

Насыров Тимур Радикович

студент

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

Научно-исследовательский центр фундаментальных

и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-106792

**АНАЛИЗ ГЕНОМА ШТАММОВ PUUMALA ORTHOANTAVIRUS,
ВЫЯВЛЕННЫХ В БАВЛИНСКОМ РАЙОНЕ
РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН**

Аннотация: в статье проведён сравнительный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей S- и M-сегментов штаммов *Puumala orthoantavirus* из Бавлинского района Республики Татарстан. Установлено, что исследованные штаммы не имеют близкого родства с другими штаммами из Закамья Татарстана и, вероятно, могут относиться к отдельной группе штаммов, циркулирующих в бассейне реки Ик.

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

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПСАЛ-2030).

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – наиболее распространенное природно-очаговое заболевание в Российской Федерации, представляющее серьезную проблему в отношении санитарно-эпидемиологического благополучия населения [11]. Возбудителями ГЛПС являются представители семейства *Hantaviridae*, рода *Orthohantavirus*, резервуарами – различные мелкие млекопитающие, преимущественно грызуны. В России возбудителями ГЛПС в западной части страны являются ортохантавирусы *Dobrava-Belgrade* (DOBV) и *Puumala* (PUUV), в восточной – *Seoul* (SEOV) и *Hantaan* (HNTV) [10]. В период с 1978 по 2022 год в России было зарегистрировано 292079 случаев заболевания ГЛПС, более 98% из них – в европейской части страны. В течение всего периода наблюдений за ГЛПС, как правило, более 80% случаев заболевания приходится на Приволжский федеральный округ (ПФО). Так, в 2022 году в России было зарегистрировано 6952 случая заболевания, 6176 из них – на территории ПФО. Основным возбудителем ГЛПС в ПФО является PUUV, природным резервуаром для которого служит рыжая полёвка *Myodes glareolus* [11].

Генетический материал ортохантавирусов представлен тремя сегментами одноцепочечной антисмысловой РНК: малым – Small (S), средним – Medium (M), большим – Large (L), кодирующими нуклеокапсидный белок N, полипептид GPC (прекурсор поверхностных гликопротеинов Gn и Gc) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), соответственно [9].

В настоящее время в виде PUUV различают 8 генетических линий. В генетических линиях вируса также наблюдается большое разнообразие вариантов генома. В России распространены представители двух линий: штаммы финской линии (FIN) распространены на территориях Карелии и Западной Сибири,

штаммы русской линии (RUS) циркулируют на большей части территории европейской части России, в том числе в ПФО [5; 7]. Для линии RUS на данный момент определены последовательности участков генома штаммов PUUV из ряда субъектов ПФО [3; 4; 6; 7; 12], Республики Башкортостан (РБ) [7], Курской области [1]. Целью данной работы были выявление штаммов PUUV из Бавлинского района, находящегося в юго-восточной части Закамья и граничащего с РБ, выявление и анализ нуклеотидных последовательностей (НП) их S- и M-сегментов.

Замороженные образцы лёгочной ткани *Myodes glareolus*, пойманных в Бавлинском районе в 2020 году, были получены из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)». Для выделения общей РНК из лёгочной ткани был использован реагент «ExtractRNA» (Евроген, Россия). Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы «RNAscribe RT» (Биолабмикс, Россия). Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь «5× ScreenMix» (Евроген, Россия), последовательности использованных праймеров приведены в [3]. Полученные ПЦР продукты секвенировали по Сэнгеру в Междисциплинарном центре коллективного пользования КФУ. Для выравнивания НП и построения филогенетических деревьев использовалась программа MEGA v6.0 [8]. Для сравнительного и филогенетического анализа в качестве референсных использовали НП S- и M-сегментов и аминокислотные последовательности (АП) кодируемых полипептидов штаммов PUUV, принадлежащих к разным генетическим линиям и размещенные в электронной базе данных GenBank. При построении филогенетических деревьев применяли метод Maximum Likelihood и модель Tamura-Nei из программы MEGA v6.0 [8]. НП *Tula orthohantavirus* использовали в качестве внешней группы.

