы выявлены новые ранее неизвестные генетические варианты хантавируса Пуумала, что расширило наши познания о генетическом разнообразии хантавируса Пуумала и представление о процессах его эволюции на территории России.

Результаты генетических исследований ранее известных и новых генетических вариантов хантавируса Пуумала явились основой для разработки кандидатной тест-системы для дифференциальной диагностики ГЛПС, вызванной хантавирусом Пуумала методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

### Методология и методы исследования

Для выполнения исследований и решения поставленных задач были использованы иммунологические и молекулярно-биологические методы лабораторных исследований, отражающие новизну научных подходов в изучаемой области. Планирование экспериментов и организация исследовательской деятельности осуществлялись на основании анализа отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования.

### Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны олигонуклеотиды для выявления РНК хантавируса Пуумала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентной детекцией, чувствительные к ранее известным и обнаруженным нами на территории Российской Федерации генетическим вариантам хантавируса Пуумала.

2. На территории Курской, Ивановской и Московской областей обнаружены ранее неизвестные генетические варианты хантавируса Пуумала, образующие отдельную кладу, относящуюся к генетической линии RUS вируса Пуумала, названную нами как сублиния W-RUS.

3. Обнаружены ранее неизвестные события реассортации в эволюционной истории генетической линии RUS хантавируса Пуумала.



4. На территории Архангельской области обнаружены генетические варианты хантавируса Пуумала сублинии East-FIN, ранее выявленной на территории Азиатской части России - в Омской и Тюменской областях.

#### Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных молекулярно-биологических методов, программного обеспечения и статистической обработкой полученных результатов.

Все выводы и практические рекомендации диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Материалы исследования были представлены на следующих конференциях:

1. Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием, Москва (1–3 апреля 2019);
2. Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020, Москва (6-8 октября 2020);
3. X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов, Научград Кольцово (26-29 сентября 2023);
4. Конференция молодых ученых Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) «Проблемы эпидемиологии, терапии и лабораторной диагностики инфекционных заболеваний», Москва (17-18 мая 2023);
5. Научно-практическая конференция, посвященная 60-летию ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Эпидемиология и инфекционные болезни: связь времен и поколений», Москва (13 октября 2023);

6. Конференция молодых ученых и специалистов Федерального государственного автономного научного учреждения "Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита) (ФГАНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита)), Москва (23-24 ноября 2023);

7. X Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи (7-10 ноября 2023);

8. Научно-практический семинар «Трансмиссивные и природно-очаговые инфекции: диагностика и разбор клинических случаев» (3 апреля 2024).

#### Личное участие автора в получении результатов

Автором проведен анализ научной литературы по тематике диссертации, изучена степень разработанности проблемы, сформулированы цели и задачи исследования. Основные результаты исследования получены автором лично или при его непосредственном участии. Автор самостоятельно спроектировал дизайн праймеров, разработал протокол амплификации, подготовил материал к секвенированию, осуществил сборку первичных данных, построил дендрограммы, проанализировал полученные данные и сформулировал основные положения и выводы диссертации. Лично или с участием автора подготовлены основные публикации по материалам исследования.

#### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 8 «Проблемы экологии вирусов, их географического распространения, эпидемиологии и путей распространения вирусных инфекций, изучение путей передачи вирусов, их носительства, выявление естественных хозяев» и 10 «Разработка мер предупреждения,

диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии» паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

### Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 6 научных работ из них 3 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК), опубликованные научные работы индексируются в международных библиографических базах данных – Web of Science и/или Scopus.

### Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представлена на 138 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 18 таблицами. Список литературы включает 203 источника.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Хантавирусы и хантавирусные лихорадки

Открытию хантавирусов предшествовал длительный период поисков возбудителя инфекционного заболевания в виде острого нефрозо-нефрита с геморрагическими проявлениями. Первые письменные упоминания о заболевании с подобными симптомами встречались в Императорском Китае в период Сражающихся царств в 475–221 гг. до н.э. [2,29], а так же в более поздней китайской письменности в период около 900 лет назад [30].

Начиная с середины 1930 годов это заболевание было описано в Хабаровске [31] и других Дальневосточных регионах Советского Союза [32], а также в прилегающих регионах Северного Китая [33]. Позднее, под разными названиями, сходное по клинике заболевание регистрировали в Предуралье, Поволжье, на западе и северо-западе России, а также в Белоруссии, Молдавии и Украине [34].

Также были описаны заболевания схожей манифестации на территории Западной Европы: в Швеции [35], а также позднее, среди военнослужащих в Финляндии [36] и в Норвегии [37].

Крупная вспышка лихорадки с поражением почек во время Корейской войны, охватившая около 2,5 тысяч человек, впервые привлекла пристальное внимание мировой общественности. С 1951 г. по 1954 г. болезнь поразила военнослужащих из состава экспедиционного корпуса ООН, размещенного в демилитаризованной зоне Корейского полуострова. У трети заболевших были зафиксированы геморрагические проявления, а уровень смертности достигал 5-10% [32,38–40].

В результате систематизации имеющихся сведений о заболеваниях, фигурирующих под различными, в основном соответствовавшими месту регистрации, названиями (корейская геморрагическая лихорадка, лихорадка Сонго, скандинавская эпидемическая нефропатия, тульская лихорадка, ярославская геморрагическая лихорадка, эпидемическая геморрагическая лихорадка, острый нефрит, геморрагический нефрозо-нефрит и другие), эти болезни были объединены под общим названием «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом» [32].

Этот термин по-прежнему является официальным названием болезни в 11-й редакции Международной классификации болезней ВОЗ (МКБ-11) [2].

Вирус - возбудитель этой болезни был впервые выделен лишь в 1978 году в Южной Корее от полевой мыши *Apodemus agrarius coreae*, отловленной в пойме реки Хантаан [41]. Одноименный вирус дал название роду *Hantavirus*. Было показано, что вирус выделяется во внешнюю среду с мочой, слюной и фекалиями инфицированных грызунов. Среди лабораторных животных отмечено горизонтальное распространение вируса [42].

Позже хантавирусы были обнаружены на территории Американских континентов. В 1993 году в США впервые был описан так называемый кардиопульмональный синдром. Все случаи болезни начинались гриппо-подобными симптомами, однако быстро прогрессировали в более серьезное респираторное заболевание с двусторонним воспалением легких и приводили к смерти почти в 50% случаев [43,44]. Вскоре было установлено, что болезнь вызывается новым вирусом, впоследствии названным Син Номбре, циркулирующим в популяции оленьего хомячка *Peromyscus maniculatus* [45,46]. Вызываемое им заболевание получило название «Хантавирусный пульмональный синдром» (ХПС) [2]. Позже выяснилось, что история ХПС восходит как минимум к 1959 году, а вирусы, вызывающие ХПС, обнаружены на обоих Американских континентах, от крайнего севера до крайнего юга [47].

В связи со значительным увеличением известного разнообразия хантавирусов, в 2016 году роду *Hantavirus* был присвоен статус семейства *Hantaviridae*. Вирусы семейства *Hantaviridae* являются представителями порядка *Elliovirales* и на сентябрь 2024 года насчитывали 55 видов, зарегистрированных Международным комитетом по таксономии вирусов [48,49].

Семейство *Hantaviridae* делится на четыре подсемейства: *Actantavirinae*, *Agantavirinae*, *Repantavirinae* и *Mammantavirinae*, последнее из которых включает вирусы, переносимые млекопитающими. *Mammantavirinae* в свою очередь делится на четыре рода *Loanvirus*, *Mobatvirus*, *Thottimvirus*, а также *Orthohantavirus*,

включающий 37 видов хантавирусов, многие из которых являются патогенными для человека.

Хантавирусы распространены повсеместно и встречаются на всех континентах, кроме Антарктиды [1], при этом многие из них являются патогенными для человека. Следует упомянуть, что в Австралии антитела к хантавирусам обнаруживали у грызунов практически на всей территории, но сообщений об инфицировании людей не поступало [50].

Имеются многочисленные доказательства, что каждый вид хантавируса ассоциирован с одним или несколькими видами мелких млекопитающих, являющихся их природными резервуарами [1,51], для которых хантавирусная инфекция протекает бессимптомно и не влияет на их жизнедеятельность [1]. Таковыми являются преимущественно представители отрядов грызуны (*Rodentia*), насекомоядные (*Eulipotyphla*) [30] и летучие мыши из отряда рукокрылых (*Chiroptera*) [20]. Кроме того, есть данные об идентификации хантавирусов у рептилий и рыб [20]. Между тем, данные о патогенности известны лишь для хантавирусов, резервуарными хозяевами которых являются грызуны [2,30]. Хантавирусы могут заражать не только своих резервуарных хозяев, но и других млекопитающих. В частности, есть данные об обнаружении хантавирусных антигенов и/или антител у кошек, птиц, телят и других животных [52–56]. Однако для хантавируса это является эволюционным тупиком, т.к. инфекция не распространяется дальше [2,57,58]. Есть данные о том, что в некоторых случаях хантавирус может приспособиться к новому хозяину, что приводит к образованию нового вида хантавируса, циркулирующего в популяции другого носителя [2]. Однако, по-видимому, такие события чрезвычайно редки.

Заболеваемость ГЛПС наблюдается исключительно на территории, где распространен вид грызунов, являющийся резервуарным хозяином того или иного патогенного хантавируса [5]. Поскольку каждый патогенный вид хантавирусов имеет собственного резервуарного хозяина, эпидемиология ГЛПС тесно связана с их жизнедеятельностью. Заболеваемость тем больше, чем выше численность и

инфицированность популяции резервуарных хозяев патогенных хантавирусов, обитающих на той или иной территории. За период официальной регистрации ГЛПС в нашей стране (с 1978 г) прослеживается чередование подъема и снижения числа заболевших с трех-четырёхлетним интервалом [32]. Это связано с динамикой эпизоотического процесса, размера популяции грызунов, зависящей от урожая семян, составляющих их кормовую базу, и условий зимовки: обилия снежного покрова и температуры [32].

При инфицировании человека хантавирусы поражают эндотелиальные клетки, однако не вызывают их лизиса, но нарушают нормальное функционирование межклеточных контактов эндотелиальных клеток. Клинические проявления зависят от тропности хантавируса в основном к сосудам почек (ГЛПС) или легких (ХПС), но поражаются также и другие органы, имеющие богатую васкуляризацию (сосудистые сплетения головного мозга, гипофиз, оболочки глаза), что в тяжелых случаях приводит к полиорганному поражению и, как следствие, к летальным исходам. При этом повышение сосудистой проницаемости влечет за собой различные проявления, включающие воспалительные реакции различной степени тяжести: отек, гипоксию, серозно-геморрагическое пропитывание тканей органов. Различная интенсивность описанных реакций определяет степень тяжести болезни и ее исход [59].

Заражение человека происходит аэрогенным (воздушно-пылевым) путем, при вдыхании пылевых частиц, содержащих экскреты инфицированных животных (слюна, моча, фекалии), реже, алиментарным путем и через укусы грызунов [60]. При инфицировании человека, так же, как и других млекопитающих, не являющихся резервуарными хозяевами данного патогена, инфекция не передается дальше, и передача от человека к человеку не происходит, что значительно облегчает ведение пациентов. Исключением является хантавирус Андес: есть данные об алиментарном заражении этим хантавирусом [61], а в Патагонии и Аргентине были зафиксированы случаи ХПС, вызванные хантавирусом Андес, при которых регистрировали внутрибольничную передачу инфекции [62,63].

На сегодняшний день выделяют две значимые формы заболеваний, вызываемых хантавирусами: ГЛПС и ХПС [64]. В последние годы суммарная мировая заболеваемость ГЛПС и ХПС регистрируется на уровне около 200 тысяч случаев в год [65,66]. Хантавирусы - возбудители ГЛПС представлены в таблице 1 (адаптировано по Kuhn, J. H., 2023 [2]).

Таблица 1 - Возбудители ГЛПС и их природные резервуары

Хантавирус	Видовое название	Природный резервуар
Пуумала	<i>Orthohantavirus puumalaense</i>	<i>Myodes glareolus</i>
Куркино	<i>Orthohantavirus dobravaense</i>	<i>Apodemus agrarius</i>
Сочи	<i>Orthohantavirus dobravaense</i>	<i>Sylvaemus ponticus</i>
Саарема*	<i>Orthohantavirus dobravaense</i>	<i>Apodemus agrarius</i>
Добрава	<i>Orthohantavirus dobravaense</i>	<i>Sylvaemus flavicollis</i>
Хантаан	<i>Orthohantavirus hantanense</i>	<i>Apodemus agrarius coreae</i>
Амур	<i>Orthohantavirus hantanense</i>	<i>Apodemus peninsulae</i>
Сеул	<i>Orthohantavirus seoulense</i>	<i>Rattus norvegicus, Rattus rattus</i>

\* легкие случаи заболевания зарегистрированы на острове Саарема [67]

Имеются сведения о единичных случаях заболевания в Центральной Европе, ассоциированных с хантавирусом Тула (*Orthohantavirus tulaense*) [68], которые вместе с ГЛПС, вызываемой хантавирусом Саарема, не вносят значимый вклад в статистику заболеваемости ввиду низкой патогенности этих возбудителей.

В России основными возбудителями ГЛПС являются 6 видов хантавирусов. В дальневосточных регионах Российской Федерации ГЛПС вызывают хантавирусы: Сеул (*Orthohantavirus seoulense*), Хантаан и Амур (*Orthohantavirus hantanense*). На территории Европейской части России возбудителями ГЛПС являются хантавирусы: Пуумала (*Orthohantavirus puumalaense*), Куркино и Сочи (*Orthohantavirus dobravaense*) [4]. На рисунке 1 показано распределение заболеваемости ГЛПС (на 100 тысяч населения) по регионам России за период с 2000 по 2022 годы.



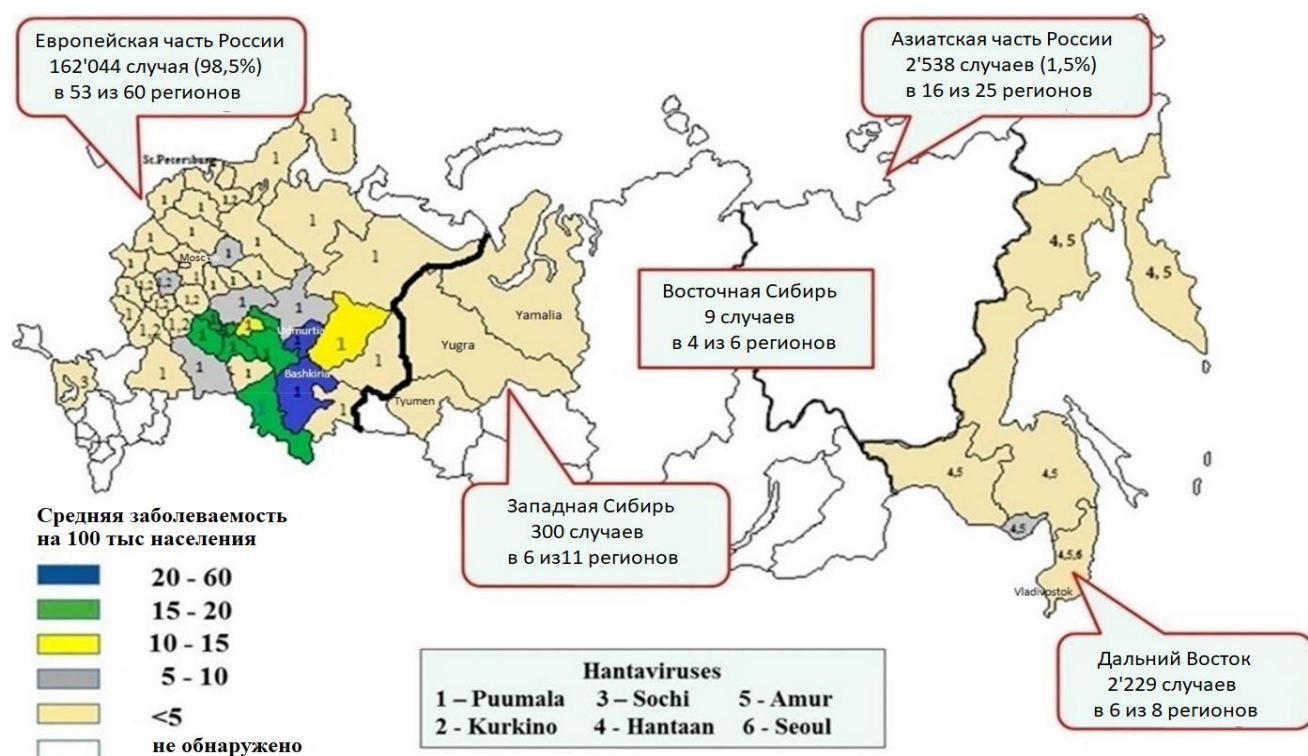


Рисунок 1 - Распределение заболеваемости ГЛПС (на 100 тысяч населения) по регионам России (адаптировано по Tkachenko E. и др., 2023 [5])

Ежегодная заболеваемость ГЛПС на территории Российской Федерации значительно варьирует, число случаев за последние 20 лет составляет от 4 600 до 14 027 (в среднем около 7 500) в год, смертность – около 30 случаев в год [4,5,16].

На Европейскую территорию России приходится 98,5% всех случаев заболеваемости ГЛПС из которых 97,7% вызвано хантавирусом Пуумала и 0,8% - хантавирусами Куркино и Сочи [5,69]. Основная часть заболеваемости ГЛПС сконцентрирована в наиболее активных очагах хантавируса Пуумала. В Приволжском федеральном округе, в котором регистрируется 82,2% от общей заболеваемости ГЛПС в России: с 2001 по 2019 гг. зарегистрировано в среднем 20,8 случаев на 100 тыс. населения. Наивысшие показатели заболеваемости ГЛПС приходятся на Удмуртскую Республику и Республику Башкортостан, где они превышают более 50 случаев на 100 тысяч населения. Республики Марий-Эл, Мордовия, Татарстан Чувашская Республика, и Саратовская область также относятся к неблагополучным по ГЛПС территориям [70].

В Центральном федеральном округе (ЦФО) заболеваемость ГЛПС с 2010 по 2019 годы составила 12,9% от заболеваемости по РФ. Среднее количество зарегистрированных больных ГЛПС в год составляло 987. Случаи заболевания ГЛПС регистрировали во всех административных субъектах ЦФО. Максимальное их количество приходилось на Ярославскую, Рязанскую, Костромскую, а также Тульскую области. По сравнению с предыдущим десятилетием заболеваемость ГЛПС выросла на 32%. Подавляющее большинство случаев были ассоциированы с хантавирусом Пуумала, оставшиеся 3-5% случаев - с хантавирусом Куркино [70].

В Северо-Западном и Уральском федеральных округах заболеваемость ГЛПС ассоциирована с хантавирусом Пуумала. В совокупности их вклад в общую заболеваемость по России составлял менее 3,5%. В Сибирском федеральном округе заболеваемость ГЛПС носит спорадический характер [4,16,71].

С 2000 по 2022 год в Российской Федерации было зарегистрировано 668 смертельных исходов у больных ГЛПС, включая 572 случая на европейской территории (0,4% заболевших ГЛПС на этой территории) и 89 случаев на Дальнем Востоке (4% заболевших) [5]. Таким образом, в дальневосточных регионах летальных исходов от ГЛПС в процентном соотношении регистрируется значительно больше, что обусловлено разным уровнем патогенности хантавирусов-возбудителей ГЛПС. Такая существенная разница возникает из-за разного уровня патогенности хантавирусов. В восточных регионах, где распространен высоко патогенный хантавирус Хантаан уровень летальности составляет около 7%. Для сравнения, в Краснодарском крае, где заболеваемость ГЛПС ассоциирована с хантавирусом Сочи, летальность от ГЛПС составляет 14%, однако при этом заболеваемость носит спорадический характер, число случаев невелико и не оказывает существенного влияния на уровень летальности от ГЛПС на европейской территории Российской Федерации.

## 1.2 Ареал возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом

В восточных регионах Российской Федерации заболеваемость ГЛПС регистрируется, в основном, среди жителей Приморского и Хабаровского краёв, Еврейской автономной и Амурской областей. На территориях этих административных субъектов циркулируют три патогенных хантавируса: Хантаан, Амур и Сеул.

Хантавирус Хантаан циркулирует на территории Азии, в ареале его природного резервуара - восточного подвида полевой мыши (*Apodemus agrarius*). Около 90% случаев заболевания ГЛПС, вызванного хантавирусом Хантаан (ГЛПС-Хантаан), зарегистрировано в Китае. Также этот хантавирус был выделен на территориях Северной и Южной Кореи, Дальнего Востока России [72]. Хантавирус Амур, близко родственный хантавирусу Хантаан, имеет другого резервуарного хозяина – восточноазиатскую мышь (*Apodemus peninsulae*), однако хантавирус Амур не выделен в отдельный вид, так как не соответствует критериям видовых отличий хантавирусов [73]. По всей видимости, хантавирус Амур и хантавирус Сучонг, выделенный в Южной Корее также от восточноазиатской мыши, представляют собой один геновариант хантавируса Хантаан, получивший разные названия [74,75]. Хантавирусы Хантаан и Амур являются одними из наиболее патогенных хантавирусов - возбудителей ГЛПС, уровень летальности которых среди больных ГЛПС составляет от 7 % до 12 % [4,30].

Хантавирус Сеул - единственный хантавирус, распространенный на территории почти всего мира. Поскольку его основным резервуарным хозяином является серая крыса (*Rattus norvegicus*), то заболеваемость ГЛПС, вызываемой вирусом Сеул (ГЛПС-Сеул), не ограничивается определенной областью или даже континентом, она обнаруживается на территории всего мира, очевидно, благодаря распространению крыс морским путем на кораблях. Тем не менее, основная заболеваемость ГЛПС-Сеул регистрируется в Азии (Южная Корея, Япония, Китай, Индонезия, Камбоджа, Сингапур, Вьетнам) [76]. Хантавирус Сеул вызывает легкие

и средне-тяжелые клинические формы ГЛПС, уровень летальности при которых составляет 1-2% [30,76].

На Европейской территории России циркулируют три патогенных для человека хантавируса: Пуумала, Куркино и Сочи. Заболеваемость ГЛПС среди людей регистрируется в 52 из 60 административных субъектов [4].

Хантавирусы Куркино и Сочи, вместе с хантавирусами Добрава и Саарема, являются генотипами хантавируса Добрава-Белград (*Orthohantavirus dobravaense*) [77]. Эти хантавирусы экологически ассоциированы с разными резервуарными хозяевами и могут вызывать у людей заболевание ГЛПС, значительно отличающееся по тяжести клинического течения [78]. Наиболее патогенным из трёх хантавирусов, циркулирующих на Европейской территории России, является хантавирус Сочи, природным носителем и резервуарным хозяином которого является кавказская лесная мышь *Sylvaemus ponticus*. Этот хантавирус циркулирует на территории Краснодарского края, где вызывает у людей спорадическую заболеваемость ГЛПС. Большинство клинических случаев заболевания ГЛПС классифицируются как тяжелые, с летальным исходом до 14-15% [79,80].

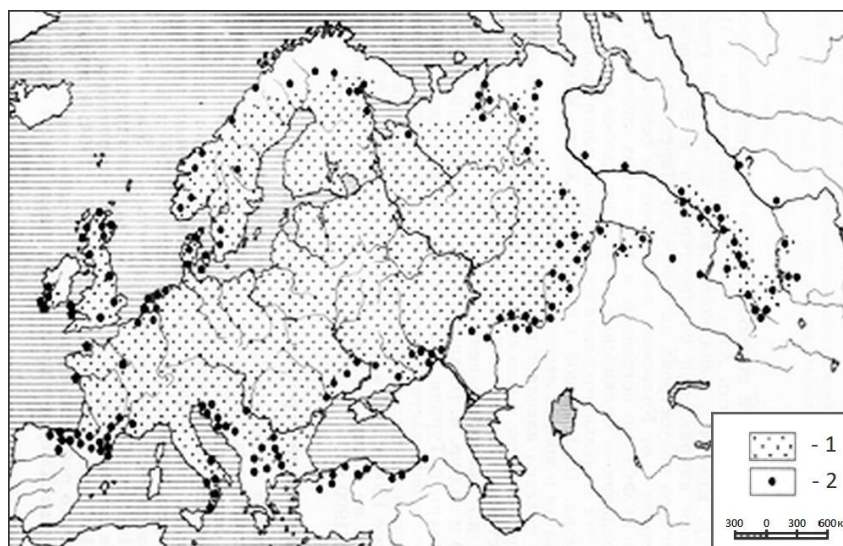
Хантавирус Добрава, резервуарным хозяином которого является желтогорлая мышь *Sylvaemus flavicollis*, распространен в странах южной Европы, вызывает тяжелые формы ГЛПС с летальным исходом от 5 до 15% [78,81–83].

Хантавирус Куркино [84,85] распространен на территории Центральной Европы и Европейской территории России [20]. Переносится западным подвидом полевой мыши *Apodemus agrarius*, характеризуется преобладанием легких и средне-тяжелых форм течения болезни и очень низким уровнем летальности [86]. Заболеваемость этим вирусом носит спорадический характер. Однако в 1991-92 гг. (130 случаев), 2001-2002 гг. (211 случаев) и 2006-2007 гг. (609 случаев) имели место зимние вспышки заболеваемости ГЛПС, вызванной хантавирусом Куркино, на территории 5 областей Центрального Черноземья, в сельской местности, связанные с активным размножением полевых мышей в стогах и придворовых постройках [87,88].

Хантавирус Саарема, как и хантавирус Куркино, переносится западным подвидом полевой мыши *Apodemus agrarius* и циркулирует на территории острова Саарема в Эстонии. Этот хантавирус вызывает преимущественно бессимптомные, реже очень легкие формы ГЛПС [30,59,77]. Имеются также данные о его обнаружении на территории Дании [67].

Таксономически обозначенный хантавирусный вид *Orthohantavirus puumalaense* включает в себя хантавирусы Пуумала, Муджу и Хоккайдо. Последний хантавирус, не являются патогенным для человека. Циркуляция хантавируса Хоккайдо впервые была обнаружена среди красно-серых полёвок *Myodes rufocanus* на территории Японии. В дальнейшем существование этого вируса было обнаружено на территориях Дальнего Востока России, Сахалина, Бурятии и Китая [89]. Хантавирус Муджу был выявлен у королевских полевок *Myodes regulus* на территории Южной Кореи [90]. Хантавирус Пуумала вызывает ГЛПС различной степени тяжести: примерно у четверти больных заболевание протекает в легкой форме, у половины больных – в среднетяжелой и еще у четверти – в тяжелой форме; летальность составляет 0,4 – 1% [6]. Тем не менее, на фоне низкой летальности часто возникают долгосрочные гормональные, почечные, сердечно-сосудистые и неврологические нарушения, а период полного восстановления длится год и более [6].

Хантавирус Пуумала распространен на территории Европы, а также обнаружен в Западной Сибири (Омская область). Его основным резервуарным хозяином является рыжая полевка *Clethrionomys glareolus*, ареал которой занимает почти всю территорию Европы, включая Британию и Ирландию и простирается с Западной Палеарктики до озера Байкал, на юге достигает Северной Италии, Северной Испании, Западной Турции и Северного Казахстана (Рисунок 2). Заболеваемость, вызываемая хантавирусом Пуумала, в той или иной степени регистрируется на всей территории ареала рыжей полевки [91].



Условные обозначения: 1 - зона распространения, 2 - отдельные местонахождения.

Рисунок 2 - Ареал рыжей полевки. (адаптировано по Бернштейн А. Д., 1983 [92])

Основу кормовой базы рыжей полевки составляют семена липы и желуди, поэтому она предпочитает липово-дубовые широколиственные леса [93]. Оптимум ареала рыжей полевки приходится на широколиственные и хвойно-широколиственные леса Приуралья и Среднего Поволжья, которые и являются наиболее активными очаговыми территориями ГЛПС.

Хантавирус Пуумала является основным объектом исследования диссертационной работы. Ниже приведено положение хантавируса Пуумала в классификации вирусов согласно данным Международного Комитета по Таксономии Вирусов:

Царство: *Orthornavirae*

Тип: *Negarnaviricota*

Подтип: *Polyploviricotina*

Класс: *Bunyaviricetes*

Порядок: *Elliovirales*

Семейство: *Hantaviridae*

Подсемейство: *Mammantavirinae*

Род: *Orthohantavirus*

Вид: *Orthohantavirus puumalaense*

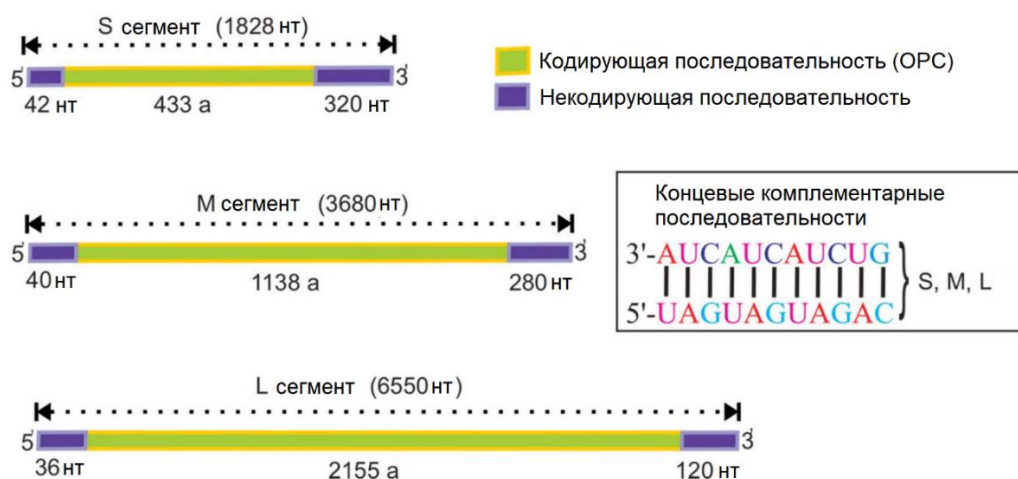
### 1.3 Геном и молекулярные основы изменчивости хантавирусов

#### 1.3.1 Строение вириона хантавирусов

Вирионы хантавирусов представляют собой сферические частицы, окруженные липопротеидной мембраной с диаметром от 120 до 154 нм, в среднем 135 нм [94,95], а в некоторых случаях и больше: например вирус Тула формирует вирионы до 160 нм в диаметре [96].

Вirusные частицы содержат трехчастный РНК геном отрицательной полярности: большой (L) сегмент имеет длину 6500-6600 нуклеотидов и кодирует РНК-зависимую-РНК-полимеразу; средний сегмент (М) длиной 3700-3800 нуклеотидов кодирует гликопротеин, который впоследствии процессируется на два белка Gn и Gc; малый сегмент (S) кодирует нуклеопротеин, формирующий оболочку непосредственно вокруг вирусной РНК, его длина варьирует от 1800 до 2100 нт [32,97].

На рисунке 3 представлена схема строения генома ортохантавирусов на примере штамма Puu/Kazan хантавируса Пуумала:

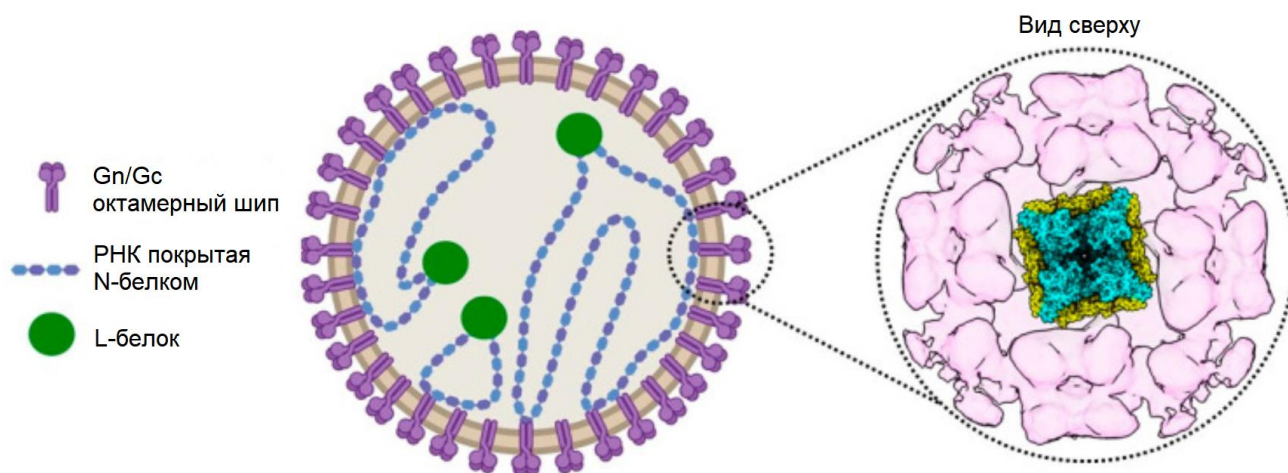


Сегмент S кодирует 433 аминокислоты, M — 1138 аминокислот и L — 2155 аминокислот. Концы сегментов содержат три тринуклеотидных повтора на 3'- и 5'-концах (5' UAGUAGUAG), которые комплементарны между собой и, предположительно, участвуют в регуляции вирусной транскрипции и репликации.

