

Кабве Эммануэль

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

ФБУН «Казанский научно-исследовательский

институт эпидемиологии и микробиологии»

старший научный сотрудник

НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии»

Научно-клинического центра

Прецизионной и регенеративной медицины

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)

федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

Исаева Гузель Шавхатовна

д-р мед. наук, заместитель директора

ФБУН «Казанский научно-исследовательский

институт эпидемиологии и микробиологии»

г. Казань, Республика Татарстан

Князева Анна Владимировна

бакалавр, студентка

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)

федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

Давидюк Юрий Николаевич

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник

Научно-клинический центр прецизионной и регенеративной медицины

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

ведущий научный сотрудник

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ S-СЕКМЕНТА ГЕНОМА ШТАММОВ PUUMALA ORTHOHANTAVIRUS, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЯДЕ РАЙОНОВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН И УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Аннотация: проведён сравнительный анализ нуклеотидной последовательности S-сегмента штаммов *Puumala orthohantavirus* из трёх локаций Предволжья Республики Татарстан и ряда локаций из Предкамья и Закамья Татарстана и двух районов Ульяновской области. Установлено, что штаммы из Предволжья Республики Татарстан филогенетически более родственны штаммам из Барышского района Ульяновской области, что свидетельствует о вероятном существовании на правом берегу Волги генетически обособленной группы штаммов вируса.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, *Puumala orthohantavirus*, S-сегмент, генетическая вариабельность.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-34-60012.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – широко распространённое в России и многих странах Европы и Азии зоонозное заболевание вирусной природы, возбудителями которого являются вирусы из рода *Orthohantavirus* (семейство *Hantaviridae*, порядок *Bunyavirales*) [9]. В Российской Федерации основные очаги ГЛПС находятся в Дальневосточном регионе и в европейской части страны. На Дальнем Востоке основными возбудителями ГЛПС являются ортохантавирусы *Hantaan* и *Seoul*, а на европейской части территории России – *Dobrava-Belgrade* и *Puumala* (PUUV) [1].

В течение многих лет более 80% всех зарегистрированных в РФ случаев ГЛПС приходится на Приволжский федеральный округ (ПФО). В частности, в 2020 году в ПФО было зарегистрировано 3086 случаев ГЛПС из общего

количества 3845 случаев в стране [2]. Основным возбудителем ГЛПС в ПФО является PUUV, который переносится природным хозяином – рыжей полёвкой (*Myodes glareolus*), – и вызывает лёгкую форму заболевания, так называемую эпидемическую нефропатию с летальностью менее 0,4% [10; 11].

Геном ортохантавирусов состоит из трёх сегментов РНК отрицательной полярности, обозначаемых как S (малый), М (средний) и L (большой). Сегменты генома кодируют нуклеокапсидный белок (N-белок), предшественник поверхностных гликопротеинов Gn и Gc (GPC) и РНК-зависимую РНК-полимеразу, соответственно (RdRp) [12]. Для генома ортохантавирусов характерна высокая изменчивость, являющаяся следствием как точечных замен нуклеотидов, так и процессов рекомбинации и/или реассортации. У PUUV в настоящее время различают восемь генетических линий, распространённых на территории большинства европейских стран [3], две из которых выявлены на территории России: финская линия (FIN) – в Карелии и западной Сибири, а русская (RUS) – на большей части европейской территории страны, в том числе в ПФО [6].

До недавнего времени исследования генома PUUV в ПФО ограничивались отдельными регионами, в частности, Самарской областью [8]. В наших предыдущих работах исследовались варианты генома штаммов PUUV, циркулирующих в популяциях рыжей полёвки на территории Предкамья и Закамья Республики Татарстан (РТ), в Удмуртии, в Барышском и Мелекесском районах Ульяновской области (УО) [4, 5, 7]. Целью данной работы было проведение молекулярно-генетической идентификации и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности S-сегмента штаммов PUUV, распространённых на территории Предволжья РТ.