РНК ортохантавируса *Puumala* была выявлена в трёх образцах (MG2060, MG2061 и MG2066) лёгочной ткани рыжих полёвок, пойманных поблизости от с. Александровка, Бавлинского района. Для этих образцов были получены НП полной кодирующей области (CDS) S-сегмента длиной 1302 нуклеотида и участков CDS M-сегмента.

В результате сравнительного анализа НП полной CDS S-сегмента исследованных штаммов было установлено, что они идентичны на 100%. При сравнении их с НП S-сегмента штаммов PUUV генетической линии RUS из ряда регионов европейской части России значения идентичности находились в интервале от 88,4% до 95,5% (табл. 1). Значения идентичности НП при сравнении со штаммами, относящимися к финской (FIN), центрально-европейской (CE) и северо-скандинавской (N-SCA) генетическим линиям вируса, были заметно ниже: от 82,6% до 86,4% (табл. 1). Таким образом, выявленные штаммы из Бавлинского района относятся к генетической линии RUS.

Значения идентичности АП белка N были относительно выше и находились в интервалах 98,4–99,5% при сравнении со штаммами генетической линии RUS и 96,1–97,7% при сравнении со штаммами, относящимися к генетическим линиям FIN, CE, N-SCA (табл. 1). В АП белка N образцов из Бавлинского района были обнаружены две уникальные замены аминокислотного остатка Thr5Ala и Val34Met, произошедшие вследствие нуклеотидных замен A13G и G100A, соответственно.

Для анализа НП участка CDS M-сегмента и АП фрагмента белка GPC были использованы участки референсных штаммов и штамма MG2066 длиной 1014 нуклеотидов (поз. 1499–2512) и 338 аминокислотных остатков (поз. 487–824), соответственно. При сравнении НП участка M-сегмента штамма MG2066 со штаммами линии RUS из других регионов значения идентичности составили 84,5–92,4%, со штаммами линий FIN, CE, N-SCA – 80,4–83,8% (табл. 1).

По результатам сравнительного анализа АП фрагмента белка GPC штамма MG2066 значения идентичности составили: 95,3–98,5% при сравнении со штаммами генетической линии RUS и 90,8–95,6% при сравнении со штаммами генетических линий FIN, CE, N-SCA (табл. 1). В АП участка белка GPC исследованного образца были обнаружены пять уникальных замен аминокислотных остатков: Met495Thr, Arg634Lys, Ala665Ser, Ser692Cys и Trp732Gly, произошедших вследствие нуклеотидных замен T1524C, C1940A+G1941A, G2033T, C2115G и T2234G, соответственно.

Таблица 1

Значения идентичности НП полной CDS S-сегмента, участка CDS M-сегмента, АП белка N и фрагмента белка GPC исследованных штаммов из Бавлинского района и референсных штаммов разных генетических линий PUUV

	Генетическая линия PUUV								
	RUS						FIN	CE	N-SCA
	Предкамье, РТ	Западное Закамье, РТ	Восточное Закамье, РТ	Предволжье, РТ	Республика Башкортостан	Курская область			
S-сегмент									
НП	94,0– 94,7	93,5– 94,5	93,3– 94,3	94,0	95,5	88,4	85,5– 86,4	82,6– 84,0	84,5
АП	98,8– 99,5	99,3	98,8– 99,5	99,1	98,8– 99,1	98,4	96,5– 97,0	96,1– 97,7	96,5
M-сегмент									
НП	90,9– 92,3	90,2– 91,6	90,2– 92,4	90,6	84,5– 85,1	86,5	82,5– 83,8	80,4– 81,3	81
АП	97,6– 98,5	97,6– 98,5	97,0– 98,2	98,5	95,3– 96,7	97,3	95,6	90,8– 92,3	91,1

На филогенетическом дереве, построенном на основе НП полной CDS S-сегмента, исследованные штаммы не образуют общую субкладу с географически близкорасположенными штаммами из РТ (рис. 1). Они расположены вблизи ветки штаммов из РБ, образуя с ними субкладу «S1», что может свидетельство-

ВАТЬ О ВОЗМОЖНОМ БЛИЗКОМ РОДСТВЕ ЭТИХ ШТАММОВ.