Рисунок 3 - Структура генома ортохантавирусов на примере штамма Puu/Kazan (Z84204, Z84205 и EF405801 для S-, M- и L-сегментов соответственно) (адаптировано по Kabwe E. и др., 2020 [98])



Каждый сегмент вирусной РНК закольцован, за счет комплементарного соединения 3'- и 5'-концов, на которых расположены высоко консервативные последовательности, образующие «ручки сковородки», обеспечивающие возможность вирусной транскрипции и репликации [97]. Такая комплементарность свойственна всем буньявирусам, однако конкретная последовательность специфична для каждого рода [2]. В месте соединения концов каждого сегмента расположена РНК-зависимая РНК-полимераза, а основная часть геномной РНК заключена в оболочку из нуклеокапсида N, как показано на рисунке 4. Фосфолипидная мембрана пронизана трансмембранными гликопротеидами Gn и Gc, которые связаны друг с другом в гетеродимер. Эти гликопротеины находятся в эквимольном соотношении и формируют шипы из четырех гетеродимеров [97,99]. На рисунке 4 показана схема расположений трансмембранных гликопротеинов Gn/Gc на основании изображения электронной микрофотографии.



Слева изображена схема вириона хантавируса, справа изображен вид сверху на гликопротеиновую решетку вируса Тула, полученный с помощью электронной криотомографии и субобъемного усреднения (EMD-11236). Модель тетрамерного шиповидного комплекса Gn/Gc (PDB: 6ZJM), представленная в виде рисунка, помещена в центральную часть.

Рисунок 4 - Вирион хантавируса (адаптировано по Meier K. и др., 2021 [95])



Большой (Large, L) сегмент имеет длину 6500-6600 нуклеотидов, и достаточно консервативен. Он кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA-dependent-RNA-polymerase, RdRp). Фермент обладает эндонуклеазной, транскриптазной, репликазной и хеликазной активностью и обеспечивает транскрипцию мРНК на матрице геномной -РНК, а также репликацию геномной РНК. Синтез этого белка происходит на свободных рибосомах в цитоплазме [100].

Средний сегмент (Medium, M) длиной 3700-3800 нуклеотидов кодирует гликопротеин, и является наиболее вариабельным сегментом генома. В нем закодированы два белка оболочки – Gn и Gc, трансляция которых осуществляется на мембране эндоплазматической сети из одной открытой рамки считывания антигеномной мРНК. В процессе трансляции образуется гликопротеин (Glicoprotein, G), который является белком-предшественником Gn и Gc. Он содержит абсолютную консервативную последовательность из пяти аминокислот WAASA, по которой осуществляется расщепление на белки Gn (N-концевая часть пептида G) и Gc (C-концевая часть пептида G) [101,102]. Благодаря взаимодействию между вирусными гетеродимерами из белков Gn-Gc, экспонированными на внешней оболочке, и клеточными рецепторами происходит присоединение вирусной частицы к плазматической мембране клетки хозяина.

Малый сегмент (Small, S) также является консервативным и имеет длину от 1800 до 2100нт. Он кодирует нуклеопротеин (Nucleoprotein, N), формирующий оболочку непосредственно вокруг вирусной РНК. Таким образом, все сегменты вирусного генома заключены в индивидуальную спиральную оболочку из белка нуклеокапсида N [32,97]. Он имеет большее сродство к 3' концу, чем к 5' концу кольцевых геномных РНК. При его взаимодействии с 3' концом, 5' конец обнажается и может контактировать с РНК-зависимой РНК полимеразой. Кроме того, белок N способствует репликации РНК, непрерывно разворачивая РНК, чтобы сформировать более стабильную структуру [100].

S сегмент также имеет еще одну перекрывающуюся рамку считывания, расположенную с 41 по 311 нуклеотид основной ОРС. Этим обусловлена особая

консервативность этой области [103]. Эта дополнительная рамка считывания кодирует маленький неструктурный белок (Non-structural protein of S segment, NSs) в 90 аминокислотных остатков [98,104]. Данные о его экспрессии имеются только для вирусов Проспект Хилл, Андес, Тула и Пуумала [105–107]. Неструктурный белок влияет на иммунный ответ хозяина посредством ингибирования интерферона I [107], а так же, возможно, через другие механизмы иммунного ответа [108]. Наиболее важной частью неструктурного белка являются его 20 N-концевых аминокислот, участвующих в ингибировании интерферона I [107].

### 1.3.2. Жизненный цикл хантавирусов

При взаимодействии гетеродимеров Gn-Gc с клеточными рецепторами происходит присоединение вирусной частицы к мембране клетки хозяина. Далее клетка захватывает вирус путем эндоцитоза, рН внутри эндосомы уменьшается. В кислой среде происходят конформационные изменения белка Gc, вследствие чего происходит слияние вирусной и клеточной мембраны, благодаря чему геномная РНК и полимеразы попадают в цитоплазму клетки хозяина [109].

Далее происходит первичная транскрипция мРНК на матрице геномной - РНК, осуществляемая вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой. Инициация транскрипции осуществляется вследствие эндонуклеазной активности РНК-зависимой РНК-полимеразы: она отщепляет кэпированный олигонуклеотид от клеточной мРНК и использует его как затравку для синтеза вирусной мРНК. Поэтому на 5' конце мРНК находятся 10-20 нуклеотидов невирусного происхождения [100].

На матрице новообразованных мРНК происходит синтез белков. Полипептиды, закодированные в S и L сегментах синтезируются на свободных рибосомах в цитоплазме клетки. А рибосомами на эндоплазматической сети синтезируется полипептид М сегмента, который расщепляется в последствии на белки Gn и Gc по консервативной аминокислотной последовательности WAASA [101,102]. Этот процесс происходит настолько быстро, что в условиях *in vivo* белок-

предшественник не детектируется. Далее белки Gn и Gc соединяются в гетеродимер, их соотношение в клетке и на поверхности вирусной частицы эквимольно. Затем они транспортируются в аппарат Гольджи, где происходит их гликозилирование [102].

После трансляции запускается сначала репликация, а затем вторичная транскрипция. Репликация генома мембранно-ассоциирована. На эндоплазматической сети идет синтез полноразмерных антигеномных и геномных РНК.

На базе мРНК, образованных в ходе вторичной транскрипции, образуется большое количество вирусных белков. Они транспортируются в аппарат Гольджи. Димеры Gn-Gc гликозилируются по остаткам аспарагиновых аминокислот [102], после чего происходит формирование вирусных частиц. Сначала геномная РНК упаковывается в нуклеокапсид из белка N. Далее цитоплазматические хвосты белков Gn Gc распознают рибонуклеопротеинный комплекс (RNP), благодаря сродству с геномной РНК и нуклеопротеином, и происходит упаковывание сегментов генома в мембрану, содержащую гетеротетрамеры гликопротеинов [110].

Для того, чтобы вирусная частица обладала способностью инфицировать клетку, она должна содержать хотя бы по одному сегменту L, M и S. Однако их соотношение не всегда остается эквимольным, копийность одного из сегментов может быть в избытке. Обычно S сегмент дублируется несколько раз. При этом нуклеокапсид вируса может увеличиваться в размерах [111].

### 1.3.3 Взаимоотношения хантавирусов и их резервуарных хозяев

Первоначально хантавирусы были выделены от мелких грызунов, принадлежащих к трем основным подсемействам: *Murinae*, *Arvicolinae* и *Sigmodontinae* [112]. Было обнаружено, что наиболее значимые хантавирусы инфицировали конкретные виды грызунов-хозяев, не вызывая у них заболевания: вирус Хантаан, как известно, переносился полевыми мышами (*Apodemus agrarius*)

[42,113], вирус Син Номбре – оленьими хомячками (*Peromyscus maniculatus*) [114], вирус Пуумала – рыжими полевками (*Clethrionomys glareolus*) [115], а вирус Сеул обнаруживали у серых крыс (*Rattus norvegicus*) и черных крыс (*Rattus rattus*) [116]. Благодаря этому, начала формироваться идея о видообразовании хантавирусов: предполагалось, что каждый хантавирус был уникально адаптирован к определенному хозяину благодаря долгому процессу их совместной эволюции [117,118]. Это подтверждалось схожестью филогенетических деревьев хантавирусов и их хозяев: общее разнообразие хантавирусов подразделялось на три ветви, представители каждой из которых были ассоциированы с грызунами подсемейств *Murinae*, *Arvicolinae* и *Sigmodontinae* (Рисунок 5).

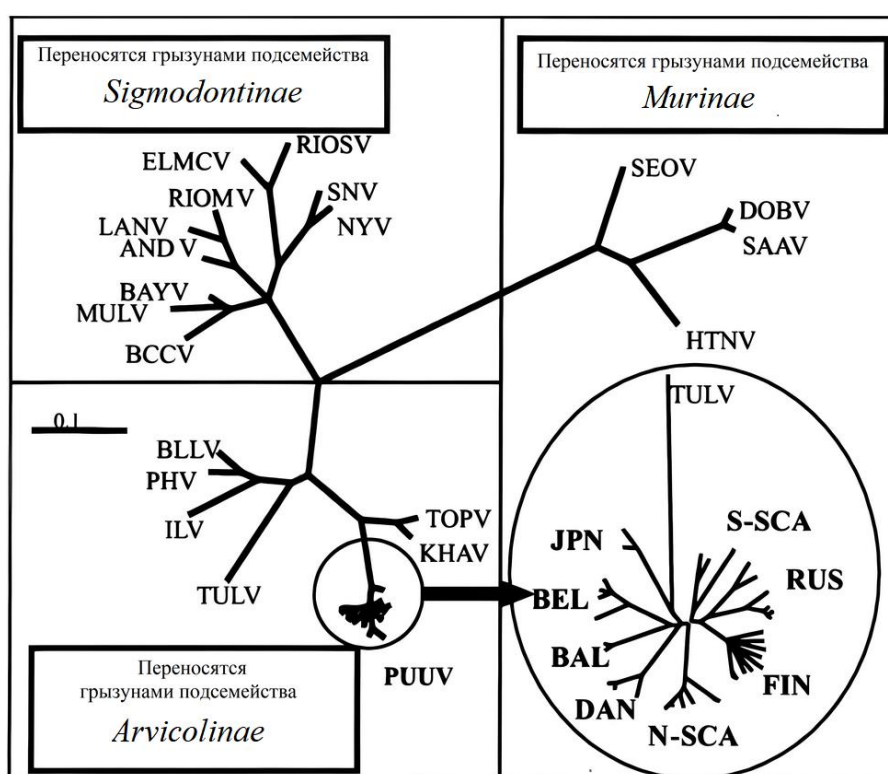


Рисунок 5 - Филогенетическое дерево последовательностей белка N хантавирусов (адаптировано по Sironen T. и др., 2001 [18])

Со временем, количество известных хантавирусов расширялось, в том числе за счет вирусов, экологически ассоциированных с животными, не относящимися к отряду грызуны. Однако даже современное филогенетическое разнообразие хантавирусов разделяется на несколько ветвей, каждой из которых соответствует

отдельная таксономическая единица переносчиков этих вирусов, за исключением некоторых видов вирусов, выбивающихся из общей картины [98]. Наиболее важные эволюционные группы хантавирусов связаны с хозяевами из четырех подсемейств грызунов: обитающие на территории Старого Света подсемейства *Murinae* (семейство *Muridae*) и *Arvicolinae* (семейство *Cricetidae*) и распространенные на территории Нового Света подсемейства *Sigmodontinae* и *Neotominae* (семейство *Cricetidae*) [85].

Эти данные свидетельствовали в пользу предположения о коэволюции хантавирусов и их хозяев на протяжении миллионов лет [119]. Согласно этой гипотезе, хантавирусы являются одним из лучших примеров долговременной связи между РНК-вирусами и их хозяевами. Предположение, что хантавирусы дивергировали в эволюции совместно с грызунами и насекомоядными которых они заражают, было высказано, в том числе, на основании проявления сильной специфичности по отношению к хозяину. Таким образом, предполагалось, что время предполагаемого расхождения (видообразования) ортохантавирусов соответствует времени расхождения их хозяев из подсемейств *Murinae*, *Arvicolinae*, *Neotominae* и *Sigmodontinae* [2]. Исходя из этой теории, и анализу, основанному на последовательностях митохондриальной ДНК (мтДНК) этих грызунов [119], было высказано предположение, что сегменты генома S и М эволюционировали со скоростью от  $0,7 \times 10^{-7}$  до  $2,2 \times 10^{-6}$  и от  $3,7 \times 10^{-7}$  до  $8,7 \times 10^{-7}$  замен/сайт/год, соответственно [18]. Это предполагало значительную консервативность хантавирусов по сравнению с другими РНК-вирусами, для которых была показана скорость эволюции от  $10^{-2}$  до  $10^{-4}$  нуклеотидных замен/сайт/год [119].

Тесная связь одного конкретного хантавируса с одним конкретным грызуном-хозяином, подтверждающаяся значительной степенью синонимии филогенетических деревьев вирусов/грызунов, стала часто повторяющейся моделью и, в конечном итоге, догмой [2]. Однако с самого начала эта догма не получила научного обоснования.

В частности, она не предлагала никакого обоснования тому факту, что некоторые хантавирусы могут персистировать в природе в популяциях двух и более видов хозяев. Например, как указано выше, уже в 1980-х годах было известно, что для вируса Сеул (*Orthohantavirus seoulense*) резервуарными хозяевами являются, как минимум, два вида крыс – серая и черная [116], а вирус Добрава-Белград (*Orthohantavirus dobravaense*), подразделяется на несколько генотипов, которые переносятся тремя видами мышей: вирус Добрава - желтогорлой мышью (*Apodemus flavicollis*), вирус Сочи - кавказской лесной мышью (*Sylvaemus ponticus*) и вирус Куркино - западным подвидом полевой мыши (*Apodemus agrarius*) [77,83,120].

Помимо этого, со временем накапливались сведения об экологической связи хантавирусов с представителями млекопитающих, не относящихся к отряду грызуны. Первоначальная концепция, согласно которой хантавирусы ассоциированы строго с грызунами, была подвергнута сомнению в начале 1990-х годов, когда выяснилось, что вирус Thottapalayam (TPMV), выделенный в 1965 году в Индии из азиатской домашней землеройки (*Suncus murinus*), относящейся к отряду насекомоядные (*Eulipotyphla*) [121] являлся родственным по отношению к известным тогда хантавирусам [122–124]. Несмотря на то, что экологическая ассоциация TPMV с землеройками была подтверждена [125], этот вирус достаточно долгое время рассматривался как исключение из общего правила. Однако, далее стало появляться все больше данных о том, что и другие хантавирусы, помимо TPMV, могут инфицировать насекомоядных (землероек и кротов) [126–131]. Оставалось неизвестным, действительно ли эти хантавирусы ассоциированы с насекомоядными, или это результаты случайного заражения не основного хозяина, являющегося для вируса эволюционным тупиком. В 2007 г. были зарегистрированы первые однозначные данные об экологической связи хантавирусов, отличных от TPMV, с землеройками: при описании вируса Сивис у обыкновенных бурозубок (*Sorex araneus*), отловленных в Швейцарии [132]; вируса Camp Ripley у обыкновенных короткохвостых бурозубок (*Blarina brevicauda*),

отловленных в США [133]; вируса Cao Bằng (CBNV) у чешуелапой кротоземлеройки (*Anourosorex squamipes*), отловленной во Вьетнаме [134]; и вируса Tanganyia у белозубок Терезы (*Crocidura theresae*), отловленных в Гвинее [135]. С тех пор в Африке, Азии, Европе и Северной Америке было обнаружено еще не менее 13 хантавирусов, ассоциированных с семейством *Soricidae* [2].

В 2008 г. был описан первый хантавирус ассоциированный с кротами (*Talpidae*), вирус Асама, обнаруженный у японского землеройкового крота (*Urotrichus talpoides*) [136]. С тех пор в Азии, Европе и Северной Америке было обнаружено по крайней мере еще 7 хантавирусов, ассоциированных с кротами [2].

Первое подтверждение того, что хантавирусы заражают также летучих мышей (отряд *Chiroptera*) в дополнение к млекопитающим отрядов *Rodentia* и *Eulipotyphla* было опубликовано в 2012 г., когда у мохнатого щелеморда (*Nycteris hispida*) в Сьерра-Леоне был обнаружен вирус Magboi [137]. По меньшей мере 11 других хантавирусов летучих мышей были обнаружены впоследствии в Африке, Азии и Европе, охватывая носителей обоих подотрядов рукокрылых *Yinpterochiroptera* (*Hipposideridae*, *Pteropodidae* и *Rhinolophidae*) и *Yangochiroptera* (*Emballonuridae*, *Molossidae*, *Nycteridae* и *Vespertilionidae*) [2,138,139].

Кроме того, есть данные об идентификации хантавирусов у рептилий и рыб [20,140].

Поскольку исключения из правила «одно млекопитающее — один хантавирус» стали более частыми [141,142], стало очевидным, что совместное видообразование хантавиридов с хозяевами является лишь одним из факторов, повлиявших на их эволюцию. Эволюционная история семейства *Hantaviridae*, вероятно, включала также множественные и запутанные события реассортации [20], а так же смены резервуарных хозяев, приводящие к образованию новых видов [143–148].

В последние десятилетия обсуждали различные теории эволюции хантавирусов [51,117–119,149–153], исключая недавно открытые подсемейства *Actantavirinae*, *Agantavirinae* и *Repantavirinae*. Подсемейство *Mammantavirinae*

(рода *Loanvirus*, *Mobatvirus*, *Thottimvirus*, а также *Orthohantavirus*) легче поддается целостному анализу, поскольку они, согласно современным данным, инфицируют исключительно млекопитающих.

Резервуарными хозяевами вирусов, входящих в подсемейство *Mammantavirinae* являются летучие мыши, насекомоядные и грызуны, чей общий предок существовал в расчетной точке диверсификации плацентарных млекопитающих в кайнозой ( $\approx 66$  млн лет назад) [2]. Согласно гипотезе о коэволюции хантавирусов и их хозяев, в это же время должен был существовать и общий предок вирусов подсемейства *Mammantavirinae*.

Если предположить, что еще и вирусы подсемейств *Actantavirinae*, *Agantavirinae*, *Repantavirinae*, инфицирующие рептилий и рыб [20] также образовались в ходе коэволюции, то хантавирусы должны были распространиться на всех хордовых, тогда как на данный момент они были обнаружены только у нескольких ветвей животных [2].

Более того, теория коэволюции не нашла никаких подтверждений при использовании байесовского анализа: метод Монте-Карло байесовской цепи Маркова позволил оценить скорость эволюции и время дивергенции для рода *Orthohantavirus*, и для их природных резервуаров [154]. Средняя скорость эволюции S сегмента хантавирусов, переносимых грызунами, оценивалась примерно в  $6.76 \times 10^{-4}$  нуклеотидных замен/сайт/год [154], что соответствует диапазону от  $2,10 \times 10^{-2}$  до  $2,66 \times 10^{-4}$  нуклеотидных замен/сайт/год, характерному для скорости эволюции мутаций РНК-вирусов [98]. Таким образом не было найдено никаких доказательств истории совместного расхождения хантавирусов и их хозяев. Кроме того, время расхождения для рода *Orthohantavirus* было на много порядков меньше чем то, что могло бы соответствовать временной шкале видообразования их хозяев. Поэтому было выдвинуто предположение, что очевидное сходство между филогенетическими деревьями хантавирусов и их хозяев-млекопитающих является результатом более поздней истории смены хозяев и адаптации к ним. Аминокислотные замены в этих вирусах, по-видимому, также



совместимы с историей адаптации к хозяину, а не параллельной эволюции хозяина и вируса.

Принадлежность хантавирусов к порядку *Elliovirales*, многие представители которого поражают членистоногих, позволило высказать предположение, что первоначальным естественным хозяином общего предка ортохантавирусов могло быть насекомое [48,155]. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные филогенетического анализа, полученные при изучении нуклеотидных последовательностей («жесткокрылый hanta-родственный вирус OKIAV221»), обнаруженных у корневых долгоносиков *Curculionid diaprepes* с помощью метагеномного секвенирования, оказавшихся родственными последовательностям хантавирусных РНК-полимераз [156].

Существует также гипотеза, основанная на байесовском методе исследования, о том, что современное генетическое разнообразие нуклеопротеина хантавирусов, переносимых грызунами, возникло всего около 2000 лет назад. Хантавирусы, переносимые подсемействами *Murinae* и *Arvicolinae*, вероятно, возникли в Восточной Азии (предположительно на юго-востоке Китая) 500-700 лет назад, а затем распространились вместе со своими хозяевами по территориям Сибири, Европы, Африки и Северной Америки. Хантавирусы Нового Света, переносимые подсемейством *Neotominae*, возникли 500-600 лет назад в Центральной Америке и распространились по территории Северной Америки. А хантавирусы, связанные с *Sigmodontinae*, появились в Бразилии 400 лет назад и, вероятно, произошли от вируса, ассоциированного с *Neotominae*, из северной части Южной Америки [157].

Изучение филогении и эволюции ортохантавирусов выявило большое количество видов ортохантавирусов, адаптированных к широкому кругу животных-хозяев. Географическое распространение и миграция хозяев могут территориально изолировать отдельные штаммы вирусов, поддерживая их независимую эволюцию. Многочисленные различные гипотезы эволюции ортохантавирусов показывают, насколько сложно изучать эти патогены [98].

До сих пор нет единого мнения по поводу эволюционного развития хантавирусов. Филогенетические истории хантавирусов не всегда совпадают с филогенетическими историями их хозяев, что позволяет предположить, что межвидовая передача сыграла значительную роль в хантавирусной эволюции, хотя имеются также данные о ко-дивергенции вируса и хозяина [158]. По-видимому, в разные периоды эволюционной истории, хантавирусы коэволюционировали вместе с хозяевами, либо адаптировались к другим видам. Поэтому обе теории могут быть верны, в той или иной степени.

### 1.3.4 Реассортация и рекомбинация хантавирусов

Реассортационное и рекомбинационное события могут возникать при совместной коинфекции одного хозяина двумя или несколькими вирусами. Если при этом дочерние вирусные частицы содержат интактные геномные сегменты разных родительских вирусов, то говорят, что произошла реассортация [159]. Если произошел обмен большими участками генома в пределах одной молекулы ДНК/РНК – это называется рекомбинацией [160].

Рекомбинация была показана для вирусов Добrava-Белград в пределах М сегмента [161], а для вируса Тула – в пределах S сегмента [162].

Реассортация, или обмен сегментами, была впервые обнаружена вскоре после открытия ХПС, для вируса Син Номбре [163]. Считается, что она играет значительную роль в эволюции и видообразовании сегментированных вирусов [98]. У других вирусных таксонов, например, у Рео-, Арена- и Буньявирусов реассортация хорошо описана [20]. При этом до недавнего времени отличительной чертой хантавирусов считали редкость реассортационных событий. Действительно, для остальных Буньявирусов описана векторная передача через членистоногих. Частое питание, например, комаров значительно увеличивает вероятность инфицирования комара или млекопитающего двумя, или несколькими вирусами. Благодаря этому создаются условия для реассортации. Хантавирусы же циркулируют в популяциях хозяев и преимущественно один вид млекопитающих

поддерживает его циркуляцию в природе. Благодаря этому, вероятность коинфекции уменьшается, следовательно, уменьшается и частота реассортации в природных условиях. Поэтому, большинство случаев реассортации ограничено внутривидовым обменом сегментами, где оба родительских генотипа переносятся одним видом грызуна-хозяина [20].

Однако со временем накопились данные о противоречивости филогенетических деревьев для разных сегментов хантавирусов, что свидетельствует о накоплении реассортационных событий, как для хантавирусов переносимых грызунами, так и для недавно обнаруженных хантавирусов, чьими хозяевами не являются грызуны [20].

Реассортация была показана для патогенных для человека хантавирусов в условиях *in vitro* и *in vivo*: Син Номбре, Андес, Пуумала, Добрава-Белград, Сеул, Хантаан, Проспект Хилл [20,163–166], а так же для малоизученных вирусов землероек, таких как Имджин и Сивис [20]. Многочисленные сведения о реассортации среди хантавирусов позволяют говорить, о том, что она играет важную роль в их эволюции и, тем самым, внесла значительный вклад в формирование современного многообразия хантавирусов [20,165].

Успешная перегруппировка сегментов между двумя родительскими штаммами требует высокой гомологии, для совпадения сигналов упаковки и взаимодействия РНК и белков. Поэтому реассортация между более филогенетически далекими вирусами встречается реже, однако она, по-видимому, играет важную роль для преодоления межвидового барьера и заражения других хозяев. М-сегмент наиболее подвержен реассортации, скорее всего это связано с тем, что для сегментов S и L требуется высокая степень генетической совместимости, а изменения в М сегменте легче переносятся, или дают эволюционное преимущество [20,98]. При этом, процесс упаковки, приводящий к образованию вирусных частиц с некоторыми сегментами от обоих родителей, по-видимому, не случаен [98].

События реассортации и гомологичной рекомбинации хорошо описаны для наиболее часто встречающегося в Европе хантавируса Пуумала [167–169]. В серии экспериментов, проведенных в северной Финляндии показана особенно высокая частота реассортации 19,1-32% [19,20]. Реассортантные штаммы преимущественно обменивались М или S сегментом, L сегмент оставался связанным с родительским S или М сегментом [19, 99].

В статье Szabó [169] описаны различные типы ветвления деревьев, построенных на основании последовательностей S и М сегментов. Авторы утверждают, что в основе этого явления лежат реассортационные события [20,169]. Однако, в этом исследовании приводятся неполные сиквенсы, их длина не превышала 600 нуклеотидов, поэтому эти результаты не позволяют с точностью определить, лежала ли в основе реассортация или гомологическая рекомбинация.

Реассортантные генотипы хантавируса Пуумала постоянно появляются, а затем элиминируются, т.к. они проигрывают родительским генотипам в конкурентной борьбе [170], но есть сведения и о том, что реассортантные штаммы, по крайней мере временно, могут сосуществовать и выживать в популяции с родительскими генотипами. Если реассортантный штамм сохранит скорость репликации близкую к родительскому, то он может успешно конкурировать, а в дальнейшем - распространяться и эволюционировать [164,167].

Идентификация предковых штаммов может быть затруднена в связи с тем, что родительские генотипы также являются реассортантными, что требует от исследователя отследить всю цепочку событий реассортации/рекомбинации, накладывающихся друг на друга. Поскольку перестройки генетического материала хантавирусов потенциально могут приводить к изменению их антигенных и биологических свойств, изучение явлений реассортации и рекомбинации является актуальной проблемой в исследованиях патогенеза ГЛПС [98].

#### 1.3.5. Генетическое разнообразие хантавируса Пуумала

Для хантавируса Пуумала характерен стабилизирующий отбор на белковом уровне, что приводит к накоплению преимущественно синонимичных нуклеотидных мутаций [170]. Вследствие этого вариабельность геномных последовательностей больше чем соответствующих аминокислотных [98].

Первая работа по систематизации накопленных данных о генетическом разнообразии хантавируса Пуумала была проведена в 2001 году. На основании анализа последовательностей S сегментов было показано, что вид разделяется на отдельные генетические линии, каждая из которых имеет характерные аминокислотные остатки в определенных позициях, формирующие собственную аминокислотную «подпись» для каждой линии [18]. Возможно, благодаря этой работе по систематизации, а также из-за наименьшей длины, S сегмент является наиболее изученным. Генетическое разнообразие по кодирующей последовательности S сегмента между генетическими линиями составляет 15-19%, а внутри линий – до 9% [18,98]. S сегмент кодирует два белка: нуклеопротеин N и неструктурный белок NSn.

Внутривидовая идентичность по белку нуклеокапсида N длиной в 433 аминокислоты составляет 94% и выше. Нетранслируемые области S-сегмента более вариабельны, чем кодирующая часть. Поэтому, при исследовании полного S-сегмента вместе с нетранслируемой областью, отличия между некоторыми штаммами хантавируса Пуумала достигают 27% [18]. Наиболее вариабельная часть белка N расположена между 232 и 275 аминокислотными остатками [98,171], а наиболее консервативная часть - между 7 и 94 аминокислотными остатками, которая в большинстве случаев является антигеном. На эту область приходится большая часть рамки считывания неструктурного белка NSn, которая располагается с 41 по 311 нуклеотид основной кодирующей последовательности, благодаря чему эта область сегмента наиболее консервативна. Для белка NSn длиной в 90 аминокислот процент различий достигает 30% [107].

Для M сегмента вариабельность кодирующей нуклеотидной последовательности, а также гликопротеина, наиболее высока, по сравнению с

другими сегментами и соответствующими белками. Иногда наблюдается высокая вариабельность даже в пределах одной генетической линии. Например, нуклеотидные последовательности М сегмента штаммов CG1820, Казань и Самара (относящихся к генетической линии RUS) отличаются на 15–16% [98].

В соответствии с положением международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) критериями выделения нового вида среди ортохантавирусов являются четыре условия: (1) принадлежность к уникальной экологической нише, например, циркуляция в популяции отдельного вида или подвида резервуарных хозяев; (2) более 7% различий в аминокислотной последовательности полногеномных продуктов поверхностных гликопротеинов (Gn и Gc) и нуклеопротеина (N); (3) по меньшей мере четырехкратная разница в титре антител в тестах перекрестной нейтрализации; (4) отсутствие естественных реаранжировок (реассортации или рекомбинации) с другими видами хантавирусов [73].

При этом, для некоторых штаммов хантавируса Пуумала различия в аминокислотных последовательностях белков Gn и Gc достигают 7% и более [73,98], что является показателем высокой вариабельности вируса, однако этого недостаточно для разделения его на несколько видов.

Для L сегмента, так же, как и для S сегмента, характерна большая разница между значениями идентичности нуклеотидных и аминокислотных последовательностей [98]. Высокая консервативность первичной структуры РНК-зависимой РНК-полимеразы указывает на важную роль этого белка в репликации вируса.

Таким образом, М сегмент является наиболее вариабельным по нуклеотидным и, особенно, аминокислотным последовательностям, тогда как L и S-сегменты генома хантавируса Пуумала сравнительно консервативны.

Из-за высокой эволюционной консервативности хантавирусов в целом и хантавируса Пуумала в частности, было высказано предположение, что степень разнообразия нуклеотидных последовательностей связана с расстояниями между местами обитания популяций их хозяев, т.е. количество нуклеотидных различий

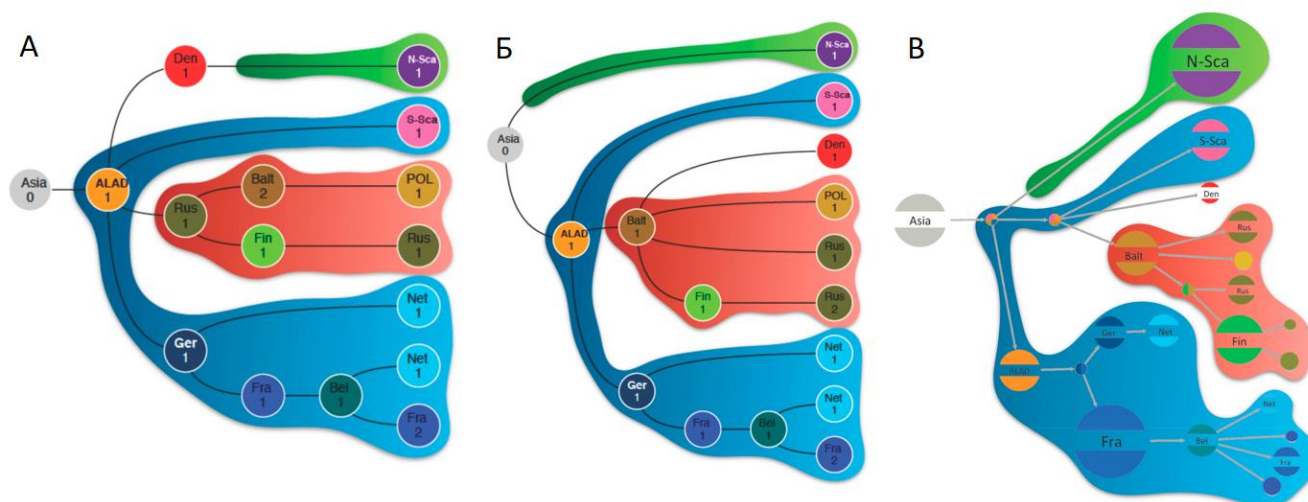
между штаммами имеет прямую корреляцию с их географической удаленностью [172]. Однако, генетическое разнообразие штаммов, обнаруженных на одной территории, может значительно различаться из-за коциркуляции двух линий или сублиний в пределах одной территории [19,167,168,170]. Особенности жизнедеятельности популяций рыжих полевых и миграции молодняка могут определять то, на каких территориях распределен определенный штамм хантавируса Пуумала [98].

На данный момент все известные генетические последовательности хантавируса Пуумала относят к восьми различным генетическим линиям [12,19,21,98]:

- Центральноевропейская (CE) линия — во Франции, Бельгии, Германии и Словакии;
- Альпийская (ALAD) линия — в Австрии, Словении, Хорватии и Венгрии;
- Датская (DAN) линия — только штаммы из Дании;
- Южно-Скандинавская (S-SCAN) линия — в Норвегии и южной Швеции;
- Северо-Скандинавская (N-SCAN) — в северной Швеции;
- Финская (FIN) линия — в Финляндии, Карелии и Западной Сибири;
- Русская (RUS) линия — в России, Эстонии, Латвии и восточной Польше;
- Латвийская (LAT) линия — в Латвии и северо-восточной Польше.