Замороженные образцы лёгочной ткани рыжих полёвок, отловленных в Верхнеуслонском и Дрожжановском районах РТ в 2017 и 2019 годах, были предоставлены для исследования ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)». Общую РНК из лёгочной ткани рыжей полёвки выделяли с использованием реагента TriZol (Invitrogen, США). Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы RevertAid Reverse

Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения ПЦР-амплификации участков S-сегмента PUUV использовали праймеры, последовательности которых приведены в [4]. ПЦР проводили с использованием реакционной смеси 5×Screen Mix (Евроген, Россия), полученные ПЦР-продукты секвенировали в Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ на секвенаторе ABI Prism 310 (ABI, США). Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей (НП) использовали алгоритм Clustal W из программы MEGA6.0. Филогенетический анализ НП штаммов PUUV проводили методом Maximum Likelihood с использованием Tamura-Nei model в программе MEGA6.0 [13]. Для сравнительного и филогенетического анализа использовали НП штаммов PUUV, размещённых в электронной базе данных GenBank, а также ранее полученные нами НП S-сегмента штаммов PUUV, циркулирующих в ряде районов РТ и УО. НП S-сегмента *Tula orthohantavirus* использовали в качестве внешней группы.

Всего было получено НП полной кодирующей области (CDS) S-сегмента пяти штаммов PUUV из трёх локаций на правом берегу Волги: двух штаммов (MG_794 и MG_796) из района н/п Лесные Моркваши (локация 1) и двух штаммов (MG_1709 и MG_1710) из района н/п Восточная Звезда (локация 2) Верхнеуслонского района, а также одного штамма (MG_1626) из района н/п Чувашская Бездна (локация 3) Дрожжановского района. В результате сравнительного анализа установлено, что НП штаммов из одной локации, идентичны между собой. При сравнении штаммов из разных локаций значения идентичности НП были равны: 96,7% – для локаций 1 и 2, 95,2% – для локаций 1 и 3, 95,6% – для локаций 2 и 3. Сравнение исследуемых штаммов со штаммами русской генетической линии из ряда локаций на территории Предкамья и Закамья РТ и двух районов УО, а также трёх других штаммов линии RUS из ПФО, показало, что значения идентичности НП находились в интервале 91,9–94,3% (табл. 1). В то же время сравнение исследуемых штаммов со штаммами других генетических линий PUUV – FIN, центральноевропейской (CE) и северо-скандинавской (N-SCA) – выявило значительно более низкие значения идентичности НП – от 83,2% до 86,2%.

Таким образом, можно сделать вывод, что все выявленные в Предволжье штаммы PUUV относятся к генетической линии RUS.

Таблица 1

Значения идентичности нуклеотидных последовательностей S-сегмента штаммов PUUV Предволжья РТ и штаммов русской генетической линии из регионов ПФО

№	Локация н/п	Штамм	РТ, Предкамье, северо-запад	РТ, Предкамье	РТ, Восточное Закамье	РТ, Западное Закамье	УО, Мелекесский р-н	УО, Барышский р-н	Пуумала вирус (Kazan) Z84204	Пуумала вирус (Samara_49) AB433843	Пуумала вирус (DTK_Ufa-97) AB297665
			92,6– 92,7	92,9– 93,8	92,6– 93,3	92,5– 93,2	92,5– 92,9	93,5	93,2	92,6	93,7
1	Лесные Моркваши	MG_794 MG_796	92,6– 92,7	92,9– 93,8	92,6– 93,3	92,5– 93,2	92,5– 92,9	93,5	93,2	92,6	93,7
2	Восточная Звезда	MG_1709 MG_1710	92,2– 92,4	93,2– 93,9	91,9– 92,9	92,3– 93,0	92,5– 93,0	93,5	93,2	92,5	92,9
3	Чувашская Бездна	MG_1626	92,9– 93,6	93,9– 94,2	92,7– 93,9	93,3– 94,0	93,5– 93,9	94,3	93,8	93,3	93,9

Сравнительный анализ рассчитанных аминокислотных последовательностей (АП) N-белка выявил, что значения идентичности между исследуемыми и референсными штаммами генетической линии RUS находятся в интервале 98,6–99,8%, а при сравнении АП штамма MG_1626 и штаммов из Барышского района УО это значение равно 100%. При сравнении АП исследуемых штаммов со штаммами из других генетических линий значения идентичности составили 95,6–96,5%.