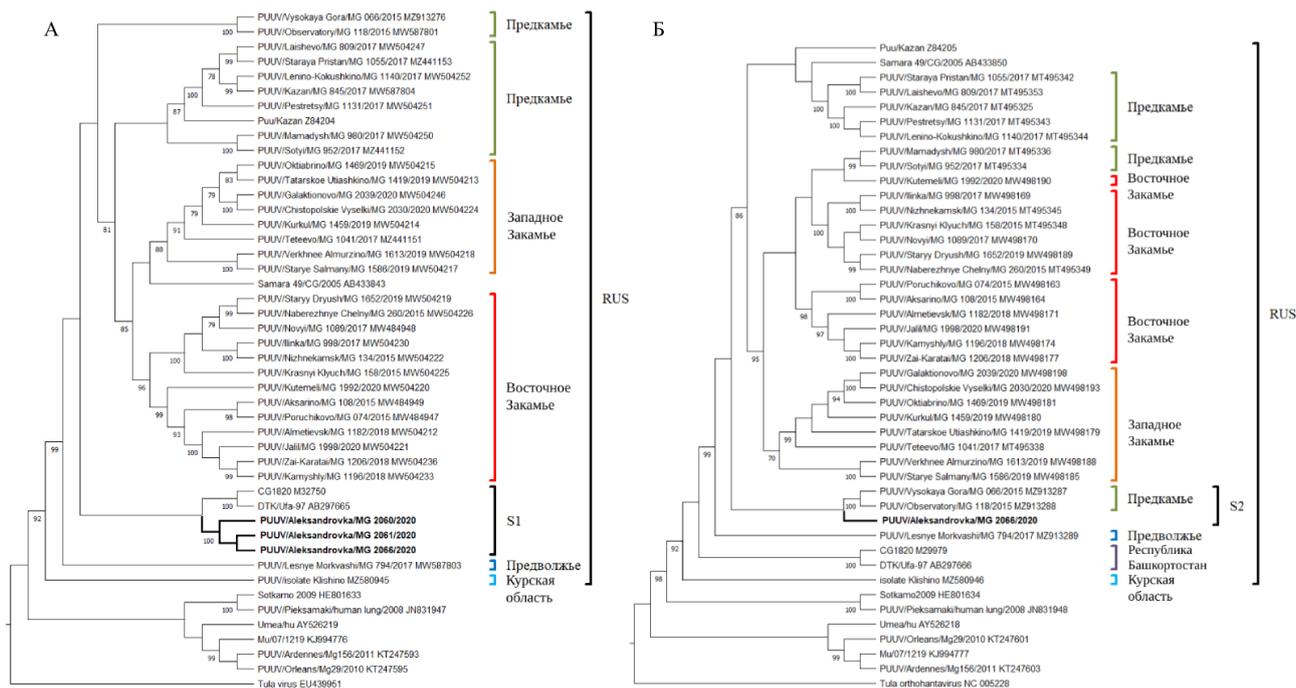


Рис. 1. Филогенетические деревья, построенные для: А – НП полной CDS S-сегмента PUUV; Б – участка CDS M-сегмента PUUV. Исследованные штаммы выделены жирным шрифтом

Филогенетическое дерево, построенное на основе НП участка CDS M-сегмента, топологически похоже на дерево S-сегмента (рис. 1). Однако штамм MG2066 из Бавлинского района не образует общую субкладу с географически близкорасположенными штаммами из РТ, а также не группируется со штаммами из РБ, что свидетельствует о меньшем родстве их М-сегмента по сравнению с S-сегментом. В то же время на дереве М-сегмента штамм MG2066 выглядит более близкородственным к штаммам из Зеленодольского (MG118) и Высокогорского (MG066) районов Предкамья РТ. Можно предположить, что разное положение ветки штаммов из Бавлинского района на филогенетических деревьях является признаком гибридного, в том числе реассортантного, происхождения их геномов.