На данный момент общепринятой считается теория о том, что такое разнообразие могло быть результатом изоляции нескольких групп популяций рыжей полевки в рефугиях к югу от обледенения в последний ледниковый период (28–23 тыс. лет назад) и последующей реколонизации Европы после схождения ледника [98,173,174]. В 2019 году была опубликована работа Кастеля с соавторами, в которой авторы пытались воссоздать пути распространения хантавируса Пуумала по территории Европы, связанного с расселением рыжих полевых в постледниковый период [21]. Авторы использовали три биоинформатических метода для воссоздания картины циркуляции полевых на протяжении последних 23 000 лет (Рисунок 6). Несмотря на некоторые отличия в результатах, полученных

разными методами, было высказано предположение, что полевки формировали три больших рефугиума.



Расчет с помощью программ BEAST (А), PastView (Б) и PastML (В). Для А и Б числа указывают количество идентичных переходов, имеющих одного и того же предка. Для В диаметры кругов пропорциональны количеству вершин исходного дерева, содержащихся в каждом кластере. Консенсусные переходы между тремя программами выделены синим, красным и зеленым цветом.

Рисунок 6 – Гипотетические маршруты постледникового расселения хантавируса Пуумала в Европе (адаптировано по Castel G. и др., [21])

По-видимому, самой достоверной является группа, содержащая линии **RUS**, **FIN** и **LAT**. Эти линии обособлены в отдельную ветвь на филогенетическом дереве, и распространились из «Восточного» рефугия, предположительно располагавшегося между Карпатским горным хребтом и побережьем Балтийского моря. Они дали начало вирусам, присутствующим на территории современных стран Балтии, Польши, России и Финляндии [21].

Из Центральноевропейского рефугия, находившегося на территории Альпийско-Адрианского региона (Балканы, Австрия и Венгрия) произошли генетические варианты вируса, присутствующие в настоящее время в странах



Западной Европы (Германия, Франция, Бельгия и Нидерланды) и представлены Альпийской (ALAD) и Центральноевропейской (CE) линиями [21].

Генотипы, распространенные в Дании и Северной Скандинавии, распространились третьим путем, для которого используемые алгоритмы показали определенную несогласованность. Авторы предполагают, что они были занесены туда рыжими полевками с Урала, в настоящее время населяющими северную Швецию и северную Финляндию [21].

Несмотря на значительные успехи в выявлении генетического разнообразия хантавируса Пуумала в Евразии, получившиеся результаты неполны и довольно противоречивы. Необходимы дополнительные исследования, чтобы с большей достоверностью картировать циркуляцию генотипов в странах Евразии [98].

### 1.3.6 Распространение хантавируса Пуумала на территории России

В настоящее время известно о распространении на территории России двух генетических линий вируса Пуумала: RUS и FIN, которые мы рассмотрим подробнее.

Большая часть нуклеотидных последовательностей линии RUS, имеющих в базе данных GenBank, относятся к Приволжскому федеральному округу. Основная часть геноизолятов получена с территории Татарстана [13–15,175] и Саратовской области [11,176]. Также есть данные о РНК последовательностях вирусов, циркулирующих на территории Республики Башкортостан и Удмуртской Республики [12], Республики Мордовия [15], а также Самарской [26], Ульяновской [12], Оренбургской [10] областей.

Данные о нуклеотидных последовательностях вируса Пуумала на территории Центрального федерального округа чрезвычайно скудны. Несмотря на то, что на ЦФО приходится около 13% от общей заболеваемости ГЛПС в России [70], нам удалось найти в базе данных GenBank лишь две последовательности: AF284343 [177] и EU652421 [10]. EU652421 - это короткий (менее 300 нуклеотидов) фрагмент М сегмента, который был выделен из рыжей полевки на территории Липецкой

области. Последовательность AF284343 длиной 718 нуклеотидов была получена из рыжей полевки, отловленной на территории Егорьевского района Московской области во время вспышки ГЛПС-Пуумала в 1995 году. В соответствующей публикации описана как новый генотип «Москва» вируса Пуумала [177]. Несмотря на это, за прошедшее время, по-видимому, не было предпринято попыток исследования генотипа, циркулирующего в Московской области, а также в других субъектах ЦФО.

Данные о циркуляции линии RUS имеются и за пределами России: в Эстонии [18], Латвии и Польше [19].

Линия FIN интересна тем, что оказалась первым известным представителем вида. Она распространена на территории Финляндии [168], Швеции [178], Российской Карелии [27], Омской [22] и Тюменской областей [10], есть также данные о ее циркуляции на территории Татарстана [28]. В базе данных GenBank зарегистрированы полные нуклеотидные последовательности S сегмента из Финляндии, Карелии и Омской области.

Таким образом, представители генетической линии FIN оказались на большом расстоянии друг от друга. Более того, гены цитохрома рыжих полевок из этих регионов также были родственны [22]. Для объяснения этого феномена была выдвинута следующая гипотеза: во время обледенения 28-23 тысяч лет назад популяции рыжих полевок, переносящих хантавирус Пуумала, скрывались в ледниковых убежищах. После окончания ледникового периода и реколонизации грызунами освободившихся территорий, популяция рыжих полевок – носителей ветви FIN разделилась на два потока, мигрировавших в разных направлениях. Потомки одной группы устремились на север, в Финляндию, а потомки другой оказались к востоку от Уральских гор (Рисунок 7).



Знаки в форме ромба - места, где были обнаружены хантавирусы. Черные и белые круги представляют места, где были пойманы *Clethrionomys* гаплотипа “glareolus” и гаплотипа “rutilus”, соответственно. Стрелками обозначены гипотетические маршруты миграции полевков.

Рисунок 7 - Карта России и Фенноскандии (адаптировано по Dekonenko A. и др., 2003 [22])

К настоящему времени известно, что генетические линии LAT, FIN и RUS имеют общее происхождение. Они распространились из «Восточного» рефugia, предположительно располагавшегося между Карпатским горным хребтом и побережьем Балтийского моря и распространились по территории современных стран Балтии, Польши, России и Финляндии [21]. Однако выдвинутые гипотезы [21,22] не позволяют воссоздать целостную картину того, каким образом происходило распространение ветвей LAT, FIN и RUS по территории Евразии. На значительных площадях, включающих ЦФО, СЗФО, ЮФО России, а также Беларусь и Украину, данные о генетических вариантах вируса Пуумала весьма скудны или отсутствуют. Изучение генетических вариантов, циркулирующих на этих территориях, позволит пролить свет на эволюционную историю хантавируса Пуумала.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Материалы

Образцы легочной ткани рыжих полевок, отловленных на территориях Курской, Ульяновской, Саратовской, Ивановской, Московской (Приокско-Террасный заповедник), Пензенской, Архангельской, Тюменской областей и Удмуртской Республики, а также секционные материалы от пациента ГЛПС с летальным исходом поступили из ФБУЗ (Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения) «Центр гигиены и эпидемиологии в Курской области», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ивановской области», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пензенской области», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Архангельской области и Ненецком автономном округе», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Удмуртской Республике» в Центр по мониторингу ГЛПС на базе ФГАНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита).

Полевой материал из Республики Башкортостан получен от ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан». Грызуны из Волоколамского района Московской области отловлены сотрудниками группы разработки новых методов диагностики природно-очаговых заболеваний ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в окрестностях сел Новопавловское и Суворово. Сбор полевого материала проводили в соответствии с МР 3.1.0211-20 «Отлов, учет и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций». Видовую принадлежность мелких млекопитающих определяли морфологически. Затем животные были умерщвлены и от них были стерильно забраны ткани печени, селезенки, почек и легких. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом (Протокол № 92 от 20 мая 2019 г.) ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Все образцы биологического материала хранились в замороженном виде при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Перед экстракцией нуклеиновых кислот допускалось

однократное оттаивание-замораживание биологического материала. Для дальнейших исследований биоматериал гомогенизировали с помощью гомогенизатора QIAGEN TissueLyser.

Лабораторные исследования поступивших материалов проводили в соответствии с действующими нормативными документами (МУК 4.2.2494-09 «Организация молекулярно-генетических исследований биологического материала из природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом»).

## **2.2 Иммунологические исследования**

Антитела к хантавирусам определяли в сыворотке крови пациента, а также в настоях сердец грызунов методом флуоресцирующих антител (МФА) с помощью «Диагностикума ГЛПС» производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). При исследовании материалов от грызунов использовали ФИТЦ-конъюгат антител против иммуноглобулинов (IgG+IgM) мыши. Для серотипирования антител использовали слайды с моновалентными антигенами вирусов Пуумала и Куркино, как описано ранее [179].

Иммунологические исследования проводили на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) сотрудниками лаборатории геморрагических лихорадок Курашовой Светланой Сергеевной и Дзагуровой Тамарой Казбековной.

## **2.3 Экстракция вирусной РНК**

Экстракцию вирусной РНК для дальнейшего секвенирования проводили методом фенол-хлороформной экстракции из 10% суспензии тканей легких грызунов, а также из секционных материалов, приготовленных на PBS буфере. Для этого использовали набор экстракции «РИБО-золь-АМ», входящий в состав тест-системы AmpliSens «RABV» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя.

Экстракцию РНК из образцов из Волоколамского района Московской области проводили с использованием набора реагентов РИБО-преп (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно инструкции производителя.

Для оценки диагностической чувствительности и специфичности метода ПЦР в режиме реального времени, экстракцию РНК из образцов органов грызунов проводили также с использованием набора реагентов РИБО-преп (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно инструкции производителя.

#### **2.4 Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени с флуоресцентной детекцией**

ОТ-ПЦР в реальном времени - это быстрый и чувствительный метод обнаружения вирусов, который обеспечивает высокую специфичность в сочетании с количественным измерением и воспроизводимостью результатов исследований [180]. Этот метод использовался для первичной оценки содержания РНК хантавируса Пуумала в биологическом материале.

Для проведения ОТ-ПЦР, нами были разработаны праймеры и зонд, специфичные для хантавируса Пуумала (Таблица 2). Олигонуклеотиды были синтезированы компанией ООО «СИНТОЛ».

Таблица 2 - Праймеры и зонд для проведения ОТ-ПЦР

Название	Последовательность, 5' -> 3'
Puumala-F	GTC AGC ATT GGA GGA TAA ACT C
Puumala-R	CGG GTC AGT AGG TTT AGT ATC CAT
Puu-Z Rox	ROX- A ATG GCA GAT GCT GTG TCC CAT -BHQ2

С помощью данных праймеров проводилась амплификация фрагмента генома S сегмента хантавируса Пуумала, длиной в 91 нуклеотид, соответствующий позициям 194-284 по последовательности MH251331.1 в базе данных GenBank.

Для проведения обратной транскрипции и амплификации использовали реагенты производства ФБУН ЦНИИЭ, Москва: 4,4мМ дНТФ (Т), ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, Полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv), RT-G-mix-2; стандартный температурный профиль Амплисенс (Таблица 3).

Таблица 3 – Температурный профиль ОТ-ПЦР

Температура, °C	Длительность, мин:с	Количество циклов
50	15:00	1
95	15:00	1
95	0:10	45
60	0:20 *	

\* - детекция флуоресцентного сигнала

Для измерения чувствительности тест-системы, а также проведения последующих экспериментов и контроля прохождения ПЦР были созданы контрольные образцы, представляющие собой MS2-фаг, содержащий в геноме целевой фрагмент амплификации в РНК-форме.

Для получения контроля с помощью ПЦР нарабатывали ампликон на основании штамма DTK-Ufa-97. Далее проводили клонирование целевого фрагмента ДНК в модифицированный вектор рЕТ со встроенными генами созревания и оболочки MS2-фага (pET20-ms2 Xcm-stuff (core-XcmI-mut), clone 3), содержащий также фрагмент гена gag ВИЧ. Полученные плазмиды вводили в клетки E.coli штамма BL21, наращивали их в жидкой культуре до оптической плотности 0,1 и проводили индукцию экспрессии с помощью Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в течение 4 часов для получения частиц ms2 фага в клетках бактерии. Наращённую культуру осаждали центрифугированием, обрабатывали лизоцимом и проводили замораживание-оттаивание для лизиса клеток. Затем проводили обработку ДНКазой и РНКазой центрифугировали и использовали супернатант, содержащий фаговые частицы, для дальнейшей очистки ультрацентрифугированием в градиенте плотности CsCl.

Ультрацентрифугирование проводили в течение 20 часов при 200 000 g с помощью центрифуги Optima Max Ultracentrifuge Beckman Coulter. Полученный градиент разделяли на 7 фракций, которые тестировали с помощью ПЦР в реальном времени. В результате отбирали фракцию, содержащую наибольшее количество фаговых частиц и наименьшее количество примеси ДНК, и использовали ее в дальнейшем в качестве контрольного образца. Получение контроля проводилось сотрудником группы генной инженерии и биотехнологии (ГИБТ) ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора Войцеховской Яной Александровной.

С помощью системы CQS-gag (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) была определена точная концентрация контрольных образцов, выраженная в копиях в мл. Были приготовлены различные разведения положительного контрольного образца, содержащего РНК целевого фрагмента амплификации хантавируса Пуумала в известных концентрациях, в сравнении с которыми мы определяли количество копий РНК хантавируса Пуумала, содержащихся в пробах биологического материала [181].

## **2.5 Амплификация и секвенирование**

### **2.5.1. Амплификация протяженных последовательностей**

В этой работе нами была разработана методика амплификации для получения последовательностей S, M и L сегментов хантавируса Пуумала. Для амплификации и последующего секвенирования мы создали 24 пары вырожденных праймеров (Таблица 4), благодаря которым можно было получить ампликоны длиной 520-570 нуклеотидов с перекрытием. Соответствующие последовательности имели длину 1781-1786 и 3627-3629 для S и M сегментов соответственно, включающие их полные кодирующие последовательности; и 6405 нуклеотидов L сегмента, составляющие более 98% от его кодирующей последовательности.



Таблица 4 - Праймеры, используемые для амплификации и секвенирования

Праймер	Последовательность, 5' -> 3'
PL-f1	AGA GAA RTT TAC TAC AAA TGG
PL-r1	ATT CCT CCT ACT AGG CC
PL-f2	TCA ACA CAR TGG CCT AG
PL-r2	YGG TTC TTT AAT ATT YTG TGT
PL-f3	GAT ATC ATY AAY TAT TAT AAT CC
PL-r3	CCW GCA ACY TCA AGT GAT
PL-f4	ATT GCA CAT GCA GGG C
PL-r4	CCT TAT TTT GTT ATT CTG AGC
PL-f5	CGR CCK TTY AAA AGT GC
PL-r5	TGC TGC YAR ATG ACC ATC
PL-f6	TCT TAA RGG KAT GTC AGG
PL-r6	AA TTT TTW ARY TTR TCA TCA CG
PL-f7	ACY CAA TCY TTA TAT GAT GG
PL-r7	TAA AKG GAA TWG AGA CTG C
PL-f8	ACA GTA TCH CCT ACA AAT G
PL-r8	TAG GGG TRA AYA CTT TCC
PL-f9	AGC ATG AYC GTT TRG GAG A
PL-r9	AAT AGG ATT YTG WAT TGT TTG
PL-f10	CAA GAC AAA TYC ATA GAC C
PL-r10	CAG GYA AHA CYC CTC TTG
PL-f11	GAR GTW TGG AGA TGG TG
PL-r11	GBA CAT TAG GYT TAC CCC
PL-f12	AGT GGY TTT GAR TGG GG
PL-r12	TCA AGG TCA ATA GTR TAA TC
PL-f13	ATR GAT GAY AGT GAT GAT G
PL-r13	YAA TAA GAT ATC AGC ATG TC
PM-f1	TAG TAGTAG ACT CCG CAA GA
PM-r1	AAC ACA GTA TGT YTT YTC ATA
PM-f2	TTT AGG TGA TCA AAG RAT TCA
PM-r2	GAT TCC WGG DGC CCA AAT
PM-f3	TAG TCC TCT TTA TAC ATC TAC
PM-r3	GGT ATT AAD ACC CAR CCA AA
PM-f4	TGT ACC DGG TCT TCA TGG
PM-r4	TAA TTC CAG RTC AGT TTT CAT

Продолжение таблицы 4

PM-f5	ACA GAY ACA GCA CAY GG
PM-r5	AGT GTC AGA KGG TTG RAA T
PM-f6	CCA CTT CWG TYA ARG TGT G
PM-r6	GGT GGA YCC ATA RCA CAT
PM-f7	CAT CAA TCA ARG CHT GTG AT
PM-r7	CTC CGC ARG AAC AAA AGT CCA GG
PS-f1	AG TAG TAG ACT CCT TGA ARA GC
PS-r1	TGA TTG RGC WGT AGG CAT
PS-f2	CAT TTG AGG AYA THA ATG GC
PS-r2	CCA CAG TTT TWG ATG CCA T
PS-f3	ATG GGT ATT TGC YTG TGC
PS-r3	TTC CAG TTA AAC CCT GAT TA
PS-f4	CAG AAG GTR AAA GAG ATA TC
PS-r4	TAG TAG TAT GCT CCT TGA AAA GC

\*Вторая буква в названии образца обозначает сегмент хантавируса Пуумала

Олигонуклеотиды были синтезированы компанией АО «ГЕНТЕРРА», Россия.

Амплификацию выполняли в два этапа. Первый этап проводили в формате мультиплекс для того, чтобы обеспечить возможность получения ПЦР-продуктов из минимального объема материала. Он включал обратную транскрипцию и 15 циклов амплификации (Таблица 5) мультиплексной ПЦР с использованием набора SuperScript III one-step RT-PCR Platinum Taq HiFi kit (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. При этом использовались два пула праймеров, один содержал четные, а другой нечетные праймерные пары. Таким образом, на первом этапе каждый образец амплифицировали в двух пробирках.

Таблица 5 - Температурный профиль первой стадии амплификации

Температура, °C	Длительность, мин:с	Количество циклов
50	30:00	1
94	2:00	1
94	0:15	15
50	0:30	
68	0:40	
68	5:00	1

Далее проводилось 30 дополнительных циклов амплификации (Таблица 6) с Taq-полимеразой производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва. Для этой стадии ПЦР использовали отдельные пары праймеров.

Таблица 6 - Температурный профиль второй стадии амплификации

Температура, °C	Длительность, мин:с	Количество циклов
95	2:00	1
95	0:15	30
50	0:30	
72	0:40	
72	5:00	1

Образцы, прошедшие такую пробоподготовку (ткани рыжих полевок, отловленных на территориях Курской, Ульяновской, Саратовской, Ивановской, Московской (Приокско-Тerrasный заповедник), Пензенской, Архангельской, Тюменской областей и Удмуртской Республики, а также органы пациента с ГЛПС) секвенировали методом Сэнгера.

Образцы из Волоколамского района секвенировали методом NGS, поэтому для них использовали модифицированный протокол: на первой стадии ОТ-ПЦР использовали 3 пула праймеров (Таблица 7). Вторую стадию амплификации проводили аналогично, с использованием праймерных пар, указанных в таблице 4. При этом время элонгации для обеих стадий было увеличено с 40с до 80с. Таким

образом были получены ампликоны размером около 1200 нуклеотидов с перекрывающимися областями около 500 нуклеотидов.

Таблица 7 - Пулы праймеров для NGS секвенирования

	Пул 1	Пул 2	Пул 3
Пары праймеров	PL-f1/PL-r2	PL-f2/PL-r3	PL-f3/PL-r4
	PL-f4/PL-r5	PL-f5/PL-r6	PL-f6/PL-r7
	PL-f7/PL-r8	PL-f8/PL-r9	PL-f9/PL-r10
	PL-f10/PL-r11	PL-f11/PL-r12	PL-f12/PL-r13
	PM-f1/PM-r2	PM-f2/PM-r3	PM-f3/PM-r4
	PM-f4/PM-r5	PM-f5/PM-r6	PM-f6/PM-r7
	PS-f1/PS-r2	PS-f2/PS-r3	PS-f3/PS-r4

#### 2.5.2 Амплификация участка L сегмента родоспецифичными праймерами

Для определения наличия вируса Пуумала в грызунах из Волоколамского района Московской области, а также в качестве референсного метода для определения диагностической чувствительности и специфичности метода ОТ-ПЦР использовали родоспецифичные праймеры на L сегмент хантавирусов.

#### *Обратная транскрипция*

Вирусную кДНК получали с использованием набора «Реверта L» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, согласно инструкции производителя.

#### *Амплификация*

Амплификацию проводили методом «вложенной» ПЦР, предложенным Б.Клемпа с соавторами, с использованием двух пар родоспецифичных праймеров HAN-L-F1/HAN-L-R1, HAN-L-F2/HAN-L-R2 амплифицирующих участок L сегмента хантавирусов [182]. Данный метод был выбран, поскольку широко используется исследователями для идентификации широкого спектра патогенных и непатогенных представителей рода *Orthohantavirus*. Обе стадии амплификации проводили с одинаковым температурным профилем (Таблица 8).

Таблица 8 – Температурный профиль амплификации участка L сегмента

Температура, °C	Длительность, мин:с	Количество циклов
95	5:00	1
95	0:30	27
53	0:45	
72	0:45	
72	2:00	1

Полученные ампликоны были секвенированы методом Сэнгера с внутренних праймеров «вложенной» ПЦР.

### 2.5.3 Электрофорез в агарозном геле

Для визуализации результатов амплификации проводили электрофорез молекул ДНК в буфере ТАЕ в 1% или 1,7% агарозном геле (в зависимости от длины целевого фрагмента ДНК) с бромистым этидием. Использовали маркеры длин ДНК производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Ростпотребнадзора. Электрофорез проводили в мини-камере для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Москва, Россия) при постоянном напряжении 80В.

В случае образования неспецифичных продуктов амплификации, для дальнейшего секвенирования по методу Сэнгера целевые полосы вырезали из геля с помощью набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США), согласно инструкции производителя.

### 2.5.4. Секвенирование

#### *Метод Сэнгера*

Полученные ампликоны очищали с использованием смеси ферментов FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1 U/ $\mu$ L (Thermo Fisher Scientific, Остин, Техас, США) и экзонуклеаза I из E.coli, 20 е.а./мкл, 4000 е.а. (Thermo Fisher Scientific, Остин, Техас, США) и далее секвенировали по методу Сэнгера с использованием набора для секвенирования циклов BigDye Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific,

Остин, Техас, США) на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500xL (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). Для образцов, очищенных от неспецифичных продуктов амплификации посредством вырезания из геля (как описано в пункте 2.5.3) секвенирование проводили без предварительной обработки ферментами. Секвенирование проводили сотрудники группы ГИБТ ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора Валдохина Анна Владимировна и Буланенко Виктория Петровна.

#### *Метод секвенирования нового поколения*

Полученные ампликоны для каждой из проб были смешаны в эквимольном соотношении. Для получения индексированных библиотек использовали набор Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, USA), согласно инструкции производителя. Выделение фрагментов ДНК в диапазоне от 200 до 400 п.н. проводили с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA). Диапазон длин фрагментов оценивали с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Germany) на биоанализаторе Agilent 2100. Измерение концентрации полученных библиотек проводили при помощи количественной ПЦР (NEBNext® Library Quant Kit for Illumina, New England Biolabs, UK).

Нормализованные библиотеки секвенировали на приборе MiSeq с использованием MiSeq Reagent Kit v3. Запуск секвенирования проводили сотрудники лаборатории геномных исследований ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора Роев Герман Викторович и Хафизов Камиль Фаридович.

## **2.6 Обработка первичных данных секвенирования**

Для первичной обработки данных секвенирования по Сэнгеру и сборки полученных последовательностей использовали программное обеспечение DNASTAR Lasergene SeqMan версии 7.0.0.

Для предварительной обработки FASTQ файлов, полученных методом NGS, сырые риды в формате FASTQ обрабатывали с помощью программы Trimmomatic

v0.39 с применением опций SLIDINGWINDOW:4:25, MINLEN:40 для удаления адаптеров Nextera [183]. Затем у триммированных последовательностей отрезали праймеры с помощью cutadapt v3.4 [184]. С помощью bowtie2 v2.4.4 [185], с опцией — local, риды выравнивали на соответствующие референсы: последовательности вируса Пуумала NC\_005224.1, NC\_005223.1, NC\_005225.1 для S, M и L сегментов, соответственно. Для сортировки и индексации BAM файлов использовали пакет samtools v1.15.1 [186]. Далее BAM файлы обрабатывали с помощью Lofreq v2.1.5 [187] (опция - call-indels) для получения VCF файлов. Затем проводили сборку консенсусов, используя bcftools consensus v1.13 [186]. На полученные последовательности снова выравнивали риды утилитой bowtie2 с опцией — local и далее производили поиск вариантов при помощи GATK HaplotypeCaller v4.2.0.0 [188], и снова осуществляли сборку консенсусных последовательностей. На последнем этапе было произведено третье выравнивание ридов на получившиеся консенсусы, для маскирования буквами N позиций с глубиной покрытия меньше 3 (использовалась утилита bedtools maskfasta v2.25.0). Получившиеся последовательности использовали в дальнейшем анализе.

Поиск вариантов проводили последовательно 2 раза, сначала с использованием Lofreq, затем с использованием HaplotypeCaller, поскольку программы по поиску вариантов не всегда включают присутствующие мутации в итоговую консенсусную последовательность.

Сборку первичных данных секвенирования нового поколения (NGS) проводили сотрудники лаборатории геномных исследований ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора Роев Герман Викторович и Хафизов Камиль Фаридович.

## **2.7 Анализ нуклеотидных последовательностей**

Для филогенетического анализа последовательности были предварительно выровнены с использованием алгоритма Muscle в программе MEGA X [189].

Построение филогенетических деревьев выполнялось с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием модели General Time Reversible (G+I) со значением Bootstrap 1000, с помощью программы MEGA X [189]. Полученные последовательности были дополнены последовательностями из базы данных GenBank.

Значения идентичности между последовательностями были рассчитаны с использованием программы MEGA X [189].

Визуализацию выборок попарного сравнения последовательностей из различных филогенетических групп проводили с использованием R, анализ проводил к.б.н., старший научный сотрудник научной группы разработки новых методов диагностики природно-очаговых заболеваний (РНМД ПОЗ) ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора Макенов Марат Темирханович.

Сканирование сходства и графики загрузочного сканирования для выбранных последовательностей были сгенерированы с использованием программы Simplot 3.5.1 (размер окна 1000, шаг 5) [190].

Среднее попарное генетическое расстояние для графика консервативности генома рассчитывали с использованием R, с размером окна 100 нуклеотидов и шагом 10 нуклеотидов. Анализ проводил к.б.н., старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Девяткин Андрей Андреевич.

## **2.8 Анализ географического происхождения последовательностей**

Расстояния между местами отлова рыжей полевки были рассчитаны с помощью сервиса Яндекс Карты.

Точки географического происхождения последовательностей вируса отмечали на картах в программе QGIS 3.28.0. Визуализацию проводил старший научный сотрудник научной группы РНМД ПОЗ ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора Макенов Марат Темирханович.



## 2.9 Статистическая обработка результатов метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Расчет диагностических характеристик (специфичности и чувствительности) с доверительной вероятностью 95% производился по методу Клоппера-Пирсона [191] с использованием онлайн калькуляторов [192,193] по формуле:

$$\left(1 + \frac{n - x + 1}{xF(1 - \alpha/2; 2x, 2(n - x + 1))}\right)^{-1} < p < \left(1 + \frac{n - x}{(x + 1)F(\alpha/2; 2(x + 1), 2(n - x))}\right)^{-1}$$

где  $x$  - количество положительных/отрицательных образцов среди  $n$  – количества истинно-положительных/отрицательных образцов,  $F(c; d1, d2)$  – квантиль 1 -  $\alpha$  из распределения Фишера со степенями свободы  $d1$  и  $d2$ ,  $p$  – диагностическая чувствительность/специфичность,  $\alpha$  при доверительной вероятности 95% равна 0,05.

### Глава 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1 Расследование летального случая геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Курской области

Заболеваемость ГЛПС зависит от численности популяции рыжих полевков, на которую, в свою очередь, влияют различные экологические факторы, и, поэтому, значительно варьирует год от года. По данным Роспотребнадзора, за последние десятилетия количество заболевших ГЛПС на территории Курской области значительно увеличилось. На рисунке 8 показана динамика регистрируемой заболеваемости в течение 20 лет, с 2000 по 2019 годы, согласно данным Роспотребнадзора [194].

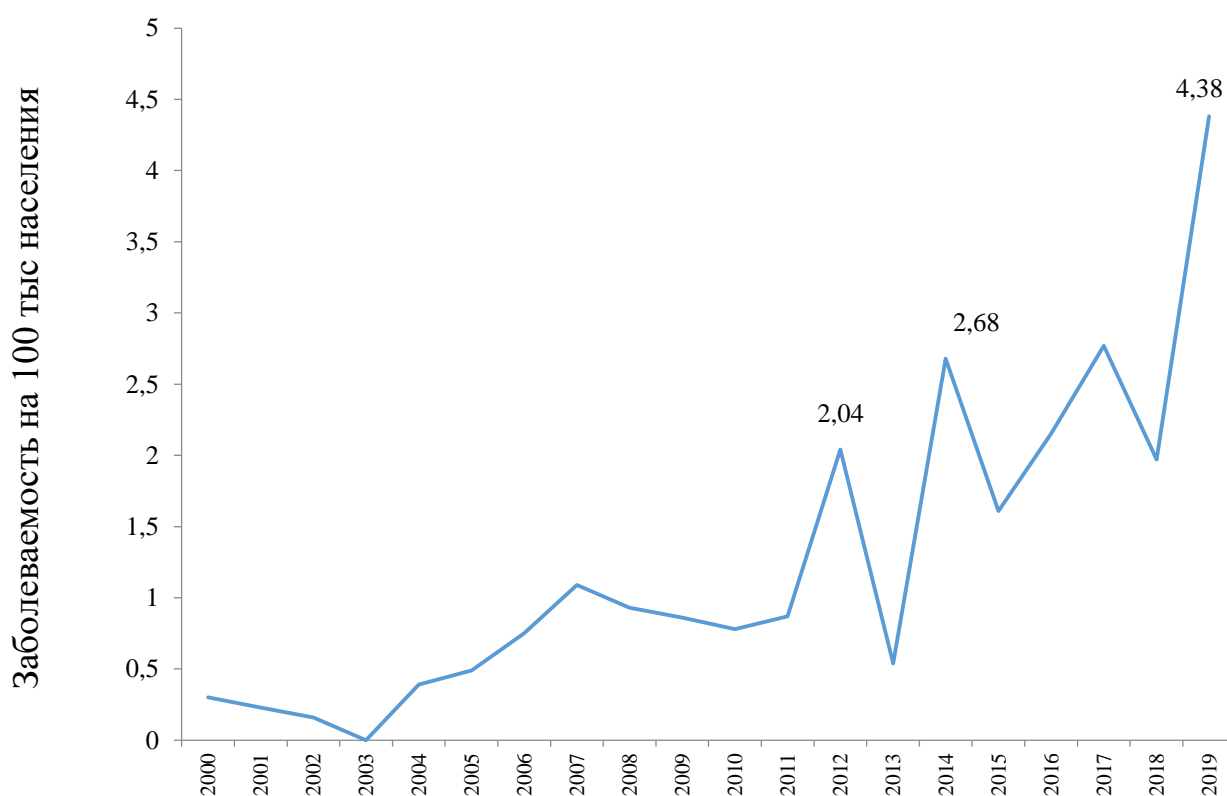


Рисунок 8 - Динамика заболеваемости ГЛПС в Курской области

В 2019 году на территории Курской области был зарегистрирован первый для этого региона смертельный случай ГЛПС-Пуумала [195].

Житель села Ивановское Рыльского района Курской области в возрасте 52 лет был госпитализирован в Курскую областную инфекционную клиническую больницу на шестой день болезни с жалобами на повышенную температуру, слабость, боли в животе, пояснице, уменьшение количества суточной мочи. В результате обследования ему был поставлен предварительный клинический диагноз: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, тяжелое течение, который впоследствии был серологически подтвержден. В сыворотке крови антитела к хантавирусу Пуумала (IgG+IgM) были обнаружены в титре 1/16000 методом иммунофлуоресценции. Несмотря на интенсивную комплексную терапию, состояние пациента постепенно ухудшалось, и на 7-й день госпитализации он скончался. При вскрытии были обнаружены: множественные кровоизлияния на коже туловища и конечностей, на серозных оболочках, в паренхиме легких; кровоизлияния, диапедезные кровотечения из слизистой желудка, тонкой кишки; субарахноидальное кровоизлияние по конвекситальной поверхности височных долей головного мозга. Отек мозга, альвеолярно-интерстициальный отек легких. Выраженная паренхиматозная дистрофия внутренних органов. Аутопсийный материал из почек, легких, сердца, печени и селезенки был изъят для дальнейшего анализа [195].