В то же время в результате сравнительного анализа АП у всех исследуемых штаммов была выявлена замена аминокислотного остатка E250D. Такая же аминокислотная замена была ранее выявлена только у штаммов из района н/п Барыш, Барышского района УО и не была найдена ни у одного из референсных

штаммов из локаций на левом берегу Волги. Также у штаммов из локации 1 выявлена уникальная замена K252R, а у штаммов из локации 2 – две уникальные замены T79A и A257S.

На филогенетическом дереве, построенном для НП полной CDS S-сегмента длиной 1302 пар нуклеотидов (п.н.), исследуемые штаммы из Предволжья РТ образуют отдельную субкладу, близкородственную субкладе, включающей штаммы из Барышского района УО (рис. 1).

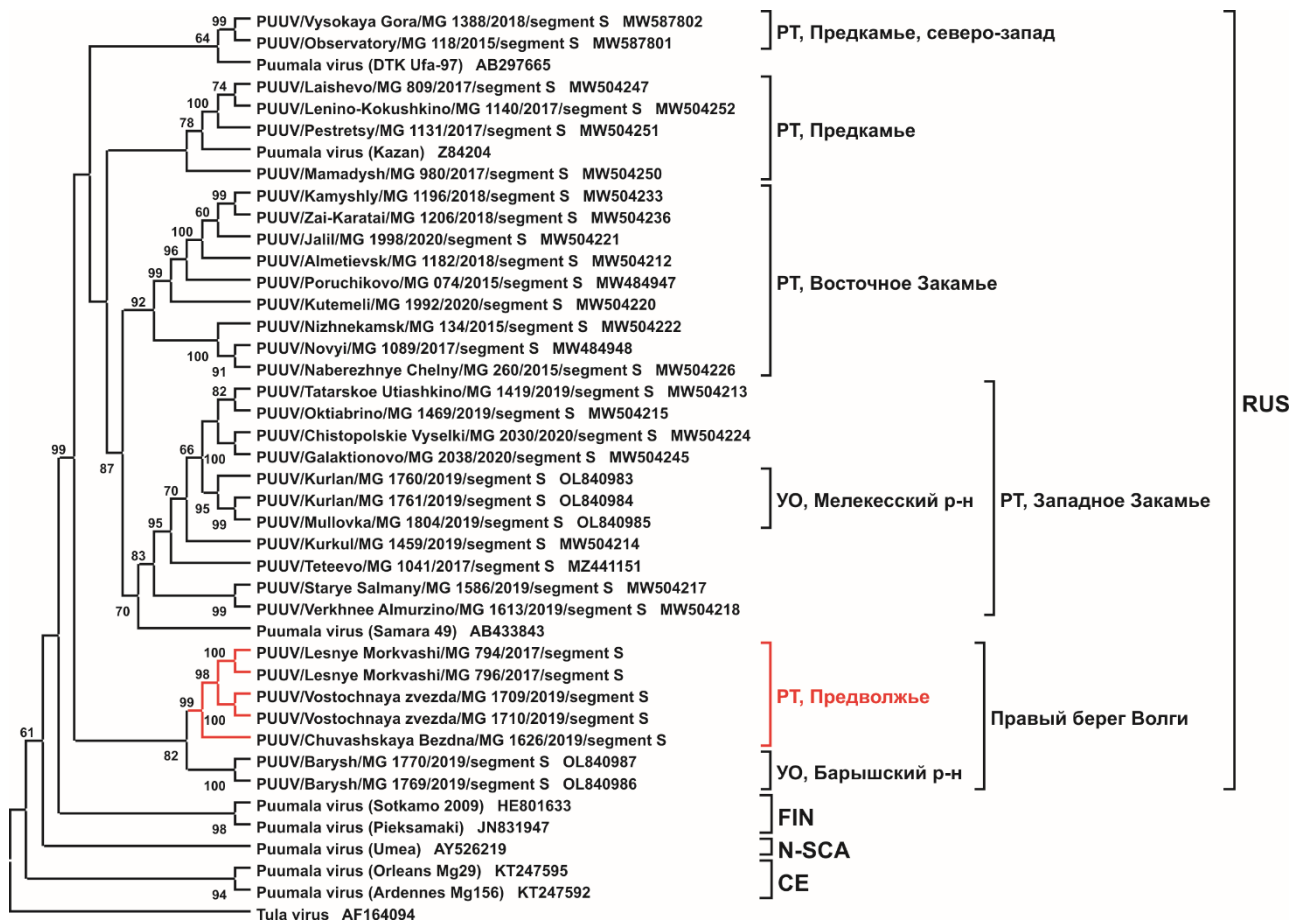


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для кодирующей области S-сегмента длиной 1302 п.н.:

Генетические линии PUUV: RUS – русская, FIN – финская, N-SCA – североскандинавская, CE – центральноевропейская.

Штаммы из Предволжья вместе со штаммами из Барышского района УО группируются в субкладу «Правый берег Волги», обособленную от остальных субклад, включающих штаммы из линии RUS из локаций на левом берегу Волги. Таким образом, результаты сравнительного анализа НП и АП, а также

филогенетического анализа позволяют предположить существование на правом берегу Волги, в том числе и на неисследованных до настоящего времени территориях, группы штаммов PUUV, генетически отличающихся от штаммов, распространённых на левом берегу. При этом географическое расстояние между районами распространения штаммов PUUV на правом берегу Волги в РТ и УО не коррелирует с генетическим расстоянием между вариантами НП S-сегмента.

Ранее нами было показано [4, 5], что в Предкамье и Закамье РТ распределение генетических вариантов PUUV связано с ландшафтными особенностями территории. В частности, в долине каждой реки штаммы PUUV образуют отдельные генетически близкие группы, чётко обособленные от штаммов из локаций в долинах других рек, несмотря на то что географическое расстояние между реками может быть