Таким образом, в результате анализа НП и АП установлено, что исследованные штаммы PUUV из Бавлинского района не находятся в близком родстве с

географически близкорасположенными штаммами из восточного Закамья РТ. Подобное несоответствие генетической дистанции между штаммами PUUV и географического расстояния между территориями их распространения может являться результатом разнонаправленных миграционных потоков рыжей полёвки в постледниковый период. Согласно современной точке зрения, такие миграции происходили в общем направлении юг – север из приазовского рефугиума [2; 5] и юго-восток – северо-запад из южноуральского рефугиума [2]. В предложенной недавно гипотезе предполагается, что основные миграционные потоки проходили по долинам рек, а водоразделы служили препятствиями для миграций рыжих полёвок, что привело к географической и генетической изоляции штаммов PUUV из популяций рыжей полёвки, локализованных в долинах разных рек [4].

Так, с. Александровка, вблизи которого выявлены исследованные штаммы PUUV, находится в берегах р. Александровка, относящейся к бассейну реки Ик, в то время, как районы распространения референсных штаммов из Закамья расположены в долинах других рек. Если миграция рыжей полёвки в район с. Александровка произошла вверх по течению р. Ик и её притоков, то разделение миграционных потоков произошло достаточно давно, что могло привести к формированию ряда близкородственных генетических вариантов PUUV в бассейне р. Ик. В пользу предположения о возможной длительной независимой эволюции группы штаммов PUUV в бассейне р. Ик также свидетельствует наличие уникальных замен аминокислотных остатков у штаммов из Бавлинского района: двух в АП белка N и пяти в АП участка белка GPC.

Таким образом было установлено, что штаммы PUUV, циркулирующие в популяции рыжей полёвки поблизости от с. Александровка Бавлинского района, относятся к генетической линии RUS. Они также не являются близкородственными штаммам, распространенным в исследованных в настоящее время районах Закамья РТ, и, вероятно, могут относиться к генетически отличающейся группе штаммов, циркулирующих на территориях бассейна р. Ик.

Список литературы

1. 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 [et al.] // *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. – 2022. – Vol. 102. – Art. 105295
2. Castel G. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe / G. Castel, F. Chevenet, M. Razzauti, [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – Art. 679.
3. 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.] // *Pathogenes*. – 2020. – Vol. 9. – Art. 540
4. Davidyuk Y. The Distribution of Puumala orthohantavirus Genome Variants Correlates with the Regional Landscapes in the Trans-Kama Area of the Republic of Tatarstan / Y. Davidyuk, E. Kabwe, A. Shamsutdinov [et al.] // *Pathogenes*. – 2021. – Vol. 10. – Art. 1169.
5. 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: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. – 2003. – Vol. 3. – P. 245–257.
6. Kabwe E. Puumala Orthohantavirus Reassortant Genome Variants Likely Emerging in the Watershed / E. Kabwe, A.F. Shamsutdinov, S. Suleimanova [et al.] // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2023. – Vol. 24. – Art. 1018.
7. 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. – P. 1569–1578.
8. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / K. Tamura, G. Strecher, D. Peterson [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.
9. Vaheri A. Uncovering the mysteries of hantavirus infections / A. Vaheri, T. Strandin, J. Hepojoki [et al.] // *Nature reviews. Microbiology*. – 2013. – Vol. 11. – P. 539–550.

10. 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. - Vol. 1. – P. 21–25.

11. Савицкая Т.А. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. / Т.А. Савицкая, А.В. Иванова, Г.Ш. Исаева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023 – Vol. 1. – P. 85–95.

12. 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. – Vol. 4. – P. 150–156.