Антиген вируса Пуумала был обнаружен во всех образцах аутопсии иммуноферментным методом. Из этих образцов была выделена РНК и проанализирована с использованием метода ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией. Количественную оценку проводили в сравнении с калибраторами, как описано в пункте 2.4 раздела «Материалы и методы». Все образцы содержали РНК вируса Пуумала, при этом самая высокая вирусная нагрузка была обнаружена в селезенке, тогда как самая низкая - в печени и сердце. На рисунке 9 представлена концентрация РНК хантавируса Пуумала в пересчете на навеску материала в 100 мг.

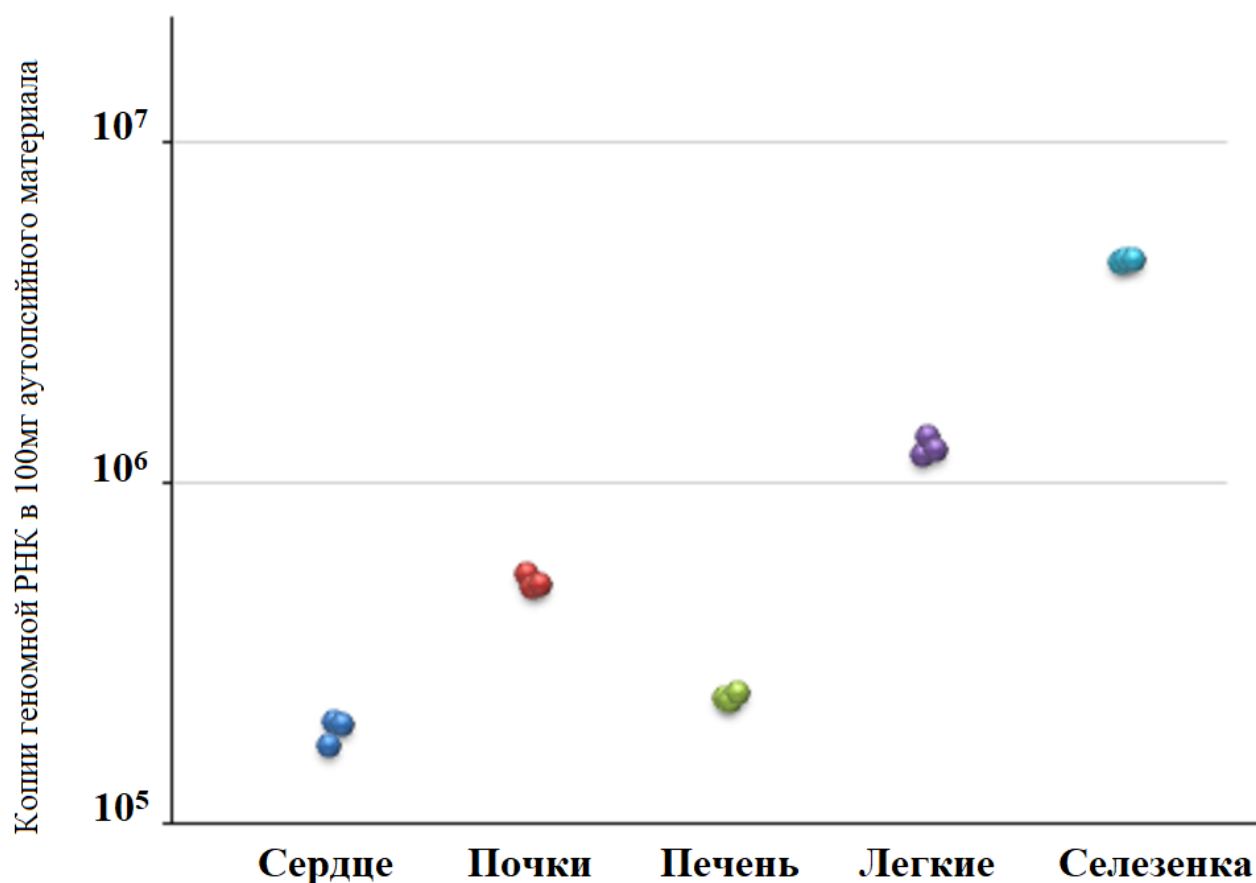


Рисунок 9 - Содержание РНК хантавируса Пуумала в органах погибшего пациента в пересчете на 100 мг аутопсийного материала

Наибольшее количество вирусной РНК было обнаружено в селезенке, а не в почках. По-видимому, это связано с тем, что хантавирусы активно размножаются в лейкоцитах, в том числе в дендритных клетках, которые мигрируют в регионарные лимфатические узлы и селезенку, где стимулируют пролиферацию и дифференцировку антигенспецифических лимфоцитов. Это предположение косвенно подтверждается высокой вирусной нагрузкой в лимфатических узлах, выявленной в случае инфекции хантавируса Добrava-Сочи, закончившейся летальным исходом [80]. Более того, активное размножение хантавируса Пуумала в моноцитах, макрофагах/гистиоцитах и дендритных клетках является характерным свойством тропизма хантавирусов и определяет тяжесть течения заболевания [196].

В результате эпидемиологического расследования летального случая были отловлены грызуны на территории предполагаемого заражения и исследованы на наличие антигена/антител к хантавирусам. Из суспензии легочной ткани грызунов, содержавших хантавирусные антиген или антитела, была выделена вирусная РНК для последующего секвенирования и филогенетического анализа.

### **3.2 Секвенирование нуклеотидных последовательностей**

К началу исследований на территории Российской Федерации было известно о распространении двух филогенетических линий: RUS и FIN [18,98]. Однако данные о распространении различных вирусных генотипов на территории России оставались фрагментарными и неполными.

Для изучения генетического разнообразия вируса Пуумала нами были собраны рыжие полевки из разных регионов Российской Федерации.

Фрагменты легочной ткани, а также настои сердец были исследованы на наличие хантавирусных антител. Далее положительные образцы были протестированы с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени с флуоресцентной детекцией (Таблица 9).

Рыжие полевки из Волоколамского района Московской области были протестированы методом «вложенной» ПЦР, амплифицирующей участок L гена [182]. Видовая принадлежность вируса подтверждена секвенированием, короткие последовательности депонированы в базу данных GenBank под номерами OQ503846, OQ503847, OQ503849, OQ503850.

Полевки с наибольшим количеством вирусной РНК по данным ОТ-ПЦР были отобраны из каждого места отлова для дальнейшего секвенирования. Методика амплификации и секвенирования была описана в пункте 2.5 раздела «Материалы и методы».

Таблица 9 - Результаты исследований мелких млекопитающих на инфицированность вирусом Пуумала

Территория отлова мелких млекопитающих	Число исследованных особей	Число особей с антителами к вирусу Пуумала	Число ПЦР-положительных особей	Число секвенированных образцов
Курская область	60	25	22/25	4
Ульяновская область	98	7	7/7	1
Саратовская область	44	14	14/14	3
Удмуртская Республика	32	9	9/9	1
Ивановская область	2	2	2/2	1
Московская область (Рузский район)	61	12	10/12	2
Пензенская область	54	28	27/28	2
Архангельская область	43	10	8/10	2
Тюменская область	110	10	9/10	5
Московская область (Волоколамский район)	82	Не исследованы	6/82	2
Всего	586	117	114/199	23

Полученные нуклеотидные последовательности хантавируса Пуумала были депонированы в базу данных GenBank, идентификационные номера, а также данные о месте и длине каждой нуклеотидной последовательности указаны в таблице 10.

Таблица 10 - Нуклеотидные последовательности РНК сегментов хантавируса  
Пуумала

Регион	Источник изоляции	Сегмент генома	GenBank ID	Длина, нт	Название геноизолята в GenBank
Курская область	Пациент	S	MZ580941	1786	Ivanovskoye_patient
	CG6568	S	MZ580942	1782	Ishutino
		M	MZ580943	3627	
		L	MZ580944	6405	
	CG6596	S	MZ580945	1783	Klishino
		M	MZ580946	3629	
		L	MZ580947	6405	
	CG6611	S	MZ580948	1785	Postoyalye_Dvory
		M	MZ580949	3628	
		L	MZ580950	6405	
	CG6639	S	MZ580951	1781	Klyukva
		M	MZ580952	3629	
		L	MZ580953	6405	
Ульяновская область	CG26	L	OP561825	6405	Dimitrovgrad/CG26
		M	OP561826	3629	
		S	OP561827	1780	
Саратовская область	CG6651	L	OP561828	6405	Saratov/CG6651
		M	OP561829	3629	
		S	OP561830	1773	
	CG6685	L	OP561831	6405	Saratov/CG6685
		M	OP561832	3629	
		S	OP561833	1773	
	CG6677	S	OP561818	1773	Saratov/CG6677
Удмуртская Республика	CG7690	L	OP561834	6405	Izhevsk/CG7690
		M	OP561835	3654	
		S	OP561836	1774	
Ивановская область	CG8035	L	OP561837	6405	Ivanovo/CG8035
		M	OP561838	3628	
		S	OP561839	1806	
Московская область (Рузский район)	CG8409	L	OP561840	6405	Moscow/CG8409
		M	OP561841	3629	
		S	OP561842	1780	
	CG8453	L	OP561843	6405	Moscow/CG8453
		M	OP561844	3629	
		S	OP561845	1780	

Продолжение таблицы 10

Пензенская область	CG8730	L	OP561846	6405	Penza/CG8730
		M	OP561847	3628	
		S	OP561848	1777	
	CG8764	S	OP561819	1777	Penza/CG8764
Архангельская область	CG8594	L	OP561849	6402	Arkhangelsk/CG8594
		M	OP561850	3079	
		S	OP561851	1790	
	CG8480	S	OP561820	1790	Arkhangelsk/CG8480
Тюменская область	CG8928	L	OP561852	6405	Tyumen/CG8928
		M	OP561853	3107	
		S	OP561854	1780	
	CG6542	S	OP561824	1781	Tyumen/CG6542
	CG6541	S	OP561823	1779	Tyumen/CG6541
	CG9267	S	OP561822	1780	Tyumen/CG9267
	CG8977	S	OP561821	1781	Tyumen/CG8977
Московская область (Волоколамский район)	CG57	S	OQ606918	1779	Volokolamsk/Mg57
	CG79	S	OQ606921	1763	Volokolamsk/Mg79

Последовательности всех трех сегментов были получены по меньшей мере для одного геноизолята из каждого региона. Некоторые образцы рыжих полевых, а также аутопсийный материал пациента, содержали небольшое количество вирусного материала, поэтому для них были получены нуклеотидные последовательности только S сегментов. Всего были получены нуклеотидные последовательности от 24 геноизолятов, в том числе одного пациента и 23 рыжих полевых (номера в базе данных GenBank MZ580941-MZ580953, OP561818-OP561854, OQ606918, OQ606921) [195,197,198]. Длины фрагментов указаны в таблице 10. К сожалению, нам не удалось получить нуклеотидную последовательность начала M сегмента РНК хантавирусов изолированных от рыжих полевых из Архангельской и Тюменской областей, которые представляют линию FIN, поэтому для геноизолятов Arkhangelsk/CG8594 Tyumen/CG8928 известна неполная кодирующая последовательность M сегмента.



### **3.3. Разработка методики выявления хантавируса Пуумала методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени**

#### **3.3.1. Анализ разработанной методики**

В начале данной работы, на основании последовательностей, депонированных в базе данных GenBank, были разработаны праймеры и зонд (Таблица 2) для тестирования биологического материала на наличие РНК хантавируса Пуумала. Применение этих олигонуклеотидов в формате ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией для исследования аутопсийного материала от погибшего пациента, а также для первичной оценки содержания РНК хантавируса Пуумала в легких рыжих полевок было описано в предыдущей главе.

При исследовании образцов рыжих полевок из Курской и Московской областей было обнаружено, что некоторые кривые накопления ДНК имели наклоненный вид, что могло бы объясняться наличием нуклеотидных замен в области амплификации. Анализ полученных в этой работе последовательностей S сегмента показал, что некоторые представители обнаруженной нами сублинии W-RUS действительно имеют нуклеотидные замены в зоне посадки разработанных нами праймеров и зонда, не представленные ранее в базе данных GenBank.

Таким образом, полученные нами результаты указали на необходимость выбора новых праймеров и зонда, чувствительных ко всем генетическим вариантам, циркулирующим на территории России.

При повторном выборе мишени для амплификации мы руководствовались следующими соображениями. Согласно литературным данным, наиболее консервативными сегментами генома вирусов являются S и L сегменты [103]. При этом, S сегмент наиболее широко представлен в базе данных GenBank, по-видимому благодаря наименьшей длине. Кроме того, S сегмент кодирует N белок, присутствующий в вирионе в наибольшем количестве копий. Следовательно, при амплификации вируса в клетках содержится наибольшее количество соответствующей мРНК, что способствует эффективному выявлению в

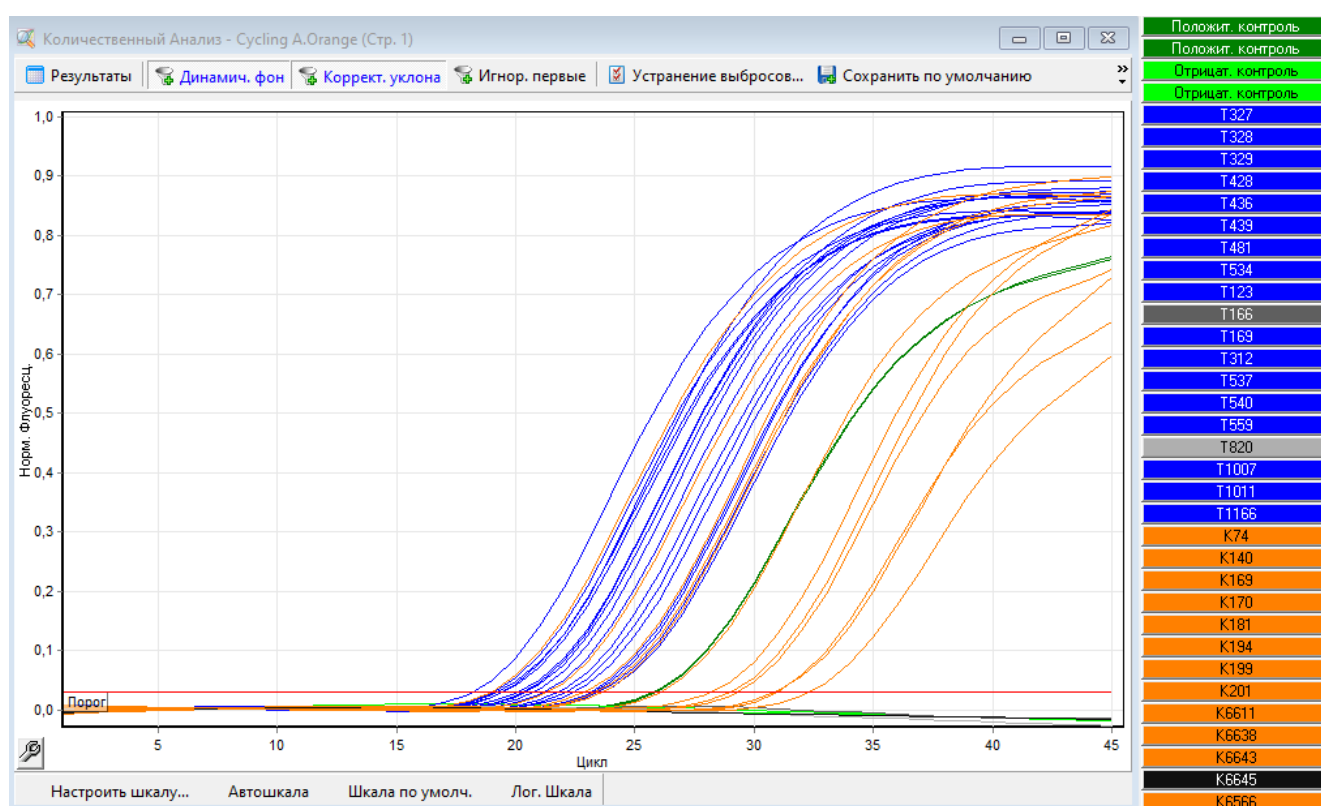
зараженном биологическом материале именно S сегмента. Кроме того, для вируса Пуумала известно об экспрессии дополнительного короткого неструктурного белка NSs в 90 аминокислотных остатков [98,104], закодированного в S сегменте. Благодаря перекрывающимся рамкам считывания белков N и NSs, соответствующая область обладает высокой консервативностью по сравнению с другими участками генома [103], что также делает ее удачной мишенью для детекции.

Новые праймеры и зонд были выбраны на основании последовательностей, депонированных в базе данных GenBank, а также новых последовательностей, полученных в этой работе. Они были предварительно протестированы на штаммах хантавируса Пуумала (ТКД/Уфа-97, CG/Казань-79, CG/13891 (Бельгия), Halnas 82-L20 (Швеция), H46/Уфа, P-360 (Саратов), CG1820 (Башкирия), Соткамо (Финляндия). В результате эксперимента, тест-система выявила все перечисленные образцы как положительные.

### 3.3.2. Диагностические характеристики новой методики

Для исследования диагностических характеристик данной методики ПЦР в реальном времени эксперименты проводили на образцах мелких млекопитающих, отловленных на территории регионов, в которых ранее были обнаружены представители сублиний W-RUS, Volga-RUS, и East-FIN. Для определения диагностической чувствительности и специфичности были отобраны 292 образца фрагментов легких грызунов с наличием хантавирусных антител из Курской, Московской, Воронежской, Тюменской, Архангельской и Саратовской областей, 92 образца без антител к хантавирусам из Московского региона, а также 300 образцов от мелких млекопитающих, отловленных на территории Республики Башкортостан [199], не проанализированных на наличие антител. В качестве метода сравнения была выбрана альтернативная «вложенная» ПЦР с использованием родоспецифичных праймеров, амплифицирующих участок L сегмента [182], с последующим секвенированием.

Метод ПЦР в реальном времени выявил 142 положительных образца. Референсный метод «вложенной» ПЦР выявил 145 положительных образцов, из которых 106 были подтверждены секвенированием как содержащие хантавирус Пуумала. В остальных 39 образцах секвенирование выявило другие хантавирусы: Добрава-Белград, Адлер, Тула, Сивис. Примечательно, что для одной из партий биоматериала (включающей образцы из Тюменской и Курской областей) было показано полное совпадение результатов исследования с помощью ОТ-ПЦР и референсного метода (Рисунки 10-11).



Синим и оранжевым обозначены положительные образцы из Тюменской и Курской областей, соответственно. Зеленым обозначены положительные и отрицательные контроли. Серым и черным обозначены отрицательные образцы.

Рисунок 10 - Кривые накопления ДНК для образцов из Тюменской и Курской областей

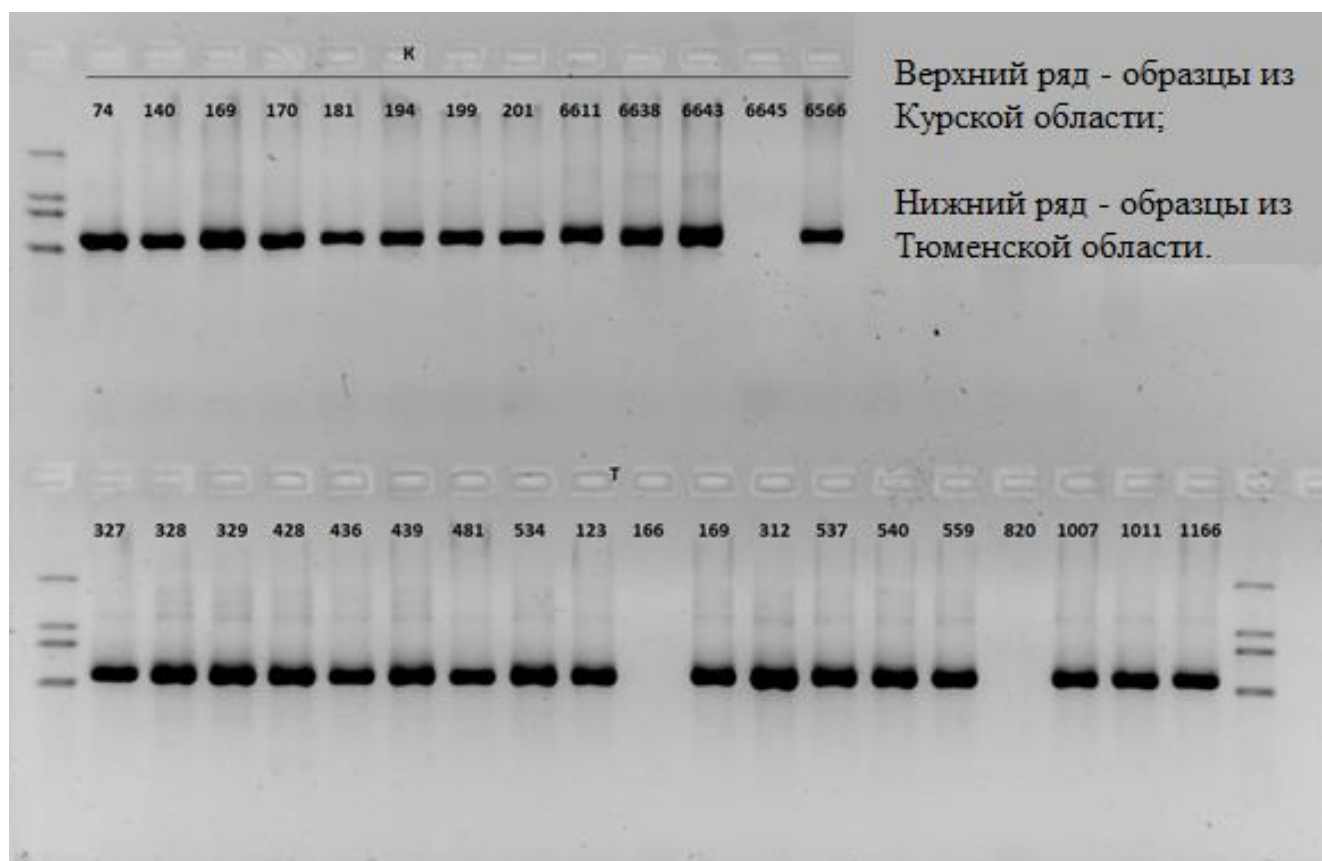


Рисунок 11 - Электрофорез после амплификации с помощью родоспецифичных праймеров образцов из Тюменской и Курской областей

Однако при исследовании других партий, часть образцов со значениями СТ превышающими 27 по методу ОТ-ПЦР, определялись как отрицательные методом сравнения (Таблица 11).

Таблица 11 - Сравнение результатов тестирования исследуемого метода ОТ-ПЦР и референсного метода «гнездовой ПЦР» с родовыми праймерами на *Orthohantavirus*

Регион	Всего проанализировано	Референсный метод		ОТ-ПЦР
		Наличие ампликона хантавируса	Хантавирус Пуумала (подтверждено секвенированием)	
Краснодарский край	34	19	0	0
Архангельская область	50	10	10	16

Продолжение таблицы 11

Саратовская область	127	52	48	74
Московская область (ПТЗ)	4	1	1	1
Воронежская область	26	9	4	4
Пензенская область	13	6	6	9
Курская область	18	16	16	17
Тюменская область	20	18	18	18
Республика Башкортостан	300	14	3	3
Московская область (Волоколамский район)	92	0	0	0
Всего	684	145	106	142

В результате проведенных экспериментов для 36 образцов было выявлено расхождение между исследуемым и референсным методами: согласно методу «вложенной» ПЦР они были интерпретированы как отрицательные, в то время как метод ОТ-ПЦР определил их как положительные.

По всей видимости, нарушение условий хранения некоторых партий биоматериала повлекло деградацию вирусной РНК. Поскольку первая стадия «вложенной ПЦР» предусматривает образование ампликона длиной около 450 нуклеотидов, фрагментация РНК внутриклеточными эндонуклеазами в процессе хранения значительно уменьшает чувствительность данного метода. В то же время, в ОТ-ПЦР амплифицируется короткий фрагмент, благодаря чему чувствительность в меньшей степени зависит от ненадлежащих условий хранения биоматериала.

При этом все 106 образцов, определенных методом «вложенной» ПЦР как содержащие РНК хантавируса Пуумала, были проанализированы путем постановки ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией и определены как положительные (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты тестирования метода ОТ-ПЦР в сравнении с референсным методом

Всего исследовано 684 образца		Результаты применения метода сравнения	
		положительные	отрицательные
Результаты применения метода ОТ-ПЦР	положительные	106	36
	отрицательные	0	542

Результаты секвенирования хантавирусной РНК и в исследуемых образцах были опубликованы в базе данных GenBank (Таблица 13).

Таблица 13 – Образцы с наличием РНК *Orthohantavirus*, обнаруженные методом «вложенной» ПЦР

	№	Вид грызуна	Референсный метод		ОТ-ПЦР
			Вирус	GenBank ID	Puumala
Архангельская область	151	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256518	31,28
	152	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256519	32,4
	158	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256520	28,16
	174	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256521	17,86
	175	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256522	17,31
	180	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256523	30,8
	182	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256524	19,28
	184	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256525	16,67
	190	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256526	18,71
	191	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256527	24,15
Саратовская область	2	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256528	20,59
	3	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256529	22,41
	10	Обыкновенная полевка	Тула	PQ256530	
	13	Обыкновенная полевка	Тула	PQ256531	
	14	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256532	25,27
	16	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256533	31,64
	17	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256534	22,71
	20	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256535	28,2
	21	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256536	28,5
	22	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256537	24,35
	27	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256538	27,55
	29	Малая лесная мышь	Пуумала	PQ256539	26,88

Продолжение таблицы 13

Саратовская область	30	Малая лесная мышь	Пуумала	PQ256540	32,01
	31	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256541	31,34
	34	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256542	26,09
	35	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256543	26,48
	36	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256544	27,39
	37	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256545	30,4
	39	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256546	29,22
	41	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256547	33,56
	42	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256548	30,37
	383	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256549	21,79
	395	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256550	20,11
	1253	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256551	23,48
	1307	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256552	19,32
	1353	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256553	29,56
	1357	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256554	18,33
	1379	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256555	20,73
	1380	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256556	31,23
	1381	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256557	22,05
	1382	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256558	24,05
	1431	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256559	20,71
	1433	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256560	19,05
	1434	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256561	16,35
	1477	Полевая мышь	Куркино	PQ256562	
	1480	Полевая мышь	Куркино	PQ256563	
	1823	Малая лесная мышь	Пуумала	PQ256564	17,63
	363	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256565	21,48
	366	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256566	22,16
	477	Малая лесная мышь	Пуумала	PQ256567	23,18
	7	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256568	23,28
	65	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256569	19,71
	72	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256570	23,6
	73	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256571	29,51
	74	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256572	21,84
	75	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256573	27,8
	76	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256574	22,51
	92	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256575	17,38
	100	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256576	25,58
	101	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256577	23,95
	102	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256578	23,42
	113	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256579	29,41
ПТЗ	13	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256580	35,17

Продолжение таблицы 13

Воронежская область	229	Обыкновенная полевка	Тула	PQ256581	-
	232	Обыкновенная полевка	Тула	PQ256582	-
	234	Обыкновенная полевка	Тула	PQ256583	-
	339	Обыкновенная полевка	Тула	PQ256584	-
	340	Обыкновенная полевка	Тула	PQ256585	-
	10044	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256586	32,45
	10048	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256587	22,68
	10067	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256588	21,27
	10076	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256589	24,28
Пензенская область	18	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256590	27,58
	19	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256591	17,97
	80	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256592	19,29
	115	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256593	28,17
	146	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256594	25,52
	157	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256595	24,19
Курская область	74	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256596	22,9
	140	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256597	28,18
	169	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256598	21,31
	170	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256599	29,3
	181	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256600	29,01
	194	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256601	26,09
	199	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256602	30,98
	201	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256603	32,33
	6611	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256604	23,38
	6638	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256605	23,67
	6643	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256606	18,96
	6566	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256607	30,91
	10	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256608	28,31
	14	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256609	22,64
	55	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256610	22,81
	109	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256611	29,06
Тюменская область	123	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256612	23,16
	169	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256613	20,75
	312	Красная полевка	Пуумала	PQ256614	19,06
	319	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256615	19,24
	327	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256616	22,1
	328	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256617	23,32
	329	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256618	19,22
	428	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256619	20,44
	436	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256620	21,17
	439	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256621	18,2



Продолжение таблицы 13

	481	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256622	23,7
	534	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256623	21,81
	537	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256624	23,55
	540	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256625	19,46
	559	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256626	22,42
	1007	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256627	20,11
	1011	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256628	19,44
	1166	Рыжая полевка	Пуумала	PQ256629	20,33
Республика Башкортостан	47	Бурозубка обыкновенная	Сивис	PP375544	
	69	Бурозубка обыкновенная	Сивис	PP375545	
	75	Бурозубка обыкновенная	Сивис	PP375546	
	76	Бурозубка обыкновенная	Сивис	PP375547	
	117	Бурозубка обыкновенная	Сивис	PP375548	
	127	Бурозубка обыкновенная	Сивис	PP375549	
	142	Полевка обыкновенная	Тула	PP375541	
	161	Полевка обыкновенная	Тула	PP375542	
	164	Полевка обыкновенная	Тула	PP375543	
	250	Бурозубка малая	Сивис	PP375550	
	256	Бурозубка обыкновенная	Сивис	PP375551	
	265	Рыжая полевка	Пуумала	PP375539	23,5
	268	Рыжая полевка	Пуумала	PP375540	25,44
	294	Рыжая полевка	Пуумала	PP375538	14,59
Краснодарский край	9	Кавказская мышь	Сочи	PQ256630	
	26	Кустарниковая полевка	Адлер	PQ256631	
	43	Кавказская мышь	Сочи	PQ256632	
	94	Кавказская мышь	Сочи	PQ256633	
	161	Кавказская мышь	Сочи	PQ256634	
	163	Кавказская мышь	Сочи	PQ256635	
	232	Кустарниковая полевка	Адлер	PQ256636	
Краснодарский край	273	Лесная мышь	Сочи	PQ256637	
	336	Кавказская мышь	Сочи	PQ256638	
	352	Кавказская мышь	Сочи	PQ256639	
	375	Кавказская мышь	Сочи	PQ256640	
	428	Кустарниковая полевка	Адлер	PQ256641	
	567	Кавказская мышь	Адлер	PQ256642	
	578	Кавказская мышь	Сочи	PQ256643	
	589	Кустарниковая полевка	Адлер	PQ256644	
	611	Кустарниковая полевка	Адлер	PQ256645	
	625	Кавказская мышь	Сочи	PQ256646	
	646	Кавказская мышь	Сочи	PQ256647	
	649	Кавказская мышь	Сочи	PQ256648	

Диагностические характеристики были рассчитаны с доверительной вероятностью 95%:

Диагностическая чувствительность (106 положительных образцов из 106 истинно-положительных) составила 100% (96,58-100%).

Диагностическая специфичность (542 отрицательных образца среди 578 истинно-отрицательных) составила 93,77% (91,48-95,60%).

Наличие хантавирусных антител во всех дискордантных образцах косвенно свидетельствует о том, что они не являются ложноположительными результатами, а иллюстрируют более высокую чувствительность ОТ-ПЦР по сравнению со «вложенной» ПЦР. Метод с амплификацией меньшего размера ампликона имеет преимущество в чувствительности для образцов, в которых РНК была фрагментирована вследствие работы внутриклеточных нуклеаз или замораживании/оттаивании материала в процессе хранения.

Кроме того, наличие достаточного количества отрицательных образцов в испытании позволило получить приемлемые значения диагностической специфичности.

### 3.3.3. Аналитические характеристики новой методики

#### *Аналитическая специфичность*

В ходе определения диагностических характеристик были получены отрицательные результаты на образцах различных видов мелких млекопитающих, в том числе рыжей полевки, полевки-экономки, красной полевки, обыкновенной полевки, обыкновенной куторы, желтогорлой мыши, домовый мыши, лесной мыши, полевой мыши, мыши-малютки, обыкновенной бурозубки, малой бурозубки [199].

Кроме того, аналитическую специфичность новых праймеров и зонда определяли путем проверки РНК/ДНК следующих организмов (Таблица 14) на наличие перекрестных реакций.