незначительным. Распределение выявленных штаммов на правом берегу Волги согласуется с результатами, полученными для распределения штаммов на левом берегу: штаммы из локации 1 находятся в долине реки Морквашинки, а заметно генетически отличающиеся от них штаммы из локации 2 – в долине реки Морквашки, при этом расстояние между реками – правыми притоками Волги – составляет менее 10 км. Нужно отметить, что АП штаммов из локации 1 отличается на 4 аминокислоты от штаммов из локации 2, что свидетельствует о значительном времени независимой эволюции генома этих штаммов и отсутствии контактов между популяциями их природных носителей.

Ранее нами было высказано предположение, что препятствием для контакта рыжих полёвок из популяций, локализованных в долинах соседних рек, являются водоразделы. Было также высказано допущение, что в годы увеличения численности популяций их территория значительно расширяется, может распространяться на водоразделы и в таких случаях соседние популяции могут образовывать так называемые «зоны контакта» между полёвками-носителями различных вариантов генома PUUV. В результате могут возникнуть благоприятные условия для формирования новых генетических вариантов вируса в результате рекомбинации и/или реассортации [5]. С этой точки зрения перспективной для поиска новых генетических форм может служить локация 3, расположенная в лесном массиве

на водоразделе между бассейнами рек Сура и Свияга. Так, штамм MG_1626 из локации 3, с одной стороны, по значению идентичности НП S-сегмента и по результатам филогенетического анализа выглядит более родственным штаммам из локаций 1 и 2, расстояние до которых составляет почти 150 км, с другой стороны, АП его N-белка полностью идентична АП N-белка штаммов из Барыша, расположенных на расстоянии более 100 км. Такая особенность генома штамма MG_1626 может быть признаком его происхождения от двух предковых форм. Однако для однозначного заключения о происхождении S-сегмента и всего генома штамма MG_1626 необходимо проведение исследований генома штаммов PUUV на прилегающих территориях.