Таблица 14 – Тестирование аналитической специфичности

Организм	Результат тестирования
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Не обнаружен
<i>Bordetella pertussis</i>	Не обнаружен
<i>Candida albicans</i>	Не обнаружен
<i>Clostridium difficile</i>	Не обнаружен
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Не обнаружен
<i>Enterococcus faecalis</i> (vancomycin resistant)	Не обнаружен
<i>Escherichia coli</i>	Не обнаружен
<i>Haemophilus influenzae</i>	Не обнаружен
<i>Haemophilus influenzae</i>	Не обнаружен
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Не обнаружен
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Не обнаружен
<i>Listeria monocytogenes</i>	Не обнаружен
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	Не обнаружен
<i>Neisseria meningitidis</i> (Serogroup B)	Не обнаружен
<i>Proteus vulgaris</i>	Не обнаружен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружен
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Typhimurium	Не обнаружен
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Не обнаружен
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Не обнаружен
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Не обнаружен
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Не обнаружен
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Не обнаружен
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Не обнаружен
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Не обнаружен
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Не обнаружен
<i>Vibrio vulnificus</i>	Не обнаружен
<i>Shigella sonnei</i> Weldin	Не обнаружен
<i>Campylobacter jejuni</i>	Не обнаружен
Human adenovirus 41	Не обнаружен
Human hepatitis A virus	Не обнаружен
<i>Leptospira kirschneri</i> (серогруппа <i>Bataviae</i> )	Не обнаружен
<i>Leptospira borgpetersenii</i> (серогруппа <i>Tarassovi</i> )	Не обнаружен
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Не обнаружен
<i>Rickettsia sibirica subsp. sibirica</i>	Не обнаружен
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	Не обнаружен
<i>Rickettsia conorii subsp. conorii</i>	Не обнаружен
<i>Rickettsia raoultii</i>	Не обнаружен
<i>Borrelia miyamotoi</i>	Не обнаружен
<i>Orthoflavivirus flavi</i>	Не обнаружен

Продолжение таблицы 14

<i>Alphavirus chikungunya</i>	Не обнаружен
<i>Orthoflavivirus denguei</i>	Не обнаружен
<i>Orthoflavivirus zikaense</i>	Не обнаружен
<i>Orthoflavivirus japonicum</i>	Не обнаружен
<i>Orthoflavivirus nilense</i>	Не обнаружен
<i>Orthoflavivirus langatense</i>	Не обнаружен
<i>Orthoflavivirus powassanense</i>	Не обнаружен
<i>Orthohantavirus tulaense</i>	Не обнаружен
<i>Orthohantavirus seoulense</i>	Не обнаружен
<i>Orthohantavirus hantanense (Hantaan)</i>	Не обнаружен
<i>Orthohantavirus hantanense (Amur)</i>	Не обнаружен
<i>Orthohantavirus dobravaense (Sochi)</i>	Не обнаружен
<i>Orthohantavirus dobravaense (Kurkino)</i>	Не обнаружен
<i>Orthohantavirus seewisense</i>	Не обнаружен
Человек	Не обнаружен
<i>Clethrionomys glareolus</i>	Не обнаружен
<i>Apodemus flavicollis</i>	Не обнаружен
<i>Apodemus uralensis</i>	Не обнаружен
<i>Microtus arvalis</i>	Не обнаружен
<i>Neomys fodiens</i>	Не обнаружен
<i>Mus musculus</i>	Не обнаружен
<i>Sorex araneus</i>	Не обнаружен
<i>Apodemus agrarius</i>	Не обнаружен
<i>Microtus oeconomus</i>	Не обнаружен
<i>Micromys minutus</i>	Не обнаружен
<i>Sorex minutus</i>	Не обнаружен
<i>Clethrionomys rutilus</i>	Не обнаружен

В результате эксперимента, во всех образцах отсутствовало увеличение уровня сигнала флуорофора, поэтому все исследованные образцы были интерпретированы как отрицательные.

Таким образом, неспецифических перекрестных реакций с другими вирусами и бактериями, а также биологическим материалом *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus oeconomus*, *Clethrionomys rutilus*, *Microtus arvalis*, *Neomys fodiens*, *Mus musculus*, *Apodemus uralensis*, *Apodemus agrarius*, *Micromys minutus*, *Sorex araneus*, *Sorex minutus* и человека обнаружено не было.

### *Аналитическая чувствительность*

Аналитическая чувствительность метода была проверена в ходе испытаний на модельных образцах плазмы крови человека и гомогената органов грызунов. Модельные образцы контаминировали контролем, содержащим РНК целевого фрагмента амплификации в известной концентрации. Экспериментальным путем устанавливали концентрацию контроля, соответствующую пределу обнаружения при различных способах экстракции (Таблица 15).

Таблица 15 – Аналитическая чувствительность

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий /мл
Плазма венозной крови	100	«РИБО-преп»	$1 \times 10^3$
	200	«МАГНО-сорб»	$2,5 \times 10^3$
	1000		$5 \times 10^2$
Гомогенат легких грызунов	100	«РИБО-преп»	$5 \times 10^3$
	100	«МАГНО-сорб»	$5 \times 10^3$

Таким образом, нами были разработаны праймеры и флуоресцентно-меченый зонд для определения РНК вируса Пуумала путем проведения ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

В ходе проведенных исследований чувствительность выбранных праймеров и зонда была экспериментально подтверждена на биоматериале из различных регионов, где была показана циркуляция известных на территории России филогенетических сублиний вируса, что делает применение данного метода перспективным на всей территории страны.

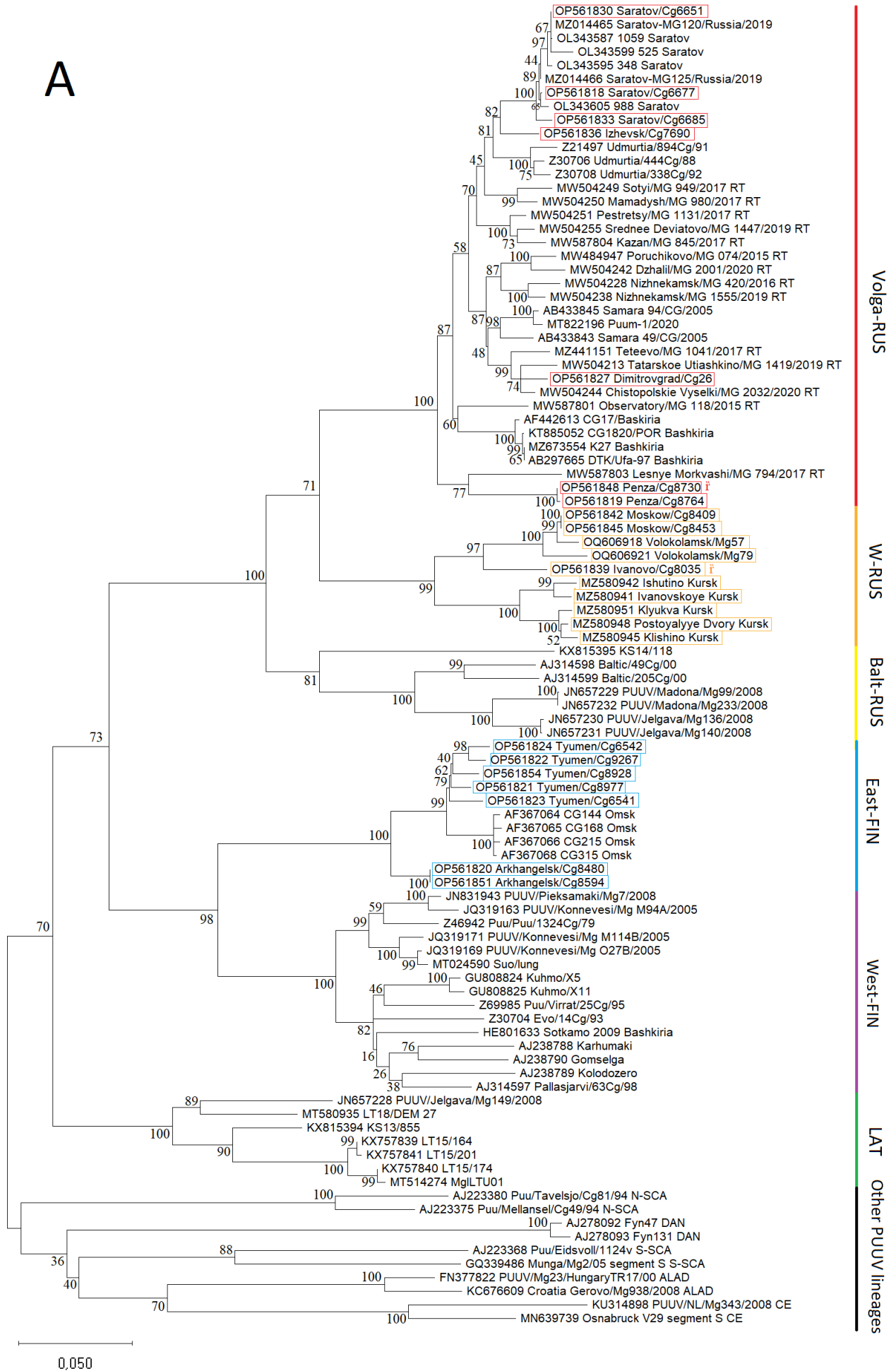
На основании испытанных олигонуклеотидов на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора ведется разработка коммерческого набора реагентов для использования в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на ГЛПС, а также для скрининговых исследований грызунов.

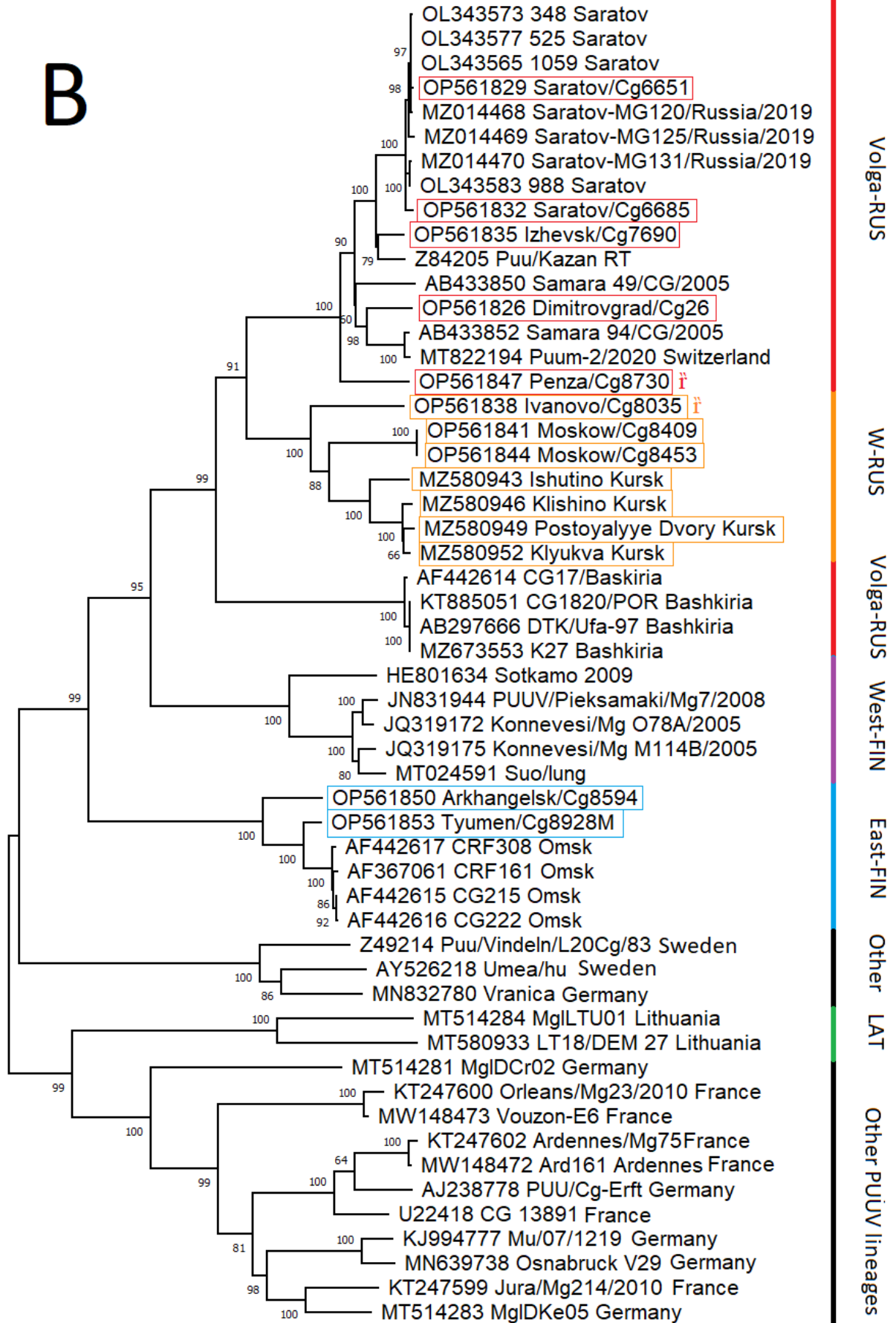
### **3.4. Анализ полученных последовательностей**

#### **3.4.1 Филогенетический анализ**

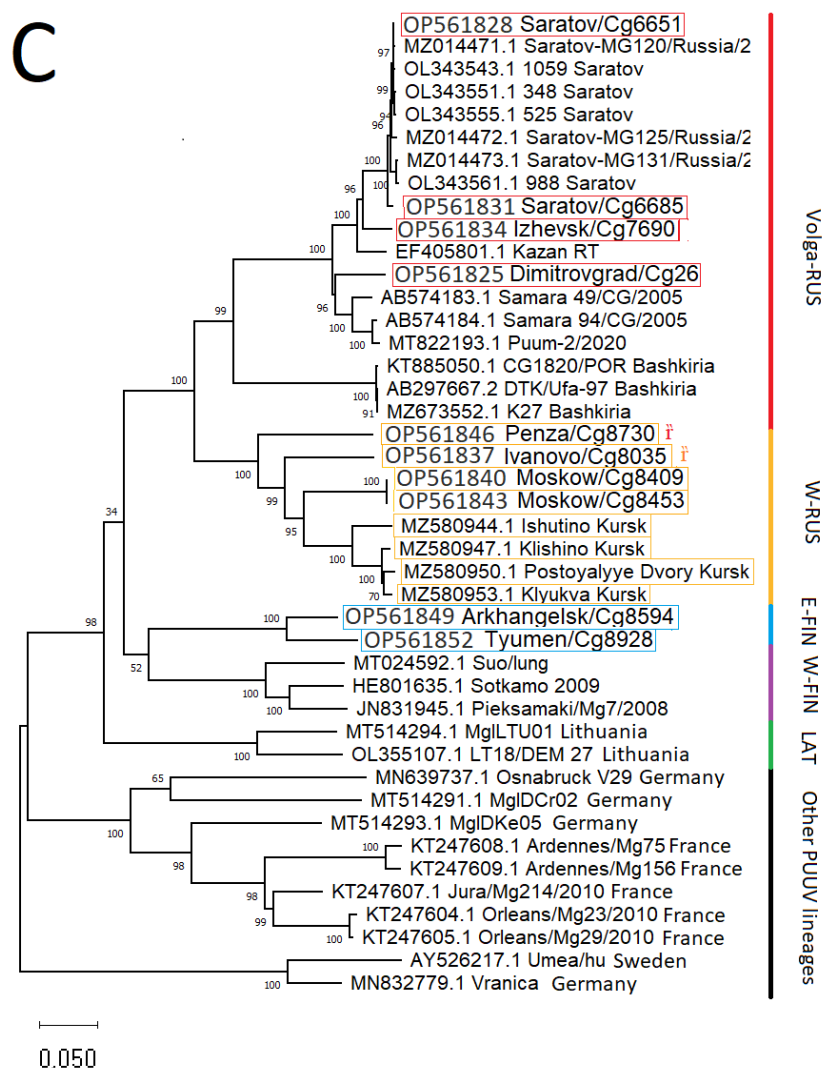
Для проведения филогенетического анализа полученные нуклеотидные последовательности были дополнены представителями других генетических линий. Линии RUS, FIN и LAT были представлены наиболее подробно, они наиболее филогенетически близки друг к другу, поскольку рыжие полевки, являющиеся носителями этих трех линий вируса, по-видимому, расселились из Восточного рефугия, существовавшей где-то между Карпатским горным хребтом и побережьем Балтийского моря во время ледникового периода [21]. Остальные генетические линии хантавируса Пуумала находятся вне фокуса нашего внимания в этом исследовании, поэтому они были включены в филогенетический анализ как внешняя группа и обозначены как “other”. На рисунке 12 представлены филогенетические деревья S, M и L сегментов геноизолятов хантавируса Пуумала.

A



**B**





Филогенетические деревья: А – на основании полной последовательности OPC S сегмента (1302 нуклеотида); В – на основании частичной последовательности OPC М сегмента (2923 нуклеотида, соответствует 525-3447 нуклеотидам OPC); С - на основании частичной последовательности OPC L сегмента (6405 нуклеотидов, соответствует 5-6409 нуклеотидам OPC). Линия RUS делится на три сублинии: Volga-RUS, обозначена красным, W-RUS, обозначена оранжевым; Balt-RUS, обозначена желтым. Линия FIN разделена на две сублинии: East-FIN, обозначена синим цветом, и West-FIN, обозначена фиолетовым цветом. Линия LAT обозначена зеленым цветом. Остальные линии обозначены черным цветом. Последовательности, полученные в этом исследовании, выделены рамкой. ï - реассортантные геноизоляты. Построение филогенетических деревьев выполняли методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием модели General Time Reversible (G+I) со значением Bootstrap 1000, в программе MEGA X [189]

Рисунок 12 - Филогенетические деревья

Дендрограмма по S-сегменту (Рисунок 12А) включает представителей всех восьми филогенетических линий и показывает, что филогенетическое дерево хантавируса Пуумала разделено на две большие клады, на одной из которых находятся линии LAT, FIN и RUS, а на другой - все оставшиеся европейские линии, что подтверждает результаты предыдущих исследований [21].

Деревья по сегментам S и L имеют схожую топологию. Различия между ними выражаются в длине ветвей и принадлежности отдельных последовательностей к кладам. При этом филогенетическое дерево, основанное на последовательностях M сегмента, характеризуется другим характером ветвления линий в целом, что согласуется с результатами предыдущих исследователей [19]. Это лишний раз подтверждает тезис о том, что M-сегмент наиболее часто подвержен событиям реассортации у хантавирусов [20].

За последние годы были накоплены обширные сведения о геномных последовательностях хантавируса Пуумала на территории России. В частности, в данной работе опубликованы последовательности от 24 геноизолятов: для 16 геноизолятов были получены последовательности всех сегментов, кроме того для аутопсийного материала пациента и 7 геноизолятов из рыжих полевков были получены только S сегментные последовательности. Расширение выборки последовательностей позволяет более подробно описать генетическое разнообразие вируса. В связи с этим мы считаем целесообразным рассматривать отдельные сублинии в составе генетических линий RUS и FIN, циркулирующих на территории России.

Предыдущие исследователи выделяли генетические линии хантавируса Пуумала на основании топологии S сегментных дендрограмм [18,19], по-видимому, из-за наиболее полной представленности их в базе данных GenBank. В данном исследовании, филогенетическое дерево, построенное на основании S сегмента, позволяет выделить в пределах генетической линии RUS три отдельных сублинии: Volga-RUS, Balt-RUS, W-RUS, и в пределах генетической линии FIN - две ветви: East-FIN и West-FIN (Рисунок 12А).

### 3.4.2 Анализ вариабельности нуклеотидных и аминокислотных последовательностей хантавируса Пуумала

#### *Сравнение идентичности гена S сегмента в разных сублиниях*

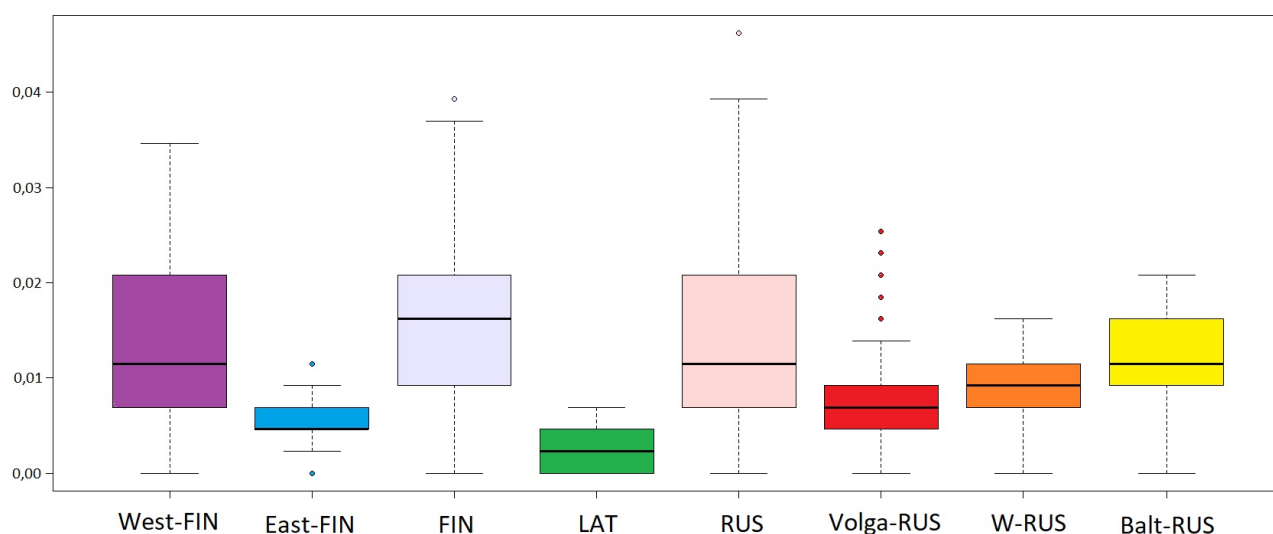
Значения идентичности между сублиниями в кладе, содержащей ветви RUS, FIN и LAT представлены в таблице 16. Расчет производили для последовательностей, обозначенных на филогенетическом дереве S сегмента, согласно их принадлежности к выделенным в этом исследовании сублиниям (Рисунок 12А), а также для соответствующих аминокислотных последовательностей. Для анализа был выбран именно S сегмент, поскольку в базе данных GenBank содержится больше полных рамок считывания нуклеопротеина, закодированного в S сегменте, по сравнению с количеством нуклеотидных последовательностей M и L сегментов аналогичной длины. Из-за этого дендрограммы M и L сегментов значительно менее подробные. В частности, это выражается в том, что сублиния Balt-RUS в них совсем не представлена. Кроме того, на основе S сегмента проводили выделение генетических линий и сублиний.

Таблица 16 - Идентичность полной кодирующей последовательности S сегмента (нижняя треугольная матрица, нижнее значение по главной диагонали), и последовательности нуклеопротеина (верхняя треугольная матрица, верхнее значение по главной диагонали) внутри и между сублиниями

Аминокислотная/ нуклеотидная идентичность, %	Volga-RUS (37 послед.)	W-RUS (8 послед.)	Balt-RUS (7 послед.)	East-FIN (11 послед.)	West-FIN (15 послед.)	LAT (7 послед.)
Volga-RUS	97.47-100/ 92.93-100	96.77-98.85	95.39-98.16	95.39-97.47	94.01-97.7	95.16-97.24
W-RUS	86.57-90.17	98.38-100/ 90.55-100	97.24-98.39	96.77-97.7	94.93-97.93	96.77-97.93
Balt-RUS	85.88-88.86	85.57-88.88	97.93-100/ 87.92-100	96.31-97.7	94.70-97.93	96.31-97.93
East-FIN	84.57-86.86	85.17-87.42	85.34-87.39	98.85-100/ 94.24-100	96.08-99.08	97.00-97.93
West-FIN	84.27-86.87	84.33-86.77	83.86-86.73	87.02-89.55	96.54-100/ 91.01-100	95.39-97.93
LAT	84.38-87.19	84.93-87.27	84.49-86.94	85.93-87.57	84.77-88.23	99.31-100/ 89.77-100

Несмотря на филогенетическое разделение, процентное содержание идентичных нуклеотидов и аминокислот внутри сублиний и между ними не

позволяет установить четкие критерии для разграничения сублиний. В частности, вариабельность внутри линии Balt-RUS превышает минимальные различия между некоторыми сублиниями, которая подразумевает возможность дальнейшего дробления этой сублинии, что подтверждается мнениями некоторых исследователей [200]. На основании этих последовательностей были рассчитаны попарные дистанции между последовательностями внутри генетических линий, а также выделенных нами сублиний (Рисунок 13).



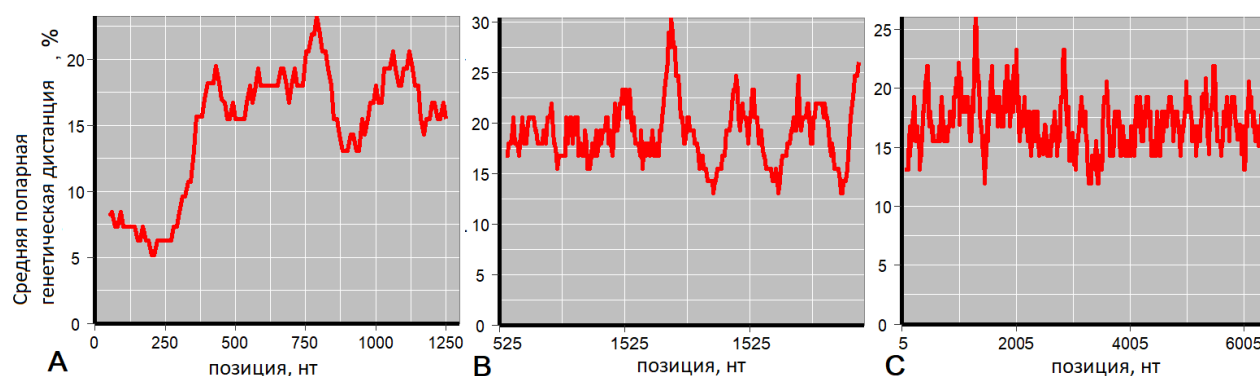
По оси ординат обозначено количество замен на сайт.

Рисунок 13 – Бокс-плот выборки попарных дистанций между аминокислотными последовательностями S сегмента в пределах генетических линий RUS, FIN, LAT, а также внутри сублиний, входящих в их состав

Генетическая линия LAT формирует очень компактную группу аминокислотных последовательностей, несмотря на то, что она включает последовательности, относящиеся к территории трех стран. Вариабельность внутри генетических линий RUS и FIN больше, чем внутри линии LAT, как по отличиям максимально отдаленных друг от друга последовательностей внутри этих генетических линий, так и по значению медианы, что оправдывает их разделение на отдельные сублинии.

### *Вариабельность различных частей генома хантавируса Пуумала*

С учетом последовательностей, полученных в этом исследовании, был также проведен анализ вариабельности различных частей генома (Рисунок 14), путем расчёта средней генетической дистанции для каждой из возможных пар анализируемых последовательностей. Для анализа были взяты выравнивания, использованные ранее для построения филогенетических деревьев.



А – Полная кодирующая последовательность сегмента S длиной 1302 нуклеотида, В – частичная кодирующая последовательность сегмента М, соответствующая 525-3447 нуклеотидам ОРС, С - частичная кодирующая последовательность сегмента L соответствующая 5-6409 нуклеотидам ОРС. Среднее попарное генетическое расстояние рассчитывали с размером окна 100 нуклеотидов и шагом 10 нуклеотидов.

Рисунок 14 - График консервативности генома

Наряду с частыми событиями реассортации по М сегменту (обсуждаемыми далее в разделе 3.5), этот анализ также показывает наибольшую вариабельность М сегмента по нуклеотидному составу, что свидетельствует о важности изменчивости гликопротеинов в вирусной эволюции для избегания иммунного ответа [20].

Наиболее консервативная часть генома приходится на начало кодирующей последовательности S сегмента, что подтверждает данные предыдущих исследований [103]. В этой области расположена перекрывающаяся рамка считывания неструктурного белка NSs, экспрессирующегося у хантавируса

Пуумала [98,104]. Наличие дополнительной рамки считывания препятствует закреплению в отборе нуклеотидных мутаций.

### 3.4.3 Географическое распространение представителей новых сублиний

Генетические варианты хантавируса Пуумала, описанные в этом исследовании как принадлежащие к различным сублиниям, разделяются не только филогенетически, но и циркулируют на довольно отдаленных территориях. Поэтому для наименования сублиний принимался в расчёт географический критерий. Места изоляции генетических вариантов, полученных в этом исследовании показаны в таблице 17.

Таблица 17 - Места изоляции генетических вариантов хантавируса Пуумала

Название геноизолята в GenBank	Широта	Долгота
Ivanovskoye	51,606222	34,947989
Ishutino	51,431667	34,806341
Klishino	52,265785	35,215226
Postoyalyye_Dvory	51,538946	35,821753
Klyukva	51,712546	36,348929
Dimitrovgrad/Cg26	54,191129	49,482685
Saratov/Cg6651	51,539684	45,957775
Saratov/Cg6685	51,804299	45,783791
Saratov/Cg6677	51,773315	45,621112
Izhevsk/Cg7690	57,020818	53,855958
Ivanovo/Cg8035	56,855533	41,915639
Moskow/Cg8409	55,667963	36,528169
Moskow/Cg8435	55,667963	36,528169
Volokalamsk/Mg57	55,940119	36,150632
Volokalamsk/Mg79	56,121205	35,893624
Arkhangelsk/Cg8594	60,894834	43,217044
Arkhangelsk/Cg8480	60,894834	43,217044
Penza/Cg8730	52,462065	44,198648
Penza/Cg8764	52,462065	44,198648

Продолжение таблицы 17

Tyumen/Cg6542	57,258725	65,129592
Tyumen/Cg6541	56,973581	65,074813
Tyumen/Cg9267	57,625918	66,002593
Tyumen/Cg8977	57,571226	67,176107
Tyumen/Cg8928	58,153046	68,552603

Для того, чтобы визуализировать географическое происхождение известных последовательностей хантавируса Пуумала, мы нанесли соответствующие точки на карту (Рисунок 15). На ней показаны местоположения выделения геноизолятов вируса Пуумала, принадлежащих к линиям LAT, FIN и RUS, которые мы нашли в базе данных GenBank с полной кодирующей последовательностью S сегмента. Представители других линий не являлись фокусом внимания этого исследования, и их представители были выбраны случайным образом. Каждому изоляту на карте соответствует одна точка, однако в некоторых случаях одной и той же географической точке соответствует несколько генетических вариантов.



Черной рамкой обозначены точки, соответствующие этому исследованию. Цветовая маркировка соответствует филогенетическим деревьям на рисунке 12. Volga-RUS обозначена красным, W-RUS - оранжевым; Balt-RUS - желтым. Линия FIN разделена на две сублинии: East-FIN обозначена синим, и West-FIN - фиолетовым. Линия LAT обозначена зеленым цветом. Остальные линии – серым.

Рисунок 15 - Карта точек изоляции хантавируса Пуумала с полной кодирующей последовательностью S сегмента

На этой карте показаны только изоляты с полноразмерными кодирующими последовательностями S сегмента. Короткие нуклеотидные последовательности, принадлежащие представителям линии LAT на западной Украине [169,201], линии FIN в Республике Татарстан [28] и Тюменской области [10], представителям линии RUS в Мордовии [12], Оренбургской [10] и Московской [177] областях, а также другие, не достигающие длины полной рамки считывания нуклеопротеина, здесь не обозначены.



Таким образом, рисунок 15 позволяет визуально оценить примерные зоны расположения исследованных сублиний. Можно заметить, что большинство рассмотренных сублиний (Volga-RUS, W-RUS, West-FIN, East-FIN) занимают отдельную, довольно обширную территорию. Исключением являются сублиния Balt-RUS и линия LAT, чьи зоны циркуляции заметно перекрываются.

### **3.5 Генетическая линия RUS**

Как уже говорилось ранее, в этой работе мы рассматриваем линию RUS как состоящую из трех больших отдельных ветвей, которым были даны названия: Volga-RUS, Balt-RUS, W-RUS.

Первая ветвь была обозначена здесь как Volga-RUS, потому что ее представители циркулируют на территории Поволжья. Она содержит последовательности из Саратовской, Ульяновской и Самарской областей, Удмуртской Республики, Республики Татарстан и Республики Башкортостан [202]. Исторически эта линия была обнаружена самой первой [19,23]. Кроме того, она наиболее полно представлена в базе данных GenBank, поскольку на Приволжский федеральный округ приходится самая высокая заболеваемость ГЛПС-Пуумала (более 18 заболевших на 100 000 населения [70]), что, по-видимому, повышало актуальность исследований [4,10].

Вторая сублиния была обозначена здесь как Balt-RUS, поскольку ее представители были изолированы на побережье Балтийского моря. К настоящему времени для этой сублинии известно только 8 полных кодирующих последовательностей сегмента S, и ни одной полной последовательности для M и L сегментов. Два представителя Balt-RUS обнаружены на территории Эстонии [18], еще шесть были обнаружены на территории Латвии и Польши [19]. Эта группа представлена только на дереве S сегмента, топология ее расположения на деревьях других сегментов не может быть рассмотрена.

Еще одна ветвь, ранее неизвестная, была обнаружена на территории Курской, Московской и Ивановской областей. Мы дали ей название W-RUS (Western-RUS),

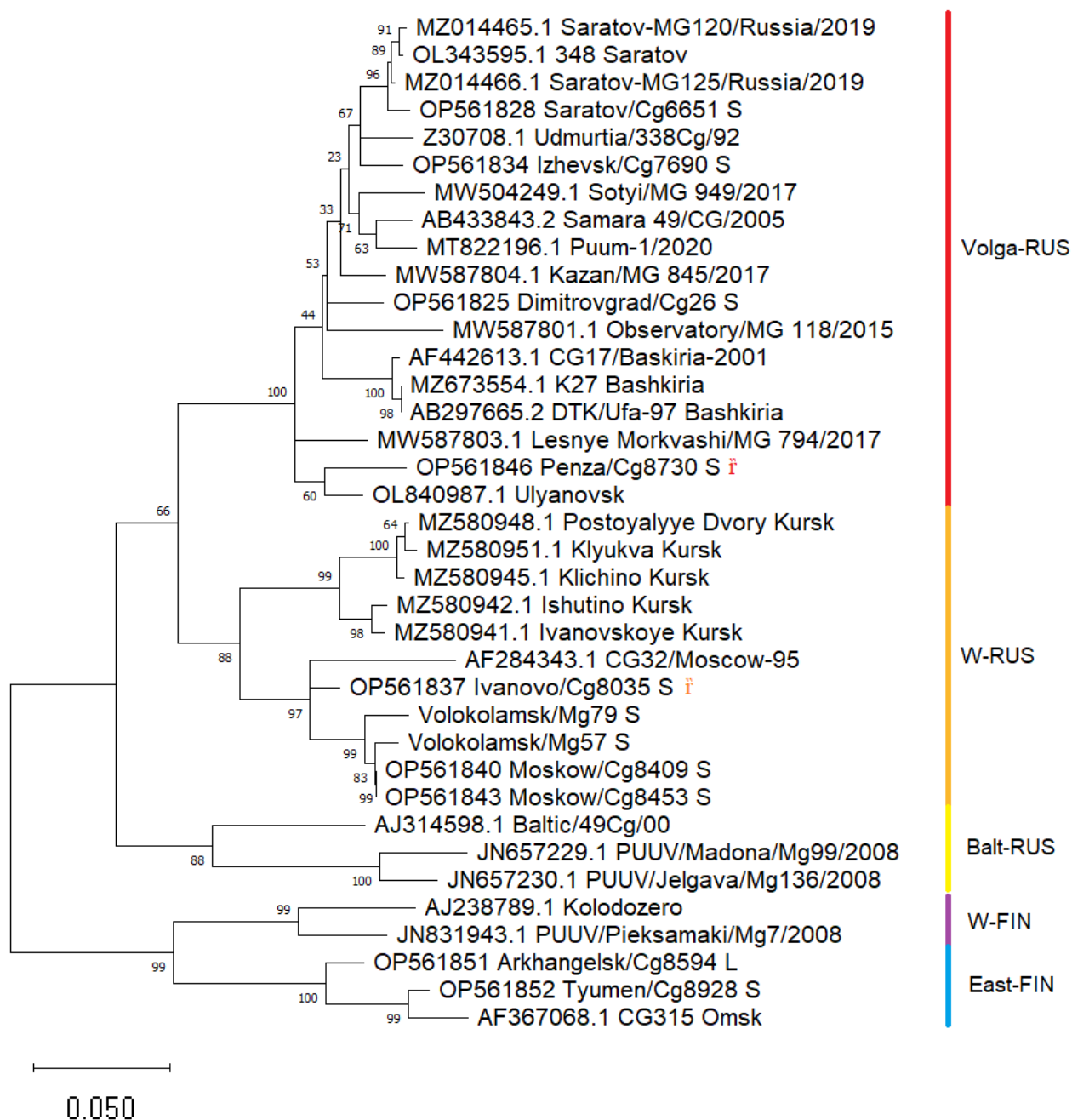
поскольку представители ее обнаружены неподалеку от западной границы России. По результатам этой работы получены и опубликованы в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности 10 геноизолятов с полными рамками считывания S сегмента: геноизolat от пациента, описанного в главе 3.1, 4 геноизолята от полевок, отловленных на территории Курской, 4 – в Московской и 1 - в Ивановской областях.

### 3.5.1 Сублиния W-RUS

К линии W-RUS принадлежат геноизоляты Ishutino, Klishino, Postoyalyye\_Dvory, Klyukva, Ivanovskoye\_patient, Ivanovo/CG8035 [195], Moscow/CG8409, Moscow/CG8435 [197], Volokolamsk/Mg57, Volokolamsk/Mg79 [198], а также, согласно филогении по L сегменту, геноизolat Penza/CG8730. Принадлежность Penza/CG8730 к разным сублиниям, на основании дендрограмм по разным сегментам, свидетельствует о том, что он появился в результате реассортации, что будет подробнее рассмотрено далее.

Кроме того, в базе данных GenBank имеется последовательность геноизолята Moscow-95. Она имеет длину немногим более 700 нуклеотидов, поэтому не была обозначена на Рисунке 12. РНК хантавируса Пуумала была выделена от рыжей полевки во время вспышки ГЛПС на территории Егорьевского района Московской области. В соответствующей публикации она была описана как новый генотип вируса Пуумала, названный «Москва» [177].

На рисунке 16 показано филогенетическое дерево на основании выравнивания по короткому участку S сегмента длиной 676 нуклеотидов, соответствующему кодирующей последовательности Moscow-95. Представители линии FIN взяты в качестве внешней группы.



r - реассортантные геноизоляты. Для построения дерева использовали модель Tamura 3 parameter model с параметром Gamma Distributed With Invariant Sites (G+I).

Рисунок 16 - Филогенетическое дерево, построенное на основании выравнивания S сегмента длиной 676 нуклеотидов (1-676 нуклеотиды гена нуклеопротеина)

Согласно филогенетическому анализу, генетический вариант Moscow-95 также принадлежит к ветви W-RUS. Таким образом, сведения о том, что в Московской области циркулирует новый генотип хантавируса Пуумала были

опубликованы еще в 2000 году. Однако, долгое время этот вопрос не изучался и нами впервые получены последовательности всех сегментов, включая полные кодирующие последовательности для S и M сегментов и более 98% кодирующих последовательностей L сегмента представителей этой сублинии.

В первом приближении для хантавирусов характерно, что количество нуклеотидных отличий между генетическими вариантами вируса увеличивается по мере их географического удаления [172]. Однако в литературе описаны и исключения из этого общего правила. Так, на близких территориях находили микроочаги как одной генетической линии вируса с уровнем нуклеотидных различий до 5% по S сегментным последовательностям [167], так и разные генетические линии [19,21,168].

В представленной работе мы также обнаружили несоответствие между генетической и географической дистанцией для некоторых генетических вариантов. Здесь рассмотрено соотношение нуклеотидных различий и расстояния на примере последовательностей из Курской области.

Рыжие полевки, которые послужили источником выделения РНК хантавируса Пуумала для дальнейшего секвенирования, были собраны в разных районах области, на достаточном удалении друг от друга. Расстояние между точками сбора достигало 112 км (Рисунок 17).



Рисунок 17 - Расположение точек изоляции генетических вариантов хантавируса Пуумала на территории Курской области

Изоляты вирусной РНК, полученные от рыжей полевки, были обозначены в базе данных GenBank в соответствии с названиями сел, где были отловлены грызуны: Ishutino, Klishino, Postoyalye\_Dvory, и Klyukva. Геноизолят от умершего пациента был обозначен как Ivanovskoye\_patient. К сожалению, из-за ограниченного количества и деградации секционного материала от пациента, был секвенирован только S сегмент инфицировавшего его вируса.

Эти вирусные геноизолаты образовали отдельную филогенетическую ветвь, по всем трем сегментам (Рисунок 12). Филогенетическая обособленность этих последовательностей хорошо согласуется с близким территориальным расположением точек их изоляции (на территории Курской области), а также большим расстоянием от мест сбора других штаммов.

Эта клада в свою очередь разделяется на две ветви (Рисунок 12, Рисунок 16). На одной из них расположены нуклеотидные последовательности вируса от

пациента и от полевки из соседнего села Иштутино. На другой ветви располагаются три геноизолята из других локаций.

Несмотря на географическую близость, нуклеотидные отличия последовательностей из Курской области превышают 5% по последовательности S сегментов. Примечательно, что геноизоляты из сел Клишино, Постоялые Дворы и Клюква очень близки друг к другу (различия менее 2%) при достаточно большой географической удаленности. В целом, среди новых последовательностей прямой корреляции между их генетическими различиями и географическим расстоянием не обнаружено (Таблица 18).

В частности, расстояния от Постоялых Дворов до Клишино и от Постоялых Дворов до Иштутино составляют 100 км и 71 км, соответственно. В то же время, различия между последовательностями соответствующих вирусных пар составляют 1,1% и 4,6% соответственно.

Таблица 18 - Генетические различия между нуклеотидными последовательностями геноизолятов из разных точек в Курской области

Геноизоляты		Ishutino	Klishino	Postoyalyye Dvory	Klyukva
Ivanovskoye Patient	Различия (%)	2,18	5,2	4,97	5,15
	Расстояние (км)	22	75	106	98
Ishutino	Различия (%)		4,71	4,59	4,66
	Расстояние (км)		96	71	112
Klishino	Различия (%)			1,06	1,57
	Расстояние (км)			100	99
Postoyalyye Dvory	Различия (%)				1,29
	Расстояние (км)				10

\*Названия геноизолятов соответствуют месту их географической принадлежности.

Такие различия могли возникнуть в результате существования на этой территории отдельных микропопуляций рыжих полевок, длительное время эволюционировавших отдельно.

Территория Курской области лежит на юго-западных склонах Среднерусской возвышенности, холмистый ландшафт которой расчленена долинами рек, множеством балок и оврагов (Рисунок 18).

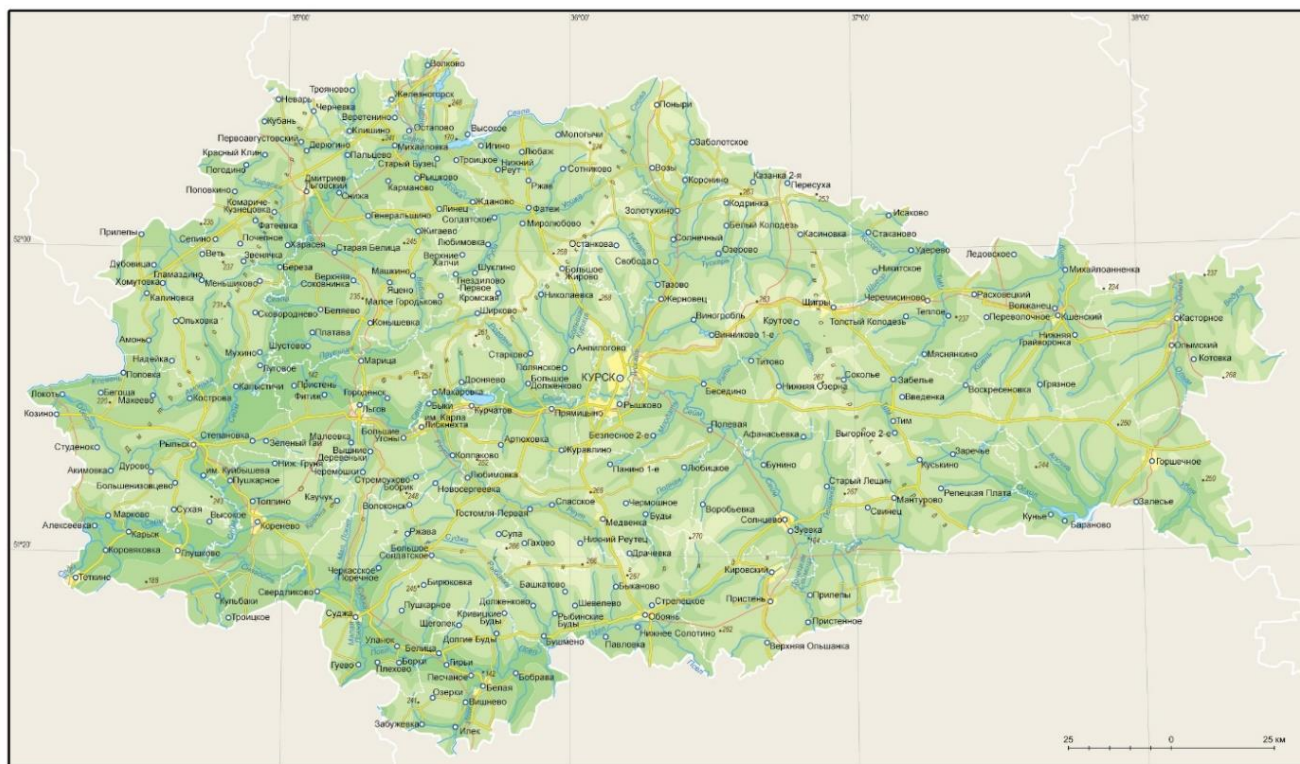


Рисунок 18 - Физическая карта Курской области [203]

Это обстоятельство определяет вероятность наличия самостоятельно функционирующих микроочагов хантавируса Пуумала на территории области, разделенных природными барьерами.

Кроме того, в характере ветвления сублинии W-RUS важно отметить положение последовательности из Ивановской области – Ivanovo/CG8035 (ř). На дендрограммах, построенным по M и L сегментам этот геноизолят располагается как внешняя группа к остальным представителям сублинии W-RUS (исключая геноизолят из пензенской области Penza/CG8730 (ř) на L сегментном дереве, о чем речь пойдет в следующем разделе). В то же время, на дендрограмме, построенной по S сегменту, Ivanovo/CG8035 (ř) кластеризуется вместе с последовательностями из Московской области (Moscow/CG8409, Moscow/CG8435, Volokolamsk/Mg57,

Volokolamsk/Mg79), что указывает на появление этого геноизолята в следствии получения S сегмента от предка последовательностей из Московской области в результате реассортации.

### 3.5.2 Сублиния Volga-RUS

К линии Volga-RUS принадлежат новые полученные нами геноизоляты: Dimitrovgrad/CG26, Saratov/CG6651, Saratov/CG6685, Saratov/CG6685, Saratov/CG6677, Izhevsk/CG7690, Penza/CG8764, а также, согласно филогенетическим деревьям по М и S сегментам, геноизолят Penza/CG8730 (ř) [197]. Принадлежность Penza/CG8730 к разным сублиниям, на основании дендрограмм по разным сегментам свидетельствует о том, что он появился в результате реассортации, что будет подробнее рассмотрено далее.

На S сегментном дереве (Рисунок 12 А) нуклеотидная последовательность из Димитровграда (Dimitrovgrad/Cg26) располагается на одной из ветвей с многочисленными последовательностями из Татарстана и Самары. В данном случае это соответствует их географической близости, поскольку Самара и Димитровград расположены на одном берегу Волги на небольшом расстоянии около 120 км (Рисунок 19).

Новые последовательности из Саратова (Saratov/Cg6651, Saratov/Cg6685, Saratov/Cg6677) группируются с другими ранее известными последовательностями из данного региона. Они состоят в родстве с последовательностями из Удмуртской Республики, включая Izhevsk/Cg7690, что подтверждается результатами предыдущих исследований [11]. Примечательно, что расстояние Саратов - Ижевск составляет приблизительно 750 км (Рисунок 19), тогда как значение идентичности между последовательностями этих вирусов составляет более 96,5%. При этом, геноизоляты из близко расположенных регионов (Dimitrovgrad/Cg26 или Penza/Cg8730) филогенетически более далеки (значение идентичности 93,3-94,6%) и расположены на других ветвях дерева (Рисунок 12).



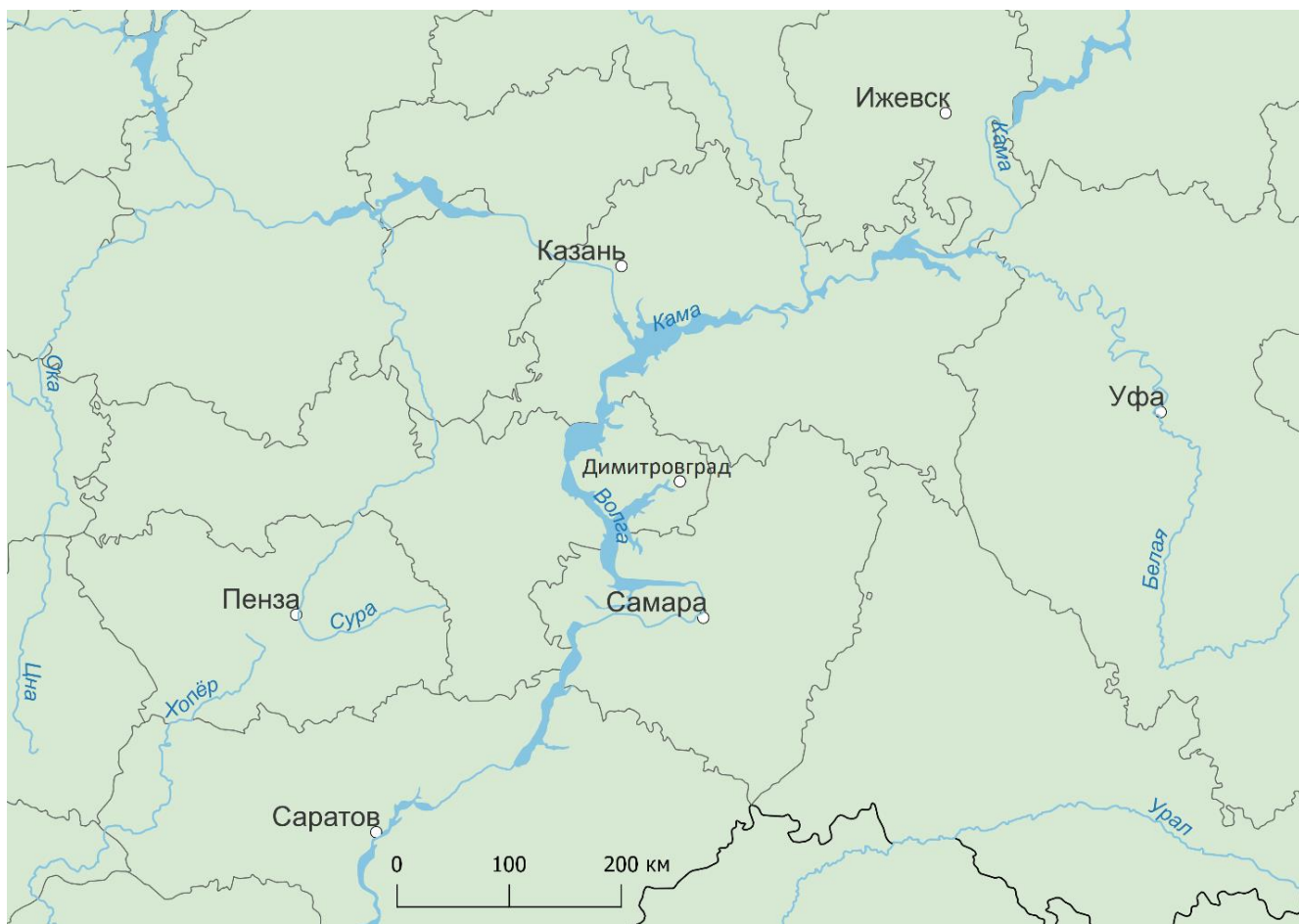


Рисунок 19 - Карта Поволжья

Тот факт, что все последовательности из Саратова группируются на одной из нескольких ветвей, относящихся к Удмуртской Республике, свидетельствует о том, что некоторые штаммы, циркулировавшие в Удмуртской Республике (скорее всего поблизости от Ижевска) были случайным образом занесены в Саратов и дали начало всему местному разнообразию. Предположительно, это могло произойти вследствие перевоза (вероятно, на корабле или барже с зерном) одной или нескольких зараженных полевок вниз по рекам Каме и Волге в обход Самары [202].

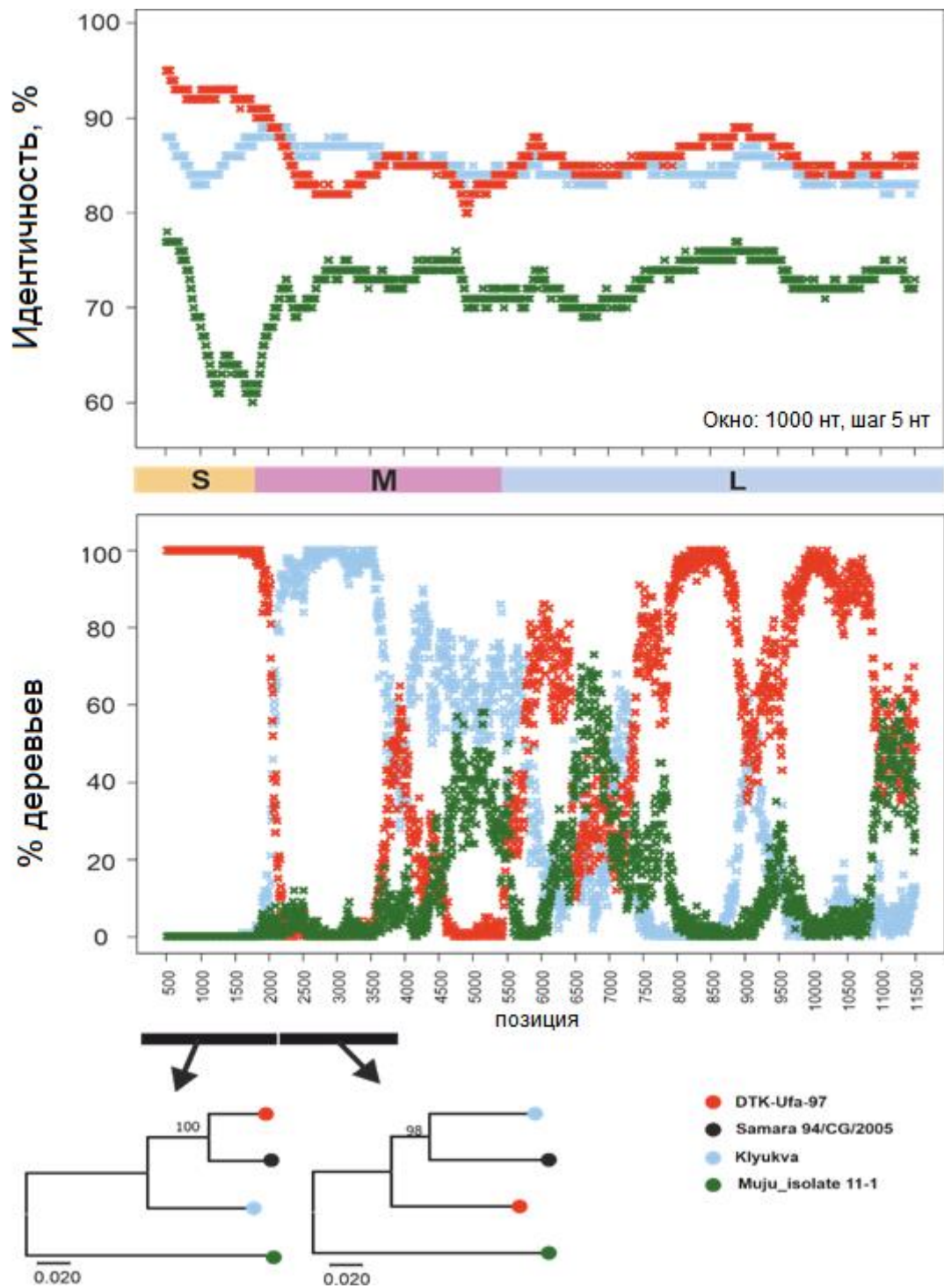
### 3.5.3 Сигналы реассортации в пределах линии RUS

Как уже говорилось выше, полученные нуклеотидные последовательности из Курской, Московской и Ивановской областей формируют отдельную кладу, названную здесь W-RUS, в пределах которой обнаружены следы реассортации.

Кроме того, открытие этих последовательностей позволило обнаружить и другие реассортационные события в пределах линии RUS.

Событие рекомбинации или реассортации было установлено на примере штаммов DTK-Ufa-97, Klyukva и Samara\_94/CG/2005. Три геномных сегмента исследуемых штаммов были объединены и проанализированы с использованием программного обеспечения Simplot (размер окна 1000, шаг 5).

Согласно результатам анализа, S сегмент изолята Samara\_94/CG/2005 был генетически близок к штамму DTK-Ufa-97, тогда как начало M сегмента изолята Samara\_94/CG/2005 - к изоляту Klyukva, полученному из рыжей полевки из Курской области (Рисунок 20). Это позволяет предположить, что штамм Samara\_94/CG/2005 возник в результате реассортации или рекомбинации между предками сублинии W-RUS и штамма DTK-Ufa-97 из Республики Башкортостан.



На верхней панели показана идентичность последовательностей относительно изолята Samara94/CG/2005. На средней панели обозначены конфликтующие филогенетические деревья участков генома. В нижней части рисунка показаны филогенетические деревья по разным участкам генома для изолятов, перечисленных в правом столбце. Построение графика подобия и загрузочное сканирование были выполнены с размером окна/шага 1000/5 нуклеотидов.

Рисунок 20 - Филогенетическое несоответствие нуклеотидных последовательностей DTK-Ufa-97, Klyukva, and Samara94/CG/2005

Важно отметить, что этот филогенетический конфликт был обнаружен с использованием довольно большого размера окна (1000 нуклеотидов), что подтверждает достоверность находки и, следовательно, факт событий рекомбинации или реассортации, происходивших в истории формирования линии RUS.

Однако, штаммы DTK-Ufa-97, Klyukva и Samara\_94/CG/2005 являются лишь отдельными представителями групп, между которыми происходила реассортация.

Анализ филогенетических деревьев показывает, что по S и L сегментам линия W-RUS формирует отдельную ветвь, которая является внешней группой по отношению к Volga-RUS. А согласно М-сегментному филогенетическому дереву, она находится внутри Volga-RUS, и группируется вместе с кладой, содержащей последовательности из Саратовской, Самарской, Пензенской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики. При этом клада, представленная генетическими вариантами из Республики Башкортостан, является внешней группой по отношению к ним. Вероятно, здесь имело место реассортационное событие между предками сублинии W-RUS и Башкирской ветви, вследствие чего образовалась группа штаммов, которая получила М сегмент от сублинии W-RUS, а S и L сегменты от предков Башкирской клады. Это позволяет предполагать, что штаммы, циркулирующие на территории Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики являются реассортантами.

Что касается генетического варианта Penza/Cg8730 (ř), то согласно деревьям, построенным на основании S и М сегментных последовательностей, он относится к линии Volga-RUS. На S сегментном дереве он формирует внешнюю группу по отношению к последовательностям из Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан, Удмуртской Республики и Республики Башкортостан. На М сегментном дереве он также является внешней группой по отношению к последовательностям из Саратовской и Самарской областей, Республики

Татарстан и Удмуртской Республики. Однако согласно филогенетическому дереву, построенному на основании L сегмента он принадлежит к сублинии W-RUS.

Такое расположение свидетельствует о том, что данный геноизолят является продуктом реассортации и получил L сегмент от предков сублинии W-RUS. Кроме того, тот факт, что на M сегментном дереве геноизолят Penza/Cg8730 (ř), кластеризуется с последовательностями из Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики как внешняя группа по отношению к ним, может свидетельствовать о том, что M сегмент также был получен в результате реассортации от предков сублинии W-RUS. При этом два сегмента могли быть получены как одновременно, так и последовательно, в результате двух событий реассортации.

Вероятно, также и другое объяснение топологии ветвей, наблюдаемой в пределах генетической линии RUS. Ветвь, относящаяся к Республике Башкортостан, могла получить M сегмент в результате реассортации с неизвестным генетическим вариантом, вследствие чего ее расположение на M сегментном дереве переместилось во внешнюю группу по отношению ко всем остальным представителям генетической линии RUS. В пользу этой версии говорит неизменное на S и M сегментных деревьях взаимное расположение сублинии W-RUS, геноизолята Penza/Cg8730 (ř) и клады, состоящей из последовательностей из Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики. В этом случае геноизолят Penza/Cg8730 (ř) мог получить в результате реассортации от сублинии W-RUS только L сегмент. Стоит отметить, что в большинстве случаев в реассортационном событии участвует M сегмент. Здесь же дочерний штамм получил от одного родительского генотипа L сегмент, а от другого - S и M, и такие события более редки [20,167].

Следует отметить, что на территориях ПФО регистрируется высокая заболеваемость ГЛПС-Пуумала, часто с тяжелым течением, причем наиболее эпидемиологически активными областями являются Республика Башкортостан и Удмуртская Республика [5]. А на территориях, где была обнаружена W-RUS

(Курская, Московская и Ивановская области) – показатели заболеваемости более низкие. Несомненно, что высокая заболеваемость ГЛПС в Поволжье связана с наличием здесь оптимума ареала популяции рыжей полевки, благодаря обилию кормовой базы [10]. Однако вопрос о том, как реассортация повлияла на патогенные свойства вируса остается открытым.

### **3.6. Генетическая линия FIN**

Вирус Пуумала впервые был выделен в 1983 году в Финляндии, поэтому первый полученный штамм вируса Пуумала принадлежит к линии FIN. Она была обнаружена на территории Финляндии, Карелии, а также в Омской области. Есть также данные о циркуляции этой линии в Тюменской области и в республике Татарстан, однако в базе данных GenBank имеются лишь неполные нуклеотидные последовательности. Филогенетически линия FIN разделяется на две большие клады, которые содержат последовательности, распространенные на огромном расстоянии друг от друга. К одной из них относятся штаммы из Финляндии и Карелии, к другой – из Омской области.

В этой работе были получены нуклеотидные последовательности пяти геноизолятов хантавируса Пуумала, выделенных из рыжих полевков, отловленных на территории Тюменской области, и два – из Архангельской области (Рисунок 21).

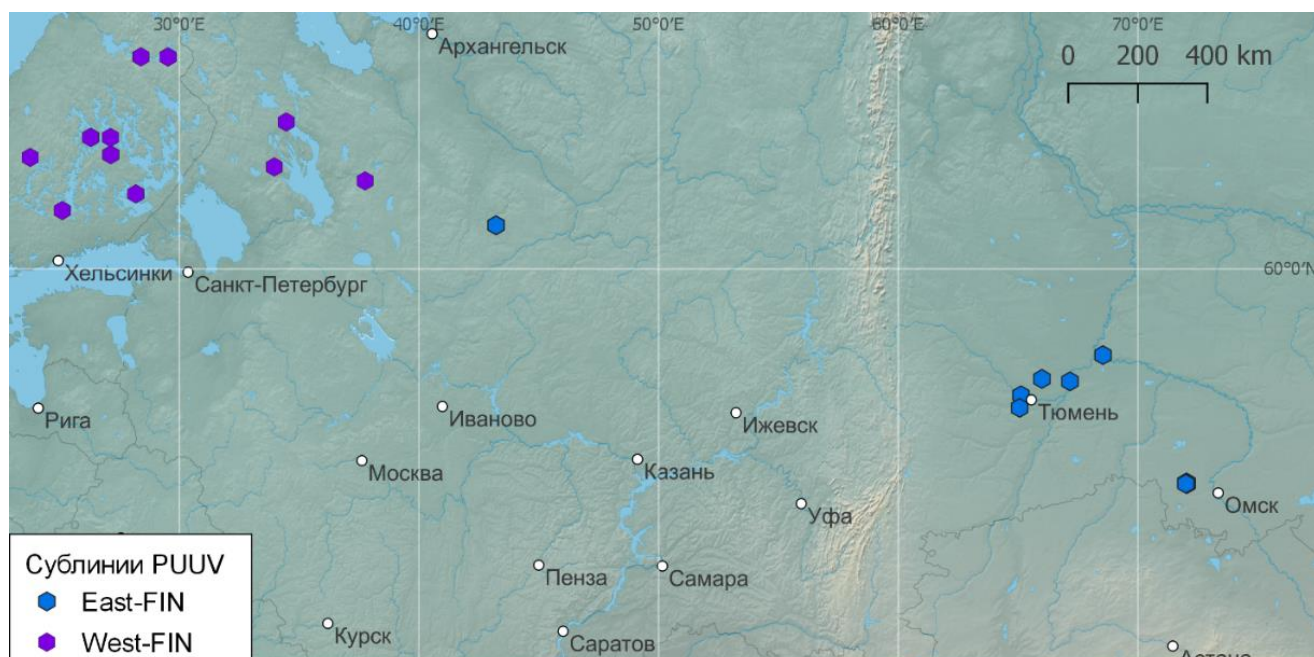


Рисунок 21 - Сведения о распространении ветвей East-FIN и West-FIN

Нуклеотидные последовательности геноизолятов из Тюменской области были наиболее близки к последовательностям из Омска согласно *S* и *M* сегментным дендрограммам (последовательности *L* сегмента из Омска не представлены в базе данных GenBank), и это хорошо согласуется с общепризнанной закономерностью, согласно которой близкородственные последовательности расположены на близком географическом расстоянии [172]. Нуклеотидные последовательности из Архангельской области также были сгруппированы с последовательностями вирусов, собранных в Омской и Тюменской областях, образуя внешнюю группу по отношению к ним. Такой тип ветвления наблюдается в деревьях, построенных на основании *S* и *M* сегментов (Рисунок 12). Ветвь, содержащая последовательности из Омской, Тюменской и Архангельской областей была названа здесь East-FIN (маркирована синим цветом на карте). Сублиния содержащая последовательности из Карелии (изоляты Kolodozero, Gomsela и Karhumah) и Финляндии обозначена как West-FIN (маркирована фиолетовым цветом).

Интересным является то, что сублинии East-FIN и West-FIN формируют общую ветвь (FIN) на дендрограммах, построенных на основании *S* и *L* сегментов. А согласно *M* сегментному дереву они являются отдельными ветвями: West-FIN



группируется вместе с RUS, а East-FIN является внешней группой по отношению к ним. Это еще раз демонстрирует, что М сегмент является наиболее изменчивым и подверженным реассортации [20]. Вероятным представляется захват сублинией West-FIN М сегмента от предков линии RUS, либо получение сублинией East-FIN М сегмента в результате реассортации с неизвестным генотипом. Однако, низкая поддержка узлов на L сегментном дереве не позволяет окончательно утверждать, что имела место реассортация именно по М сегменту.