Таким образом, можно считать установленным, что штаммы PUUV, циркулирующие в популяциях рыжей полёвки Предволжья РТ относятся к русской генетической линии и вместе со штаммами из Барышского района УО образуют на правом берегу Волги отдельную группу, генетически отличающуюся от групп штаммов, распространённых на левом берегу.

Список литературы

1. Иванис В.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом – проблема здравоохранения настоящего времени / В.А. Иванис, А.Ф. Попов, Г.С. Томилка, В.А. Фигурнов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. – №1. – С. 21–25.
2. Савицкая Т.А. Обзор хантавирусных инфекций в мире, эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. / Т.А. Савицкая, А.В. Иванова, Г.Ш. Исаева, И.Д. Решетников, Э. Кабве, В.А. Трифонов, В.Б. Зиатдинов, Д.В. Транквилевский, И.В. Серова, Н.В. Попов, О.Н. Скударева, И.В. Попова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – №2. – С. 62–70.
3. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.-F., Tordo N., Plyusnin A. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe // Viruses. – 2019. – 11. – Art. 679.

4. Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Kabwe E., Ismagilova R., Martynova E., Belyaev A., Shuralev E., Trifonov V., Savitskaya T., Isaeva G., Khaiboullina S., Rizvanov A., Morzunov S. Prevalence of the Puumala orthohantavirus Strains in the Pre-Kama Area of the Republic of Tatarstan, Russia // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – Art. 540.

5. Davidyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F., Knyazeva A.V., Martynova E.V., Ismagilova R.K., Trifonov V.A., Savitskaya T.A., Isaeva G.S., Urbanowicz R.A., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A., Morzunov S.P. The Distribution of Puumala orthohantavirus Genome Variants Correlates with the Regional Landscapes in the Trans-Kama Area of the Republic of Tatarstan // *Pathogens*. – 2021. – 10. – Art. 1169.

6. Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morozov V., Nikitin P., Khasanova S., Dzagurova T., Tkachenko E., Schmaljohn C. 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 // *Inf. Gen. Evol.* – 2003. – 3. – P. 245–257.

7. Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F., Ismagilova R.K., Martynova E.V., Ohlopkova O.V., Yurchenko Y.A., Savitskaya T.A., Isaeva G.S., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A., Morzunov S.P., Davidyuk Y.N. Analysis of Puumala orthohantavirus Genome Variants Identified in the Territories of Volga Federal District // *Trop. Med. Infect. Dis.* – 2022. – 7. – Art. 46.

8. Kariwa H., Tkachenko E.A., Morozov V.G., Seto T., Tanikawa Y., Kolominov S.I., Belov S.N., Nakamura I., Hashimoto N., Balakiev A.E. et al. Epidemiological Study of Hantavirus Infection in the Samara Region of European Russia // *J. Vet. Med. Sci.* – 2009. – 71 (12). – P. 1569–1578.

9. Kruger D.H., Figueiredo L.T.M., Song J.-W., Klempa B. Hantaviruses-Globally emerging pathogens. – *J. Clin. Virol.* – 2015. – 64. – P. 128–136.

10. Milholland M.T., Castro-Arellano I., Suzán G., Garcia-Peña G.E., Lee T.E., Rohde R.E., Aguirre A.A., Mills J.N. Global Diversity and Distribution of Hantaviruses and Their Hosts // *EcoHealth*. – 2018. – 15. – P. 163–208.

11. Mustonen J., Mäkelä S., Outinen T., Laine O., Jylhävä J., Arstila P.T., Hurme M., Vaheiri A. The pathogenesis of nephropathia epidemica: New knowledge and unanswered questions // *Antiviral Research.* – 2013. – 100. – P. 589–604.

12. Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheiri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution // *J. of Gen. Virol.* – 1996. – 77. – P. 2677–2687.

13. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – 30. – P. 2725–2729.