Поскольку рыжие полевки из Западной Сибири и Архангельской области являются носителями сублинии East-FIN, можно предположить, что она распространена на всей территории между ними: в Республике Коми, Ненецком, Ямало-Ненецком, Ханты-Мансийском автономных округах и, возможно, в Свердловской области. Во всех этих регионах была зарегистрирована заболеваемость ГЛПС [4], но нам не удалось найти информацию о последовательностях хантавируса Пуумала с этих территорий в базе данных GenBank.

Архангельская область располагается на большом расстоянии от Омской и Тюменской областей, и граничит с Карелией (Рисунок 21). Остается непонятным, почему ветвь East-FIN не распространилась на территорию Карелии. Можно предположить, что между Архангельской областью и Карелией существует какой-то естественный или искусственный барьер, который затрудняет миграцию рыжих полевок.

В настоящее время принято считать, что представители линии FIN оказались разнесенными настолько далеко друг от друга (расстояние Карелия - Омск составляет более 2300км) вследствие раннего разделения во время реколонизации освободившихся территорий после окончания ледникового периода [18]. Одна часть популяции полевок мигрировала на территорию современной Финляндии, а другая часть, отделенная Уральским горным хребтом, заняла территории к востоку от него. Таким образом, можно было бы предположить, что линия East-FIN позже распространилась из Западной Сибири на северо-западные территории России, оказавшись по соседству с West-FIN.



Однако, согласно деревьям, построенным на основании сегментов S и M, Тюменская и Омская клады были разделены уже после того, как Архангельская клада отделилась от их общего предка. Дерево L сегмента не содержит такой информации ввиду отсутствия последовательностей из Омска. Такой характер ветвления предполагает 2 возможных пути распространения сублинии East-FIN: с северо-запада России на юго-восток, через Уральские горы в Западную Сибирь; или распространение из Предуралья в 2-х направлениях, в Западную Сибирь и в Архангельскую область. Последняя предполагает вторую волну миграции полевых на север после разделения линии FIN на East-FIN и West-FIN в постледниковый период.

Информация о последовательностях, циркулирующих на территориях между Архангельском и Зауральем (Республика Коми, Ненецкий, Ямало-Ненецкий автономные округа, Ханты-Мансийский автономный округ, Свердловская область), могут пролить больше света на вопрос о распространении финской линии. Это могло бы стать предметом дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами была разработана методика амплификации последовательностей всех сегментов хантавируса Пуумала: выбраны праймеры, подобрана двух стадийная программа амплификации для последующего секвенирования полученных ампликонов (первая стадия в формате мультиплекс, вторая стадия с отдельными парами праймеров). С помощью этой методики были исследованы образцы рыжих полевок, содержащие вирусный материал из Курской, Ульяновской, Саратовской, Ивановской, Московской, Пензенской, Архангельской, Тюменской областей, Удмуртской Республики и Республики Башкортостан, а также аутопсийный материал пациента, погибшего от ГЛПС. На основании результатов секвенирования вирусного материала, а также данных, представленных в базе GenBank были построены дендрограммы, позволившие сформулировать положения и гипотезы, которые стали выводами данной диссертационной работы. Все они были рассмотрены и обсуждены в контексте современных работ по данной тематике, опубликованных отечественными и зарубежными авторами.

Проведенные нами исследования выявили разнообразие генетических вариантов хантавируса Пуумала, циркулирующих на европейской территории РФ. Нами впервые показано, что на территории Курской, Ивановской и Московской областей имеются очаги сублинии, названной нами W-RUS, относящейся к генетической линии RUS вируса Пуумала. В Архангельской области установлена циркуляция сублинии East-FIN вируса Пуумала, ранее обнаруженной в Омской и Тюменской областях. Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей хантавируса Пуумала свидетельствуют о, вероятно, частых эпизодах реассортации в популяции вируса. Так на территории Приволжского федерального округа установлена циркуляция штаммов, получивших M сегмент в результате реассортации. На территории Пензенской области обнаружен генетический вариант хантавируса Пуумала, который, по-видимому, образовался в результате реассортации, получив L сегмент от предков сублинии W-RUS, что

является относительно редким событием в эволюционной истории хантавирусов – как правило, реассортанты обмениваются М сегментом.

В данной диссертационной работе была разработана методика количественного определения РНК хантавируса Пуумала с помощью ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. С помощью этого метода был выполнен количественный анализ аутопсийного материала от погибшего пациента из Курской области.

На основании полученных данных об актуальном разнообразии штаммов хантавируса Пуумала, циркулирующих на территории РФ, разработана кандидатная тест-система для выявления хантавируса Пуумала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. На ее основании на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора ведется разработка коммерческого набора реагентов для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на ГЛПС, а также для скрининговых исследований грызунов на инфицированность хантавирусом Пуумала.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан протокол пробоподготовки биологического материала, содержащего хантавирус Пуумала, для последующего секвенирования.
2. Получены более 98% кодирующих последовательностей L сегмента для 14 новых генетических вариантов хантавируса Пуумала; полные кодирующие последовательности M сегмента для 12 геноизолятов и около 90% кодирующих последовательностей M сегмента для 2 геноизолятов хантавируса Пуумала; полные кодирующие последовательности S сегмента для 24 геноизолятов хантавируса Пуумала.
3. Разработана кандидатная тест-система для дифференциальной диагностики хантавируса Пуумала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Установлена ее чувствительность к генетическим вариантам вируса Пуумала, циркулирующим в различных регионах России.
4. На территории ЦФО обнаружены представители новой клады хантавируса Пуумала, что позволило выявить ранее неизвестные события реассортации в эволюционной истории генетической линии RUS хантавируса Пуумала.
5. В Архангельской области впервые выявлены представители восточной клады генетической линии FIN хантавируса Пуумала, ранее обнаруженной на территории Западной Сибири.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

В настоящее время молекулярно-генетические методы постоянно развиваются и совершенствуются, однако на момент написания данной диссертационной работы на территории Российской Федерации отсутствуют рекомендованные в медицинской практике наборы для диагностики ГЛПС-Пуумала методом ПЦР.

Разработанные нами олигонуклеотиды для проведения ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией будут использованы для создания набора реагентов для клинической лабораторной диагностики больных с подозрением на ГЛПС-Пуумала. Разработка такого набора является логичным продолжением представленного исследования. Для его регистрации в качестве медицинского изделия и внедрения в медицинскую практику предстоит проведение клинических испытаний набора.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Для получения сведений об актуальном разнообразии хантавируса Пуумала на всей территории РФ необходимо получить данные о генетических вариантах, циркулирующих на территории всех регионов, в которых наблюдается заболеваемость ГЛПС-Пуумала. На данный момент в базах данных отсутствуют сиквенсы вируса Пуумала, циркулирующего в Белгородской, Брянской, Владимирской, Воронежской, Калужской, Костромской, Липецкой, Орловской, Рязанской, Смоленской, Тамбовской, Тверской, Тульской, Ярославской областях, относящихся к Центральному федеральному округу; в Республике Коми, Вологодской, Ленинградской, Мурманской, Новгородской, Псковской областях, Ямало-Ненецком, Ханты-Мансийском автономных округах, Свердловской области. Также интерес представляет Калининградская область, где, вероятно, можно будет обнаружить сублинию Balt-RUS вируса Пуумала и получить последовательности М и L сегментов, не представленные в базах данных.

Получение этих сведений позволит совершенствовать методы диагностики ГЛПС, а также пролить свет на эволюционную историю хантавируса Пуумала, и выдвинуть предположения о путях его распространения по территории Российской Федерации.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид;

ИФА – иммуноферментный анализ;

кДНК – комплиментарная дезоксирибонуклеиновая кислота;

МФА – метод флуоресцирующих антител;

ОРС – открытая рамка считывания;

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

ПТЗ – Приокско-Террасный заповедник;

ПФО – Приволжский федеральный округ;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

СЗФО – Северо-Западный федеральный округ;

ФИТЦ – флуоресцеина изотиоцианат;

ХПС – хантавирусных пульмональный синдром;

ЦФО – Центральный федеральный округ;

ЮФО – Южный федеральный округ;

ALAD – Alpe-Adrian genetic lineage, Альпийско-Адриатическая генетическая линия вируса Пуумала;

Balt-RUS – Baltic-Russian genetic sublineage, сублиния генетической линии RUS, циркулирующая в странах Балтики и Польше;

CE – Central European genetic lineage, Центрально-Европейская генетическая линия вируса Пуумала;

DAN – Danish genetic lineage, Датская генетическая линия вируса Пуумала;

East-FIN – East-Finnish genetic sublineage, сублиния генетической линии FIN, циркулирующая в Западной Сибири и Архангельской области;

FIN – Finnish genetic lineage, Финская генетическая линия вируса Пуумала;

LAT – Latvian genetic lineage, Латвийская генетическая линия вируса Пуумала;

NGS – Next-Generation Sequencing, секвенирование нового поколения;

N-SCAN – North-Scandinavian genetic lineage, Северо-Скандинавская генетическая линия вируса Пуумала;

RNP – ribonucleoprotein complex, рибонуклеопротеинный комплекс;

RUS – Russian genetic lineage, Русская генетическая линия вируса Пуумала;

S-SCAN – South-Scandinavian genetic lineage, Южно-Скандинавская генетическая линия вируса Пуумала;

Volga-RUS – Volga-Russian genetic sublineage, сублиния генетической линии RUS, циркулирующая в Поволжье;

West-FIN – West-Finnish genetic sublineage, сублиния генетической линии FIN, циркулирующая в Финляндии и Карелии;

W-RUS – Western-Russian genetic sublineage, сублиния генетической линии RUS, циркулирующая в западной части России.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бернштейн, А.Д. Особенности природной очаговости хантавирусных зоонозов / А.Д. Бернштейн, И. Н. Гавриловская, Н. С. Апекина, Т. К. Дзагурова, Е. А. Ткаченко // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2010. - №2. – С. 5-13.
2. Kuhn, J. H. A Brief History of Bunyaviral Family Hantaviridae / J. H. Kuhn, C. S. Schmaljohn // Diseases. – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. 38. – DOI: 10.3390/diseases11010038.
3. Vetter, P. Puumala Virus Infection in Family, Switzerland. / P. Vetter, A. G. L'Huillier, M. F. Montalbano [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 27. – № 2. – P. 658-660. – DOI: 10.3201/eid2702.203770.
4. Tkachenko, E.A. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia / E. A. Tkachenko, A. A. Ishmukhametov, T. K. Dzagurova [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 25. – № 12. – P. 2325-2328. – DOI: 10.3201/eid2512.181649.
5. Tkachenko, E. Cases of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Russia during 2000–2022 / E. Tkachenko, S. Kurashova, A. Balkina A. Ivanov, M. Egorova, O. Leonovich, Y. Popova, R. Teodorovich, A. Belyakova, P. Tkachenko, D. Trankvilevsky, E. Blinova, A. Ishmukhametov and T. Dzagurova // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – № 7. – P. 1537. – DOI: 10.3390/v15071537.
6. Морозов, В. Г. Клинические особенности гемморагической лихорадки с почечным синдромом в России / В. Г. Морозов, А. Ишмухаметов, Т. К. Дзагурова, Е. А. Ткаченко // Медицинский Совет. – 2017. – С. 156-161. – DOI: 10.21518/2079-701X-2017-5-156-161.
7. Yanagihara, R. Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). / R. Yanagihara, H. L. Amyx, D. C. Gajdusek // Journal of Virology. – 1985. – Vol. 55. – № 1. – P. 34-8. – DOI: 10.1128/JVI.55.1.34-38.1985.
8. Bernshtein, A. D. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*) / A. D. Bernshtein, N. S. Apekina, T. V. Mikhailova [et al.] // Archives of Virology. – 1999. – Vol. 144. – P. 2415-2428. – DOI:

10.1007/s007050050654.

9. Окулова, Н.М. Внутривидовая дифференциация европейской рыжей полёвки и её коэволюция с вирусом Пуумала - возбудителем геморрагической лихорадки с почечным синдромом. «Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья: прошлое, настоящее, будущее». / Н.М. Окулова, Е.А. Ткаченко, Т.А. Андреева, В.Д. Мятлев // Материалы Международного Сопещения, Москва. – 2005. – С. 168-170.

10. Garanina, S.B. Diversity and Geographic Distribution of Hantaviruses in Russia / S. B. Garanina, A. E. Platonov, V. I. Zhuravlev [et al.] // Zoonoses and Public Health. – 2009. – Vol. 56. – № 6-7. – P. 297-309. – DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01210.x.

11. Яшина, Л. Н. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 г. / Л.Н. Яшина, Т. В. Трегубчак, Б.С. Малышев [и др.] // Проблемы Особо Опасных Инфекций. – 2021. – Т. 8. – № 4. – С. 150-156. – DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-150-156.

12. Kabwe, E. Analysis of Puumala orthohantavirus Genome Variants Identified in the Territories of Volga Federal District / E. Kabwe, W. Al Sheikh, A. F. Shamsutdinov [et al.] // Tropical Medicine and Infectious Disease. – 2022. – Vol. 7. – № 3. – DOI: 10.3390/tropicalmed7030046.

13. Davidyuk, Y. Prevalence of the Puumala orthohantavirus strains in the pre-kama area of the Republic of Tatarstan, Russia / Y. Davidyuk, A. Shamsutdinov, E. Kabwe [et al.] // Pathogens. – 2020. – Vol. 9. – № 7. – P. 540. – DOI: 10.3390/pathogens9070540.

14. Davidyuk, Y.N. The Distribution of Puumala orthohantavirus Genome Variants Correlates with the Regional Landscapes in the Trans-Kama Area of the Republic of Tatarstan / Y. N. Davidyuk, E. Kabwe, A. F. Shamsutdinov [et al.] // Pathogens. – 2021. – Vol. 10. – №. 9. – P. 1169. – DOI: 10.3390/pathogens10091169.

15. Martynova, E. Cytokine, Chemokine, and Metalloprotease Activation in the Serum of Patients with Nephropathia Epidemica from the Republic of Tatarstan and the

Republic of Mordovia, Russia / E. Martynova, Y. Davidyuk, E. Kabwe [et al.] // *Pathogens*. – 2021. – Vol. 10. – № 5. – P. 527. – DOI: 10.3390/pathogens10050527.

16. Савицкая, Т. А., Анализ эпидемиологической ситуации по ГЛПС и проведения профилактических дератизационных мероприятий в Российской Федерации за 2018 год / Т. А. Савицкая, Г. Ш. Исаева, В. А. Трифонов, И. Д. Решетникова, И. В. Серова // Сборник Материалов Региональной Научно-практической Конференции «Геморрагическая Лихорадка с Почечным Синдромом: Эпидемиология, Профилактика и Диагностика на Современном Этапе». — Казань. — 2019. — С. 6-24.

17. Brummer-Korvenkontio, M. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection / M. Brummer-Korvenkontio A. Vaheiri, T. Hovi [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 1980. – Vol. 141. – №. 2. – P. 131-134.

18. Sironen, T. Molecular Evolution of Puumala Hantavirus / T. Sironen, A. Vaheiri, A. Plyusnin // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75. – № 23. – P. 11803-11810. – DOI: 10.1128/JVI.75.23.11803.

19. Razzauti, M. Co-circulation of two Puumala hantavirus lineages in Latvia: A russian lineage described previously and a novel Latvian lineage / M. Razzauti, A. Plyusnina, J. Niemimaa [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2012. – Vol. 84. – № 2. – P. 314-318. – DOI: 10.1002/jmv.22263.

20. Klempa, B. Reassortment events in the evolution of hantaviruses / B. Klempa // *Virus Genes*. – 2018. – Vol. 54. – № 5. – P. 638-646. – DOI: 10.1007/s11262-018-1590-z.

21. Castel, G. Phylogeography of puumala orthohantavirus in Europe / G. Castel, F. Chevenet, M. Razzauti [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 8. – P. 679. – DOI: 10.3390/v11080679.

22. Dekonenko, A. 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 / A. Dekonenko, V. Yakimenko, A. Ivanov [et al.] // *Infection*,

Genetics and Evolution. – 2003. – Vol. 3. – № 4. – P. 245-257. – DOI: 10.1016/S1567-1348(03)00088-1.

23. Xiao, S.Y. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the M and S genome segments of two Puumala virus isolates from Russia. / S. Y. Xiao, K. W. Spik, D. Li, C. S. Schmaljohn // *Virus Research*. – 1993. – Vol. 30. – № 1. – P. 97-103. – DOI: 10.1016/0168-1702(93)90019-j.

24. Lundkvist, Å. Cell culture adaptation of Puumala hantavirus changes the infectivity for its natural reservoir, *Clethrionomys glareolus*, and leads to accumulation of mutants with altered genomic RNA S segment / Å. Lundkvist, Y. Cheng, K.B. Sjölander [et al.] // *Journal of Virology*. – 1997. – Vol. 71. – № 12. – P. 9515–9523. – DOI: 10.1128/JVI.71.12.9515-9523.1997.

25. Plyusnin, A. Genetic variation of wild Puumala viruses within the serotype, local rodent populations and individual animal. / A. Plyusnin, O. Vapalahti, H. Lehtväslaiho [et al.] // *Virus Research*. – 1995. – Vol. 38. – № 1. – P. 25-41. – DOI: 10.1016/0168-1702(95)00038-r.

26. Kariwa, H. Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of European Russia. / H. Kariwa, E. A. Tkachenko, V. G. Morozov [et al.] // *The Journal of Veterinary Medical Science*. – 2009. – Vol. 71. – № 12. – P. 1569-78. – DOI: 10.1292/jvms.001569.

27. Asikainen, K. Molecular evolution of puumala hantavirus in Fennoscandia: phylogenetic analysis of strains from two recolonization routes, Karelia and Denmark. / K. Asikainen, T. Hänninen, H. Henttonen [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2000. – Vol. 81. – № 12. – P. 2833-41. – DOI: 10.1099/0022-1317-81-12-2833.

28. Ризванов, А.А. Молекулярно-генетическая идентификация штаммов Puumala orthohantavirus, распространённых на территории Республики Татарстан. / А.А Ризванов., Ю.Н. Давидюк, А.Ф. Шамсутдинов, Э. Кабве, А.В. Князева, Р.К. Исмагилова, А.Н. Беляев, Э.А. Шуралев, В.Г. Шакирова, А.Р. Саубанова, И.М. Хаертынова, В.А. Трифонов, Г.Ш. Исаева, Т.А. Савицкая, С.Ф. Хайбуллина, С.П. Морзунов // Сборник Материалов Региональной Научно-практической

Конференции «Геморрагическая Лихорадка с Почечным Синдромом: Эпидемиология, Профилактика и Диагностика на Современном Этапе». - Казань. - 2019 г. – С. 94-99.

29. Lee, H. W. Korean hemorrhagic fever. / H. W. Lee //The Korean Journal of Hematology. – 1982. – Vol. 17. – №. 1. – P. 3-26.

30. Avšič-Županc, T. Hantavirus infections / T. Avšič-Županc, A. Saksida, M. Korva // Clinical Microbiology and Infection. – 2019. – Vol. 21. – P. e6-e16. – DOI: 10.1111/1469-0691.12291.

31. Тарганская, В.А. К клинике острого нефрита. / В. А. Тарганская// Труды Дальневосточного Мединститута. – 1935. – Т. 2. – №. 1. – С. 156-161.

32. Дзагурова, Т. К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (этиология, специфическая лабораторная диагностика, разработка диагностических и вакцинных препаратов) : специальность 03.02.02 «Вирусология» : Диссертация на соискание доктора медицинских наук / Дзагурова Тамара Казбековна ; Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН. — Москва, 2014. — 235 с.

33. Kitano M. Purpura haemorrhagica epidemica / Kitano M. // J. Orient. Med. – 1940. – Vol. 2. – P. 192-209.

34. Повалишина, Т.П., Географическое распространение геморрагической лихорадки с почечным синдромом / А. К. Повалишина, Т.П., Янковский // Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунобиологии. – 1963. – №. 5. – С.27-30.

35. Zetterholm, S.G. Akuta nefriter simulerande akuta bukfall (Acute nephritis simulating acute abdomen) / S.G. Zetterholm // Svenska Lakartidningen. – 1934. – Vol. 31. – №. 16. – P. 425-429.

36. Stuhlfauth, K. Bericht uber ein neues schlammfieberahnliches Krankheitsbild bei Deutschen truppen in Lappland / K. Stuhlfauth // Dtsch Mwd Wochenschr. – 1943. – Vol. 69. – P. 439-443.

37. Knutrud, O. Nephropathia epidemica / O. Knutrud // Tidskrift for den Norske Laegeforening (Oslo). – 1949. – Vol. 11. – P. 259-261.

38. Gajdusek, D. C. [Epidemic hemorrhagic fever] / D. C. Gajdusek // *Klinische Wochenschrift*. – 1956. – Vol. 34. – № 29-30. – P. 769-777. – DOI: 10.1007/BF01468043.
39. Mayer, C. F. Epidemic hemorrhagic fever of the Far East, or endemic hemorrhagic nephroso-nephritis; a short outline of the disease, with supplemental data on the results of experimental inoculation of human volunteers. / C. F. Mayer // *Military Surgeon*. – 1952. – Vol. 110. – № 4. – P. 276-84.
40. Hantaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology /Johnson, K. M. – Hantaviruses: History and Overview / K. M. Johnson, S.T. Nichol // eds. Schmaljohn, C.S., Nichol, S.T. – Heidelberg; Berlin: Springer, Cop. 2001. – 256 p. – DOI: 10.1007/978-3-642-56753-7\_1 .
41. Lee, H. W. Isolation of the Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever / H. W. Lee, P. W. Lee, K. M. Johnson // *Journal of Infectious Diseases*. – 1978. – Vol. 137. – № 3. – P. 298-308. – DOI: 10.1093/infdis/137.3.298.
42. Lee, H.W. Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. / H. W. Lee, P. W. Lee, L. J. Baek [et al.] // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1981. – Vol. 30. – № 5. – P. 1106-12. – DOI: 10.4269/ajtmh.1981.30.1106.
43. Moolenaar, R. L. Hantavirus pulmonary syndrome. / R. L. Moolenaar, R. F. Breiman, C. J. Peters // *Seminars in Respiratory Infections*. – 1997. – Vol. 12. – № 1. – P. 31-9.
44. Farr, R. W. Hantavirus pulmonary syndrome. / R. W. Farr // *The West Virginia Medical Journal*. – 1994. – Vol. 90. – № 10. – P. 422-5.
45. Akram, S. M. Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome / S. M. Akram, R. Mangat, B. Huang. // StatPearls Publishing, 2023 — [электронный ресурс] – 2023. – URL: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk459378> (дата обращения 22.10.2025).
46. Zaki, S.R. Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of an emerging infectious disease / S. R. Zaki, P. W. Greer, L. M. Coffield [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 1995. – Vol. 146. – № 3. – P. 552-579.

47. Wyatt Frampton, J. Sin Nombre virus infection in 1959 / J. Wyatt Frampton, S. Lanser, C. Nichols, P. Ettestad // *The Lancet*. – 1995. – Vol. 346. – № 8977. – P. 781-782. – DOI: 10.1016/S0140-6736(95)91542-7.
48. Ictv.global/taxonomy: Current ICTV Taxonomy Release: [электронный ресурс] — 2024. — URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 22.09.2025).
49. Kuhn, J.H. Pending Reorganization of Hantaviridae to Include Only Completely Sequenced Viruses: A Call to Action / J. H. Kuhn, S. B. Bradfute, C. H. Calisher [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 660. – DOI: 10.3390/v15030660.
50. Bi, P. Are humans infected by Hantaviruses in Australia? / P. Bi, S. Cameron, G. Higgins, C. Burrell // *Internal Medicine Journal*. – 2005. – Vol. 35. – № 11. – P. 672-674. – DOI: 10.1111/j.1445-5994.2005.00954.x.
51. Plyusnin, A. Evolution of hantaviruses: Co-speciation with reservoir hosts for more than 100MYR / A. Plyusnin, T. Sironen // *Virus Research*. – 2014. – Vol. 187. – P. 22-26. – DOI: 10.1016/j.virusres.2014.01.008.
52. Slonova, R. A. Hantavirus isolation from birds / R. A. Slonova, E. A. Tkachenko, E. L. Kushnarev [et al.] // *Acta Virologica*. – 1992. – Vol. 36. – P. 493.
53. Danes, L. Antibodies against Hantaviruses in game and domestic oxen in the Czech Republic / L. Danes, M. Pejcoch, K. Bukovjan, J. Veleba, & M. Halackova // *Ceskoslovenska epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. – 1992. – Vol. 41. – №. 1. – P. 15-18.
54. Nowotny, N. Hantavirus Infection in the Domestic Cat / N. Nowotny, H. Weissenboeck, S. Aberle, F. Hinterdorfer // *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. – 1994. – Vol. 272. – № 14. – P. 1100. – DOI: 10.1001/jama.1994.03520140030020.
55. Luo, Z. Z. The domestic cat as the host animal of the epidemic hemorrhagic fever virus / Z. Z. Luo // *Zhonghua yi xue za zhi*. – 1985. – Vol. 65. – №. 10. – P. 577-579.
56. Malecki, T.M. Serologic survey for hantavirus infection in domestic animals

and coyotes from New Mexico and northeastern Arizona. / T. M. Malecki, G. P. Jillson, J. P. Thilsted [et al.] // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 1998. – Vol. 212. – № 7. – P. 970-3.

57. Schmaljohn, C.S. Characterization of Hantaan Virions, the Prototype Virus of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome / C. S. Schmaljohn, S. E. Hasty, S. A. Harrison, J. M. Dalrymple // Journal of Infectious Diseases. – 1983. – Vol. 148. – № 6. – P. 1005-1012. – DOI: 10.1093/infdis/148.6.1005.

58. LeDuc, J. W. The Hantaviruses, Etiologic Agents of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: A Possible Cause of Hypertension and Chronic Renal Disease in the United States / J. W. LeDuc, J. E. Childs, G. E. Glass // Annual Review of Public Health. – 1992. – Vol. 13. – № 1. – P. 79-98. – DOI: 10.1146/annurev.pu.13.050192.000455.

59. Vaheri, A. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. / A. Vaheri, H. Henttonen, L. Voutilainen [et al.] // Reviews in Medical Virology. – 2013. – Vol. 23. – № 1. – P. 35-49. – DOI: 10.1002/rmv.1722.

60. Lee, G.Y. Phylogeographic diversity and hybrid zone of hantaan orthohantavirus collected in Gangwon Province, Republic of Korea / G. Y. Lee, W. K. Kim, K. Park [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2020. – Vol. 14. – № 10. – P. e0008714. – DOI: 10.1371/journal.pntd.0008714.

61. Ferrés, M. Mother-to-Child Transmission of Andes Virus through Breast Milk, Chile1 / M. Ferrés, C. Martínez-Valdebenito, J. Angulo [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 26. – № 8. – P. 1885-1888. – DOI: 10.3201/eid2608.200204.

62. Enría, D. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. / D. Enría, P. Padula, E. L. Segura [et al.] // Medicina. – 1996. – Vol. 56. – № 6. – P. 709-11.

63. Torres-Pérez, F. Andes virus infections in the rodent reservoir and in humans vary across contrasting landscapes in Chile / F. Torres-Pérez, R. E. Palma, B. Hjelle [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2010. – Vol. 10. – № 6. – P. 819-824. – DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.004.



64. Hong, Y.M. Hemorrhagic fever with renal syndrome and coexisting hantavirus pulmonary syndrome / Y. M. Hong, J. C. Moon, H. C. Yang [et al.] // *Kidney Research and Clinical Practice*. – 2012. – Vol. 31. – № 2. – P. 118-120. – DOI: 10.1016/j.krcp.2012.04.318.
65. Liu, R. Vaccines and Therapeutics Against Hantaviruses / R. Liu, H. Ma, J. Shu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-19. – DOI: 10.3389/fmicb.2019.02989.
66. Conte, F. de P. Identification and validation of specific B-cell epitopes of hantaviruses associated to hemorrhagic fever and renal syndrome. / F. de P. Conte, B. C. Tinoco, T. Santos Chaves [et al.] // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2019. – Vol. 13. – № 12. – P. e0007915. – DOI: 10.1371/journal.pntd.0007915.
67. Nemirov, K. Saaremaa hantavirus in Denmark / K. Nemirov, H. K. Andersen, H. Leirs [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2004. – Vol. 30. – № 3. – P. 254-257. – DOI: 10.1016/j.jcv.2003.12.009.
68. Hofmann, J. Tula Virus as Causative Agent of Hantavirus Disease in Immunocompetent Person, Germany. / J. Hofmann, S. Kramer, K. R. Herrlinger [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 27. – № 4. – P. 1234-1237. – DOI: 10.3201/eid2704.203996.
69. Dzagurova, T.K. Pre-Clinical Studies of Inactivated Polyvalent HFRS Vaccine / T. K. Dzagurova, A. A. Siniugina, A. A. Ishmukhametov [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – DOI: 10.3389/fcimb.2020.545372.
70. Савицкая, Т.А. Оценка эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в мире и России, прогноз на 2020 г. / Т. А. Савицкая, А. В. Иванова, Г. Ш. Исаева [et al.] // *Проблемы Особо Опасных Инфекций*. – 2020. – № 2. – С. 62-70. – DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-62-70.
71. Топорков, В. П. Динамика заболеваемости ГЛПС по федеральным округам Российской Федерации с 2001 по 2007 год / В. П. Топорков, Л. Н. Величко,

А. Е. Шиянова [et al.] // Проблемы Особо Опасных Инфекций. – 2007. – Т. 26. – № 471. – С. 2004-2007.

72. Li, N. Genetic diversity and evolution of hantaan virus in china and its neighbors / N. Li, A. Li, Y. Liu [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2020. – Vol. 14. – № 8. – P. 1-20. – DOI: 10.1371/journal.pntd.0008090.

73. de Oliveira, R.C. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. / R. C. de Oliveira, A. Guterres, J. Fernandes [et al.] // Viruses. – 2014. – Vol. 6. – № 5. – P. 1929-73. – DOI: 10.3390/v6051929.

74. Baek, L. J. Soochong virus: An antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from Apodemus peninsulae in Korea / L. J. Baek, H. Kariwa, K. Lokugamage [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2006. – Vol. 78. – № 2. – P. 290-297. – DOI: 10.1002/jmv.20538.

75. Jiang, J.-F. Soochong virus and amur virus might be the same entities of hantavirus / J.-F. Jiang, W.-Y. Zhang, X.-M. Wu [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2007. – Vol. 79. – № 11. – P. 1792-1795. – DOI: 10.1002/jmv.20957.

76. Yashina, L.N. Hemorrhagic Fever With Renal Syndrome in Vladivostok City, Russia / L. N. Yashina, J. Hay, N. A. Smetannikova [et al.] // Frontiers in Public Health. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 7-12. – DOI: 10.3389/fpubh.2021.620279.

77. Klempa, B. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: Definition of genotypes and their characteristics / B. Klempa, T. Avsic-Zupanc, J. Clement [et al.] // Archives of Virology. – 2013. – Vol. 158. – № 3. – P. 521-529. – DOI: 10.1007/s00705-012-1514-5.

78. Tsergouli, K. Molecular epidemiology of Dobrava-Belgrade virus in Greece. / K. Tsergouli, E. Papadopoulou, K. Tsioka, A. Papa // Infection, Genetics and Evolution. – 2018. – Vol. 64. – P. 9-12. – DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.007.

79. Дзагурова, Т. К. Анализ групповой вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной вирусом / Т.К. Дзагурова, А.А. Ишмухаметов, В. А. Бахтина, [и др.] // Вопросы Вирусологии. – 2019. – Т. 64. – № 1. – С. 36-41. – DOI: 10.18821/0507-4088-2019-64-1-36-41.

80. Kruger, D.H. Life-Threatening Sochi Virus Infections, Russia / D.H. Kruger, E.A. Tkachenko, V.G. Morozov [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 21. – № 12. – P. 2204-2208. – DOI: 10.3201/eid2112.150891.
81. Leopardi, S. Identification of Dobrava-Belgrade Virus in *Apodemus flavicollis* from North-Eastern Italy during Enhanced Mortality / S. Leopardi, P. Drzewnioková, M. Baggieri [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 6. – P. 1241. – DOI: 10.3390/v14061241.
82. Kolodziej, M. First molecular characterization of Dobrava-Belgrade virus found in *Apodemus flavicollis* in Poland. / M. Kolodziej, A. Melgies, J. Joniec-Wiechetek [et al.] // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*. – 2018. – Vol. 25. – № 2. – P. 368-373. – DOI: 10.26444/aaem/90535.
83. Oktem, I. M. A. Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. / I. M. A. Oktem, Y. Uyar, E. Dincer [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20. – № 1. – P. 121-5. – DOI: 10.3201/eid2001.121024.
84. Plyusnin, A. Dobrava hantavirus in Russia / A. Plyusnin, K. Nemirov, N. Apekina [et al.] // *The Lancet*. – 1999. – Vol. 353. – № 9148. – P. 207. – DOI: 10.1016/S0140-6736(05)77216-0.
85. Hönig, V. Orthohantaviruses in Reservoir and Atypical Hosts in the Czech Republic: Spillover Infection and Indication of Virus-Specific Tissue Tropism. / V. Hönig, J. Kamiš, A. Maršíková [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10. – № 5. – P. e0130622. – DOI: 10.1128/spectrum.01306-22.
86. Морозов, В. Г. Сравнительная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызываемой хантавирусами Пуумала и Добrava / В. Г. Морозов, Ю. В. Юничева, А. Ф. Брюханов [и др.] // *Медицинский Вестник Северного Кавказа*. – 2007. – Т. 6. – №. 2. – С. 38-44.
87. Ткаченко, Е.А. Сравнительный анализ вспышек ГЛПС вызванными вирусами Пуумала и Добrava/Белград / Е.А. Ткаченко, А.Д. Бернштейн, Т.К. Дзагурова, В.Н. Башкирцев, Н.С. Седова, А.Е. Малкин, Е.А Горбачкова., А. Е.

Балакирев, С. Г. Дроздов, И. В. Сикора, И. А. Щукина, С. И. Савельев, И. С. Богатова, Д. В. Транквилевский, М. И. Чубирко, Е. С. Торубарова, Р. Г. Нургалеева, Г. Д. Минин, И. М. Загидуллин, А. А. Иванова, В. И. Жуков, С. Г. Морозов, С. Ф. Хайбулина, С. П. Морзунов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2005. – Т. 92. – №. 4. – С. 28-34.

88. Dzagurova, T.K. Molecular diagnostics of hemorrhagic fever with renal syndrome during a Dobrava virus infection outbreak in the European part of Russia / T. K. Dzagurova, B. Klempa, E. A. Tkachenko [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47. – № 12. – P. 4029-4036. – DOI: 10.1128/JCM.01225-09.

89. Яшина, Л.Н. Генетическая идентификация хантавируса Хоккайдо (НОКV), циркулирующего среди *M. rufocanus* на территории Прибайкалья / Л. Н. Яшина, Г. А. Данчинова, С. В. Серегин [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского Научного Центра Сибирского Отделения Российской Академии Медицинских Наук. – 2013. – Т. 92. – №. 4. – С.147-152.

90. Yashina, L.N. Hokkaido genotype of Puumala virus in the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus*) and northern red-backed vole (*Myodes rutilus*) in Siberia. / L. N. Yashina, S. A. Abramov, T. A. Dupal [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2015. – Vol. 33. – P. 304-13. – DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.021.

91. Bahr, U. Characterization of a new Puumala virus genotype associated with hemorrhagic fever with renal syndrome / U. Bahr, M. Zeier, W. Muranyi // Virus Genes. – 2006. – Vol. 33. – № 2. – P. 229-234. – DOI: 10.1007/s11262-005-0061-5.

92. Европейская рыжая полевка / А. А. Аристов, Н. В. Башенина, А. Д. Бернштейн [и др.] – Глава 5 – Условия обитания, распределение, биоценотические связи. с.143-158. // Отв. ред. Н.В. Башенина. — Москва: Наука, 1981 — 350 с.

93. Европейская рыжая полевка / А. А. Аристов, Н. В. Башенина, А. Д. Бернштейн [и др.] – Глава 2 – Ареал., с.26. // Отв. ред. Н.В. Башенина. — Москва: Наука, 1981 — 350 с.

94. Parvate, A. Diverse Morphology and Structural Features of Old and New World Hantaviruses / A. Parvate, E. P. Williams, M. K. Taylor [et al.] // Viruses. – 2019.

– Vol. 11. – № 9. – P. 862. – DOI: 10.3390/v11090862.

95. Meier, K. Hantavirus Replication Cycle — An Updated Structural Virology Perspective / K. Meier, S. R. Thorkelsson, E. R. J. Quemin, M. Rosenthal // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 8. – P. 1561. – DOI: 10.3390/v13081561.

96. Huiskonen, J.T. Electron Cryotomography of Tula Hantavirus Suggests a Unique Assembly Paradigm for Enveloped Viruses / J. T. Huiskonen, J. Hepojoki, P. Laurinmäki [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – № 10. – P. 4889-4897. – DOI: 10.1128/JVI.00057-10.

97. Mittler, E. Hantavirus entry: Perspectives and recent advances / E. Mittler, M. E. Dieterle, L. M. Kleinfelter [et al.]. // *Advances in Virus Research*. – 2019. – Vol. 104. – P. 185-224. – DOI: 10.1016/bs.aivir.2019.07.002.

98. Kabwe, E. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens / E. Kabwe, Y. Davidyuk, A. Shamsutdinov [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – № 9. – P. 775. – DOI: 10.3390/pathogens9090775.

99. Battisti, A.J. Structural Studies of Hantaan Virus / A. J. Battisti, Y.-K. Chu, P. R. Chipman [et al.] // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – № 2. – P. 835-841. – DOI: 10.1128/JVI.01847-10.

100. Reguera, J. Bunyaviridae RNA Polymerases (L-Protein) Have an N-Terminal, Influenza-Like Endonuclease Domain, Essential for Viral Cap-Dependent Transcription / J. Reguera, F. Weber, S. Cusack // *PLoS Pathogens*. – 2010. – Vol. 6. – № 9. – P. e1001101. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1001101.

101. Löber, C. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. / C. Löber, B. Anheier, S. Lindow [et al.] // *Virology*. – 2001. – Vol. 289. – № 2. – P. 224-9. – DOI: 10.1006/viro.2001.1171.

102. Madoff, D. H. A membrane glycoprotein that accumulates intracellularly: cellular processing of the large glycoprotein of LaCrosse virus. / D. H. Madoff, J. Lenard // *Cell*. – 1982. – Vol. 28. – № 4. – P. 821-9. – DOI: 10.1016/0092-8674(82)90061-7.

103. Hiltbrunner, M. Assessing Genome-Wide Diversity in European Hantaviruses through Sequence Capture from Natural Host Samples. / M. Hiltbrunner, G.

Heckel // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 7. – DOI: 10.3390/v12070749.

104. Binder, F. Spatial and Temporal Evolutionary Patterns in Puumala Orthohantavirus (PUUV) S Segment / F. Binder, R. Ryll, S. Drewes [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – № 7. – P. 548. – DOI: 10.3390/pathogens9070548.

105. Bartholomeusz, A. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy / A. Bartholomeusz, S. Locarnini // *Journal of medical virology*. – 2006. – Vol. 78. – №. S1. – P. S52-S55. – DOI: 10.1002/jmv.20608.

106. Vera-Otarola J. The Andes Hantavirus NSs Protein Is Expressed from the Viral Small mRNA by a Leaky Scanning Mechanism / J. Vera-Otarola, L. Solis, R. Soto-Rifo [et al.] // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – № 4. – P. 2176-2187. – DOI: 10.1128/jvi.06223-11.

107. Binder, F. Inhibition of interferon I induction by non-structural protein NSs of Puumala virus and other vole-associated orthohantaviruses: phenotypic plasticity of the protein and potential functional domains / F. Binder, G. Gallo, E. Bendl [et al.] // *Archives of Virology*. – 2021. – Vol. 166. – № 11. – P. 2999-3012. – DOI: 10.1007/s00705-021-05159-y.

108. Gallo, G. Interactions of Viral Proteins from Pathogenic and Low or Non-Pathogenic Orthohantaviruses with Human Type I Interferon Signaling / G. Gallo, G. Caignard, K. Badonnel [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. 140. – DOI: 10.3390/v13010140.

109. Plassmeyer, M.L. California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry / M. L. Plassmeyer, S. S. Soldan, K. M. Stachelek [et al.] // *Virology*. – 2005. – Vol. 338. – № 1. – P. 121-132. – DOI: 10.1016/j.virol.2005.04.026.

110. Strandin, T. The cytoplasmic tail of hantavirus Gn glycoprotein interacts with RNA / T. Strandin, J. Hepojoki, H. Wang [et al.] // *Virology*. – 2011. – Vol. 418. – № 1. – P. 12-20. – DOI: 10.1016/j.virol.2011.06.030.

111. Hutchinson, K. L. Sin Nombre Virus mRNA Synthesis / K. L. Hutchinson, C. J. Peters, S. T. Nichol // *Virology*. – 1996. – Vol. 224. – № 1. – P. 139-149. – DOI:

10.1006/viro.1996.0515.

112. Yanagihara, R. Hantaviruses: Rediscovery and new beginnings / R. Yanagihara, S. H. Gu, S. Arai [et al.] // *Virus Research*. – 2014. – Vol. 187. – P. 6-14. – DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.038.

113. Слонова Р.А. Серотипы вируса Хантаан, циркулирующие в очагах Дальневосточных регионов СССР/ Р.А. Слонова, Е.А. Ткаченко, Т.И. Астахова, Т.К. Дзагурова // *Вопросы Вирусологии*. – 1990. – Т. 35. – № 5. – С. 391-3.

114. Netski, D. Sin Nombre Virus Pathogenesis in *Peromyscus maniculatus* / D. Netski, B. H. Thran, S. C. St. Jeor // *Journal of Virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 1. – P. 585-591. – DOI: 10.1128/JVI.73.1.585-591.1999.

115. Yanagihara, R. Propagation of nephropathia epidemica virus in cell culture / R. Yanagihara, D. Goldgaber, P.-W. Lee [et al.] // *The Lancet*. – 1984. – Vol. 323. – № 8384. – P. 1013. – DOI: 10.1016/S0140-6736(84)92345-6.

116. Lee, H. W. Isolation of Hantaan Virus, the Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever, from Wild Urban Rats / H. W. Lee, L. J. Baek, K. M. Johnson // *Journal of Infectious Diseases*. – 1982. – Vol. 146. – № 5. – P. 638-644. – DOI: 10.1093/infdis/146.5.638.

117. Plyusnin, A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution / A. Plyusnin, O. Vapalahti, A. Vaheri // *Journal of General Virology*. – 1996. – Vol. 77. – № 11. – P. 2677-2687. – DOI: 10.1099/0022-1317-77-11-2677.

118. Zhao, X. The Evolution of Hantaviruses / X. Zhao, J. Hay // *Immunological Investigations*. – 1997. – Vol. 26. – № 1-2. – P. 191-197. – DOI: 10.3109/08820139709048926.

119. Hughes, A. L. Evolutionary Diversification of Protein-Coding Genes of Hantaviruses / A. L. Hughes, R. Friedman // *Molecular Biology and Evolution*. – 2000. – Vol. 17. – № 10. – P. 1558-1568. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026254.

120. Avsic-Zupanc, T. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. / T. Avsic-Zupanc, S. Y. Xiao, R. Stojanovic [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 1992. – Vol. 38. – № 2. – P. 132-137. – DOI:

10.1002/jmv.1890380211.

121. Carey, D.E. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. / D. E. Carey, R. Reuben, K. N. Panicker [et al.] // The Indian journal of medical research. – 1971. – Vol. 59. – № 11. – P. 1758-60.

122. Chu, Y.K. Serological Relationships among Viruses in the Hantavirus Genus, Family Bunyaviridae / Y. K. Chu, C. Rossi, J. W. LeDuc [et al.] // Virology. – 1994. – Vol. 198. – № 1. – P. 196-204. – DOI: 10.1006/viro.1994.1022.

123. Zeller, H.G. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. II. Evidence suggesting the placement of viruses in the family Bunyaviridae / H. G. Zeller, N. Karabatsos, C. H. Calisher [et al.] // Archives of Virology. – 1989. – Vol. 108. – № 3-4. – P. 211-227. – DOI: 10.1007/BF01310935.

124. Xiao, S.-Y. Phylogenetic Analyses of Virus Isolates in the Genus Hantavirus, Family Bunyaviridae / S.-Y. Xiao, J. W. LeDuc, Y. K. Chu, C. S. Schmaljohn // Virology. – 1994. – Vol. 198. – № 1. – P. 205-217. – DOI: 10.1006/viro.1994.1023.

125. Song, J.-W. Thottapalayam Virus, a Prototype Shrewborne Hantavirus / J.-W. Song, L. J. Baek, C. S. Schmaljohn, R. Yanagihara // Emerging Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 13. – № 7. – P. 980-985. – DOI: 10.3201/eid1307.070031.

126. Ткаченко, Е.А. Изучение циркуляции вируса геморрагической лихорадки с почечным синдромом среди мелких млекопитающих на территории СССР / Е. А. Ткаченко, Е. В. Рыльцева, Ю. А. Мясников [et al.] // Вопросы Вирусологии. – 1987. – Т. 32. – № 6.

127. Tang, Y.W. Hantavirus strains isolated from rodentia and insectivora in rural China differentiated by polymerase chain reaction assay / Y. W. Tang, S. L. Ruo, A. Sanchez [et al.] // Archives of Virology. – 1990. – Vol. 115. – № 1-2. – P. 37-46. – DOI: 10.1007/BF01310621.

128. Tang, Y. Isolation of haemorrhagic fever with renal syndrome virus from *Suncus murinus*, an insectivore / Y. Tang, Z. Xu, Z. Zhu, T. F. Tsai // The Lancet. – 1985. – Vol. 325. – № 8427. – P. 513-514. – DOI: 10.1016/S0140-6736(85)92108-7.

129. Tkachenko, E.A. Potential reservoir and vectors of haemorrhagic fever with



renal syndrome (HFRS) in the U. S. S. R. / E. A. Tkachenko, A. P. Ivanov, M. A. Donets [et al.] // *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*. – 1983. – Vol. 63. – № 3. – P. 267-9.

130. Gavrilovskaya, I.N. Features of circulation of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus among small mammals in the European U.S.S.R. / I. N. Gavrilovskaya, N. S. Apekina, Y. A. Myasnikov [et al.] // *Archives of Virology*. – 1983. – Vol. 75. – № 4. – P. 313-316. – DOI: 10.1007/BF01314898.

131. Gligic, A. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: Epidemiologic and epizootiologic features of a nationwide outbreak in 1989 / A. Gligic, R. Stojanovic, M. Obradovic [et al.] // *European Journal of Epidemiology*. – 1992. – Vol. 8. – № 6. – P. 816-825. – DOI: 10.1007/BF00145326.

132. Song, J.-W. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). / J.-W. Song, S. H. Gu, S. N. Bennett [et al.] // *Virology journal*. – 2007. – Vol. 4. – P. 114. – DOI: 10.1186/1743-422X-4-114.

133. Arai, S. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. / S. Arai, J.-W. Song, L. Sumibcay [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 13. – № 9. – P. 1420-3. – DOI: 10.3201/eid1309.070484.

134. Song, J.-W. Newfound Hantavirus in Chinese Mole Shrew, Vietnam / J.-W. Song, H. J. Kang, K.-J. Song [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 13. – № 11. – P. 1784-1787. – DOI: 10.3201/eid1311.070492.

135. Klempa, B. Novel Hantavirus Sequences in Shrew, Guinea / B. Klempa, E. Fichet-Calvet, E. Lecompte [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 13. – № 3. – P. 520-522. – DOI: 10.3201/eid1303.061198.

136. Arai, S. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole ( *Urotrichus talpoides* ) / S. Arai, S. D. Ohdachi, M. Asakawa [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 42. – P. 16296-16301. – DOI: 10.1073/pnas.0808942105.

137. Weiss, S. Hantavirus in Bat, Sierra Leone / S. Weiss, P. T. Witkowski, B. Auste [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 18. – № 1. – P. 159-161.

– DOI: 10.3201/eid1801.111026.

138. Arai, S. Genetic Diversity and Geographic Distribution of Bat-borne Hantaviruses / S. Arai, R. Yanagihara // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 39. – P. 1-28. – DOI: 10.21775/cimb.039.001.

139. Weiss, S. Kiwira Virus, a Newfound Hantavirus Discovered in Free-tailed Bats (Molossidae) in East and Central Africa. / S. Weiss, L. E. Sudi, A. Dux [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2368. – DOI: 10.3390/v14112368.

140. Shi, M. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses / M. Shi, X.-D. Lin, X. Chen [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 556. – № 7700. – P. 197-202. – DOI: 10.1038/s41586-018-0012-7.

141. Kikuchi, F. Rodent-Borne Orthohantaviruses in Vietnam, Madagascar and Japan. / F. Kikuchi, K. Senoo, S. Arai [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 7. – P. 1343. – DOI: 10.3390/v13071343.

142. Mull, N. Ecology of Neglected Rodent-Borne American Orthohantaviruses. / N. Mull, R. Jackson, T. Sironen, K. M. Forbes // *Pathogens (Basel)*. – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 325. – DOI: 10.3390/pathogens9050325.

143. Weiss, S. Prediction of the spatial origin of puumala virus infections using 1 segment sequences derived from a generic screening PCR / S. Weiss, B. Klempa, B. Tenner [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 8. – P. 694. – DOI: 10.3390/v11080694.

144. Liphardt, S.W. Complex History of Codiversification and Host Switching of a Newfound Soricid-Borne Orthohantavirus in North America. / S. W. Liphardt, H. J. Kang, L. J. Disney [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 7. – P. 637. – DOI: 10.3390/v11070637.

145. Wang, W. Ongoing spillover of Hantaan and Gou hantaviruses from rodents is associated with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in China. / W. Wang, M.-R. Wang, X.-D. Lin [et al.] // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2013. – Vol. 7. – № 10. – P. e2484. – DOI: 10.1371/journal.pntd.0002484.

146. Nemirov, K. Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by Apodemus mice. / K. Nemirov, H. Henttonen, A. Vaheri, A.

Plyusnin // *Virus Research*. – 2002. – Vol. 90. – № 1-2. – P. 207-15. – DOI: 10.1016/s0168-1702(02)00179-x.

147. Kouadio, L. Detection of possible spillover of a novel hantavirus in a *Natal mastomys* from Guinea / L. Kouadio, K. Nowak, E. Couacy-Hymann [et al.] // *Virus Genes*. – 2020. – Vol. 56. – № 1. – P. 95-98. – DOI: 10.1007/s11262-019-01709-4.

148. Klingström, J. Rodent host specificity of European hantaviruses: Evidence of Puumala virus interspecific spillover / J. Klingström, P. Heyman, S. Escutenaire [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2002. – Vol. 68. – № 4. – P. 581-588. – DOI: 10.1002/jmv.10232.

149. Bennett, S.N. Reconstructing the evolutionary origins and phylogeography of hantaviruses / S. N. Bennett, S. H. Gu, H. J. Kang [et al.] // *Trends in Microbiology*. – 2014. – Vol. 22. – № 8. – P. 473-482. – DOI: 10.1016/j.tim.2014.04.008.

150. Guterres, A. Is the evolution of Hantavirus driven by its host? / A. Guterres, R. C. de Oliveira, J. Fernandes, E. R. S. de Lemos // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. – Vol. 35. – P. 142-143. – DOI: 10.1016/j.meegid.2015.08.002.

151. Holmes, E. C. The evolution and emergence of hantaviruses / E. C. Holmes, Y.-Z. Zhang // *Current Opinion in Virology*. – 2015. – Vol. 10. – P. 27-33. – DOI: 10.1016/j.coviro.2014.12.007.

152. Khaiboullina, S. Hantaviruses: Molecular Biology, Evolution and Pathogenesis / S. Khaiboullina, S. Morzunov, S. St. Jeor // *Current Molecular Medicine*. – 2005. – Vol. 5. – № 8. – P. 773-790. – DOI: 10.2174/156652405774962317.

153. Hantaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology / A. Plyusnin, S. P. Morzunov – *Virus Evolution and Genetic Diversity of Hantaviruses and Their Rodent Hosts* // eds. Schmaljohn, C.S., Nichol, S.T. – Heidelberg; Berlin: Springer, Cop. 2001. – 256 p. – DOI: 10.1007/978-3-642-56753-7\_4.

154. Ramsden, C. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. / C. Ramsden, E. C. Holmes, M. A. Charleston // *Molecular Biology and Evolution*. – 2009. – Vol. 26. – № 1. – P. 143-53. – DOI: 10.1093/molbev/msn234.

155. Marklewitz, M. Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggests arthropod origin of a pathogenic RNA virus family / M. Marklewitz, F. Zirkel, A. Kurth [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 24. – P. 7536-7541. – DOI: 10.1073/pnas.1502036112.
156. Käfer, S. Re-assessing the diversity of negative strand RNA viruses in insects / S. Käfer, S. Paraskevopoulou, F. Zirkel [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2019. – Vol. 15. – № 12. – P. e1008224. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1008224.
157. Souza, W.M. Phylogeography and evolutionary history of rodent-borne hantaviruses / W. M. Souza, G. Bello, A. A. Amarilla [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – Vol. 21. – P. 198-204. – DOI: 10.1016/j.meegid.2013.11.015.
158. Guo, W.P. Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents / W. P. Guo, X. D. Lin, W. Wang [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2013. – Vol. 9. – № 2. – P. e1003159. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1003159.
159. Ding, X. Progress and Challenge in Computational Identification of Influenza Virus Reassortment. / X. Ding, L. Qin, J. Meng [et al.] // *Virologica Sinica*. – 2021. – Vol. 36. – № 6. – P. 1273-1283. – DOI: 10.1007/s12250-021-00392-w.
160. Galli, A. High recombination rate of hepatitis C virus revealed by a green fluorescent protein reconstitution cell system. / A. Galli, U. Fahnøe, J. Bukh // *Virus evolution*. – 2022. – Vol. 8. – № 1. – P. veab106. – DOI: 10.1093/ve/veab106.
161. Klempa B. Genetic interaction between distinct Dobrava hantavirus subtypes in *Apodemus agrarius* and *A. flavicollis* in nature. / B. Klempa, H.A. Schmidt, R. Ulrich, S. Kaluz, M. Labuda, H. Meisel, B. Hjelle, D.H. Krüger // *J Virol*. – 2003. – Vol. 77 – № 1. – P. 804-809. – DOI: 10.1128/jvi.77.1.804-809.2003.
162. Nikolic, V. Evidence of recombination in Tula virus strains from Serbia / V. Nikolic, N. Stajkovic, G. Stamenkovic [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – Vol. 21. – P. 472-478. – DOI: 10.1016/j.meegid.2013.08.020.
163. Li, D. Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. / D. Li, A. L. Schmaljohn, K. Anderson, C. S.

Schmaljohn // Virology. – 1995. – Vol. 206. – № 2. – P. 973-83. – DOI: 10.1006/viro.1995.1020.

164. Rizvanov, A. A. Development of reassortant viruses between pathogenic hantavirus strains / A. A. Rizvanov, S. F. Khaiboullina, S. St. Jeor // Virology. – 2004. – Vol. 327. – № 2. – P. 225-232. – DOI: 10.1016/j.virol.2004.07.012.

165. Kirsanovs, S. Genetic reassortment between high-virulent and low-virulent Dobrava-Belgrade virus strains. / S. Kirsanovs, B. Klempa, R. Franke [et al.] // Virus genes. – 2010. – Vol. 41. – № 3. – P. 319-28. – DOI: 10.1007/s11262-010-0523-2.

166. Handke, W. Generation and characterization of genetic reassortants between Puumala and Prospect Hill hantavirus in vitro. / W. Handke, R. Oelschlegel, R. Franke [et al.] // The Journal of General Virology. – 2010. – Vol. 91. – № 9. – P. 2351-9. – DOI: 10.1099/vir.0.021139-0.

167. Razzauti, M. Accumulation of point mutations and reassortment of genomic RNA segments are involved in the microevolution of Puumala hantavirus in a bank vole (*Myodes glareolus*) population / M. Razzauti, A. Plyusnina, H. Henttonen, A. Plyusnin // Journal of General Virology. – 2008. – Vol. 89. – № 7. – P. 1649-1660. – DOI: 10.1099/vir.0.2008/001248-0.

168. Razzauti, M. Analysis of Puumala hantavirus in a bank vole population in northern Finland: Evidence for co-circulation of two genetic lineages and frequent reassortment between strains / M. Razzauti, A. Plyusnina, T. Sironen [et al.] // Journal of General Virology. – 2009. – Vol. 90. – № 8. – P. 1923-1931. – DOI: 10.1099/vir.0.011304-0.

169. Szabó, R. Phylogenetic analysis of Puumala virus strains from Central Europe highlights the need for a full-genome perspective on hantavirus evolution / R. Szabó, L. Radosa, M. Ličková [et al.] // Virus Genes. – 2017. – Vol. 53. – P. 1-5. – DOI: 10.1007/s11262-017-1484-5.

170. Razzauti, M. Microevolution of Puumala hantavirus during a Complete Population Cycle of Its Host, the Bank Vole (*Myodes glareolus*) / M. Razzauti, A. Plyusnina, H. Henttonen, A. Plyusnin // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 5. – P. e64447.

– DOI: 10.1371/journal.pone.0064447.

171. Castel, G. Complete Genome and Phylogeny of Puumala Hantavirus Isolates Circulating in France. / G. Castel, M. Couteaudier, F. Sauvage [et al.] // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – № 10. – P. 5476-88. – DOI: 10.3390/v7102884.

172. Jonsson, C. B. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. / C. B. Jonsson, L. T. M. Figueiredo, O. Vapalahti // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2010. – Vol. 23. – № 2. – P. 412-41. – DOI: 10.1128/CMR.00062-09.

173. Castel, G. Estimation of main diversification time-points of hantaviruses using phylogenetic analyses of complete genomes / G. Castel, N. Tordo, A. Plyusnin // *Virus Research*. – 2017. – Vol. 233. – P. 60-69. – DOI: 10.1016/j.virusres.2017.03.011.

174. Wójcik, J.M. Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens / J. M. Wójcik, A. Kawałko, S. Marková [et al.] // *Journal of Zoology*. – 2010. – Vol. 281. – № 4. – P. 249-262. – DOI: 10.1111/j.1469-7998.2010.00699.x.

175. Kabwe, E. Puumala Orthohantavirus Reassortant Genome Variants Likely Emerging in the Watershed Forests / E. Kabwe, A. F. Shamsutdinov, S. Suleimanova [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 2. – P. 1018. – DOI: 10.3390/ijms24021018.

176. Краснов, Я. М. Филогенетический анализ вариантов вируса Пуумала (Hantaviridae: Orthohantavirus), циркулирующих на территории Саратовской области/ Я. М. Краснов, Е. В. Найденова, Н. П. Гусева [и др.] // *Вопросы Вирусологии*. – 2024. – Т. 6. – №. 2. – С. 162-174. – DOI: 10.36233/0507-4088-224.

177. Иванов, А. П. Анализ вспышки геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Егорьевском районе Московской области / Иванов А. П., А. Е. Деконенко, Т. К. Дзагурова [и др.] // *Вопросы Вирусологии*. – 2000. – Т. 4. – С. 33-36.

178. Ling, J. Nephropathia Epidemica Caused by Puumala Virus in Bank Voles, Scania, Southern Sweden / J. Ling, E. E. Lundeberg, A. Wasberg [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 30. – № 4. – С. 732. – DOI: 10.3201/eid3004.231414.

179. Dzagurova, T. Antigenic relationships of hantavirus strains analysed by monoclonal antibodies / T. Dzagurova, E. Tkachenko, R. Slonova [et al.] // *Archives of Virology*. – 1995. – Vol. 140. – № 10. – P. 1763-1773. – DOI: 10.1007/BF01384340.

180. Курашова, С. С. Оценка эффективности адъювантов различного происхождения, методов инаktivирования вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов : специальность 03.02.02 «Вирусология» : Диссертация на соискание кандидата медицинских наук / Курашова Светлана Сергеевна ; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН». — Москва, 2021. — 162 с.

181. Ветрова, А. Н. Влияние условий хранения на стабильность хантавирусных вакцинных препаратов на основе вируса Пуумала / А. Н. Ветрова, С. С. Курашова, Р. Д. Теодорович, Ю. В. Попова, Е. А. Блинова, П. А. Набатников, Е. А. Ткаченко, Т. К. Дзагурова // *Инфекция и Иммуитет*. – 2023. – Т. 13. – №2. – С. 376-382. – DOI: 10.15789/2220-7619-OOS-2116.

182. Klempa, B. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. / B. Klempa, E. Fichet-Calvet, E. Lecompte [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 12. – № 5. – P. 838-40. – DOI: 10.3201/eid1205.051487.

183. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2014. – Vol. 30. – № 15. – P. 2114-20. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

184. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads / M. Martin // *EMBnet.journal*. – 2011. – Vol. 17. – № 1. – P. 10. – DOI: 10.14806/ej.17.1.200.

185. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9. – № 4. – P. 357-359. – DOI: 10.1038/nmeth.1923.

186. Danecek, P. Twelve years of SAMtools and BCFtools / P. Danecek, J.K. Bonfield, J. Liddle [et al.] // *GigaScience*. – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. giab008. – DOI: 10.1093/gigascience/giab008.

187. Wilm, A. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. / A. Wilm, P. P. K. Aw, D. Bertrand [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2012. – Vol. 40. – № 22. – P. 11189-201. – DOI: 10.1093/nar/gks918.

188. Van der. Auwera, G. Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra / G. Van der Auwera, B. O'Connor. – 1st Edition. – O'Reilly Media., 2020. – 470 p.

189. Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – № 6. – P. 1547-1549. – DOI: 10.1093/molbev/msy096.

190. Lole, K.S. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination / K. S. Lole, R. C. Bollinger, R. S. Paranjape [et al.] // *Journal of Virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 1. – P. 152-160. – DOI: 10.1128/jvi.73.1.152-160.1999.

191. Clopper, C. J. The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial / C. J. Clopper, E. S. Pearson // *Biometrika*. – 1934. – Vol. 26. – № 4. – P. 404. – DOI: 10.2307/2331986.

192. Danielsoper.com: Free Statistics Calculators: [электронный ресурс] — 2024. — URL: <https://www.danielsoper.com/statcalc/> (дата обращения: 28.07.2024).

193. Epitools.ausvet.com.au: Epitools - Epidemiological Calculators: [электронный ресурс] — 2018. — URL: <https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion> (дата обращения: 28.07.2024).

194. Fedstat.ru: ЕМИСС Государственная статистика: [электронный ресурс] — 2020. — URL: <https://www.fedstat.ru/indicator/38208> (дата обращения: 12.05.2020).

195. Blinova, E. A. fatal case of haemorrhagic fever with renal syndrome in Kursk



Region, Russia, caused by a novel Puumala virus clade / E. Blinova, A. Deviatkin, S. Kurashova, M. Balovneva, I. Volgina, A. Valdokhina, V. Bulanenko, Y. Popova, A. Belyakova, T. Dzagurova // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2022. – Vol. 102. – P. 105295. – DOI: 10.1016/j.meegid.2022.105295.

196. Raftery, M.J. Replication in the Mononuclear Phagocyte System (MPS) as a Determinant of Hantavirus Pathogenicity / M. J. Raftery, P. Lalwani, N. Lütteke [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 281. – DOI: 10.3389/fcimb.2020.00281.

197. Blinova, E. Evolutionary Formation and Distribution of Puumala Virus Genome Variants, Russia / E. Blinova, A. Deviatkin, M. Makenov, Y. Popova, T. Dzagurova // *Emerging Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 29. – № 7. – P. 1420. – DOI: 10.3201/eid2907.221731.

198. Блинова, Е.А. Генетические особенности вируса Пуумала (Hantaviridae: Orthohantavirus), обнаруженного в Московской области / Е. А. Блинова, М. Т. Макенов, Е. С. Морозкин, И. С. Холодилов, М. В. Федорова, О. Б. Журенкова, Г. В. Роев, К. Ф. Хафизов, Л.С. Карань // *Вопросы Вирусологии*. – 2023. – Т. 68. – № 4. – С. 283-290. – DOI: 10.36233/0507-4088-177.

199. Мочалкин, П. А. Сочетанная циркуляция хантавирусов Пуумала, Тула, Сивис на территории Республики Башкортостан / П. А. Мочалкин, В. Г. Акимкин, С. В. Углева, Е. С. Морозкин, Е. А. Блинова, К. А. Сычева, Д. Д. Скрипниченко, Т. А. Бондаренко, Ю. О. Эпик, М. Т. Макенов, А. А. Казак, А. К. Попова, М. А. Скотарева, О. В. Иванова, Б. Р. Гарифуллин, Н. В. Попов // *Проблемы Особо Опасных Инфекций*. – 2024. – № 2. – С. 140-147. – DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-140-147.

200. Dashian, M. A. Genotypic differentiation and evolutionary dynamics of Puumala orthohantavirus (PUUV) / M. A. Dashian, I. A. Volkhin, P. Y. Volchkov, A. A. Deviatkin // *Acta Virologica*. – 2024. – Vol. 68. – P. 13168. – DOI: 10.3389/av.2024.13168.

201. Williams, E. P. Prevalence of Hantaviruses Harbored by Murid Rodents in

Northwestern Ukraine and Discovery of a Novel Puumala Virus Strain / E. P. Williams, M. K. Taylor, I. Demchyshyna [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 8. – P. 1640. – DOI 10.3390/v13081640.

202. Блинова, Е. А. Штаммы вируса Пуумала, вызвавшие вспышку ГЛПС в Саратовской области в 2019 г., были занесены из Удмуртии / Е. А. Блинова, У. А. Кресо́ва, Т. К. Дзагурова // Сборник Тезисов «X Международная Конференция Молодых Ученых: Биоинформатиков, Биотехнологов, Биофизиков, Вирусологов и Молекулярных Биологов». – Новосибирск: Научоград Кольцово. – 2023 – С. 442. – DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-232.

203. Sharada: Каталог векторных карт: [электронный ресурс] — 2019. — URL: <https://www.sharada.ru/katalog/maps/regions/kurskaja-oblast-fizicheskaja-karta>. (дата обращения: 01.11.2023).