

Елбоева Полина Игоревна

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

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-106903

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМА PUUMALA ORTHOANTAVIRUS,
ВЫЯВЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ МОРДОВИЯ**

Аннотация: проведён молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей участков S- и M-сегментов штаммов *Puumala orthoantavirus*, полученных из трех локаций Республики Мордовия. Установлено, что выявленные штаммы относительно наиболее близкородственны штаммам из Курской области. Полученные результаты дают основания предположить, что штаммы PUUV, циркулирующие в Курской области и выявленные в Республике Мордовия могут относиться к отдельной сублинии в русской генетической линии вируса.

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

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

Ортохантавирусы вызывают хантавирусный кардиопульмональный синдром (ХКПС) и геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), распространённые в Новом и Старом Свете, соответственно [8]. Возбудителями ГЛПС являются ортохантавирусы *Dobrava-Belgrade*, *Hantaan*, *Seoul*, *Puumala* (PUUV) [10]. В России основным возбудителем ГЛПС является PUUV, переносимый рыжей полёвкой (*Myodes glareolus*) [12]. PUUV распространён в европейской части РФ, преимущественно в Приволжском Федеральном Округе (ПФО), где ежегодно регистрируется наибольшее количество случаев заболевания ГЛПС в России. Поэтому изучение генома PUUV остаётся актуальной задачей для решения вопроса о снижении уровня заболеваемости ГЛПС в ПФО. Республика Мордовия (РМ) входит в группу регионов ПФО со средним уровнем заболеваемости ГЛПС [1]. Однако на данный момент информация о геновариантах PUUV, циркулирующих в РМ, отсутствует. Поэтому целью работы было выявление и анализ вариантов генома в ряде локаций РМ.

Частицы ортохантавирусов представляют собой сферы, размером 120–160 нм, внутри которой находится геном, представленный сегментированной антисмысловой РНК [6]. Геном PUUV состоит из трех сегментов: S, M и L, кодирующих нуклеокапсидный белок (N белок), предшественника оболочечных гликопротеинов Gn и Gc (GPC) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), соответственно [7]. Для PUUV характерна высокая скорость накопления нуклеотидных замен в геноме, поэтому в настоящее время различают восемь генетических линий вируса, две из которых – финская (FIN) и русская (RUS) – распространены в России [9].

Замороженные образцы легочной ткани мелких грызунов, пойманных в РМ в 2021 г. были получены из Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)». Общую РНК выделили с помощью реагента TRIzol (Invitrogen Life Technologies, США) по методике производителя. Скрининг на наличие в образцах генома вирусной РНК проводили с использованием «Набора реагентов для выявления и идентификации РНК хантавирусов – возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом полимеразной цепной реакции в реальном времени» (Синтол, Россия). Для образцов, в которых была обнаружена РНК PUUV, синтезировали кДНК с использованием реагента RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя. ПЦР-амплификацию участков генома PUUV проводили с использованием смеси «5×Screen Mix» (Евроген, Россия) и праймеров, последовательности которых приведены в [4], а также праймеров собственной разработки. Разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Для очистки ПЦР-продуктов использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Секвенирование ПЦР-продуктов по Сэнгеру проводилось в Междисциплинарном центре коллективного пользования КФУ. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей (НП) по алгоритму Clustal W проводили с использованием программы MEGA6.0. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей (НП) штаммов PUUV проводили методом Maximum Likelihood с использованием Tamura-Nei model в программе MEGA6.0 [11]. В качестве референсных использовали НП штаммов, размещенных в базе данных GenBank.

Всего было получено НП S-сегмента длиной 645 нуклеотидов для 6 штаммов PUUV из трёх локаций и НП M-сегмента длиной 614 нуклеотидов для 3 штаммов PUUV из двух локаций.

В результате сравнительного анализа установлено, что разница между НП выявленных штаммов не превышала 0.7%, а различия в кодируемых секвенированным участком АП составили до 1.0%. По результатам сравнения с НП рефе-

ренсных штаммов наименьшее значение было получено для разницы между НП штаммов из РМ и Курской области (табл. 1).

Таблица 1

Значения разницы НП* участка S-сегмента между штаммами PUUV, циркулирующими в популяциях рыжей полевки РМ и референсными штаммами, относящимися к генетической линии RUS и циркулирующими в популяциях рыжей полевки ряда регионов европейской части России, %

Обозначение выявленных штаммов	РТ, Предкамье	РТ, Закамье	РТ, Предволжье	Ульяновская область	Самара	Курск	Башкирия
ML2922	12.8–14.8	13.2–15.7	13.5–14.5	13.8	14.1	<i>10.1–10.8</i>	13.6
ML2923	13.2–15.2	13.6–16.1	13.5–14.8	14.0	14.5	<i>10.5–11.1</i>	13.2
ML2924	12.8–14.8	13.2–15.7	13.5–14.5	13.8	14.1	<i>10.1–10.8</i>	13.6
ML2953	13.0–14.5	13.5–16.0	13.7–14.8	14.0	14.3	<i>10.3–11.0</i>	13.0
ML2992	12.8–14.8	12.8–15.3	13.0–14.5	13.4	13.6	<i>10.3–11.0</i>	12.8
ML2994	13.0–15.0	13.4–15.9	13.7–14.7	14.0	14.3	<i>10.3–10.7</i>	13.4

* – жирным шрифтом выделены минимальные значения разницы НП между исследованными и референсными штаммами PUUV

При сравнении с НП референсных штаммов генетических линий FIN, CE, N-SCA были получены значения разницы в интервале 14.5–19.9%, то есть заметно выше, чем при сравнении со штаммами русской генетической линии. Поэтому можно сделать вывод, что выявленные в РМ штаммы PUUV относятся к генетической линии RUS.

Разница АП между исследованными и референсными штаммами, относящимися к генетической линии RUS, составила 1,6–3,7%, а при сравнении со штаммами других генетических линий находилась в интервале 2,1–5,3%.

У штаммов из РМ в АП была обнаружена аминокислотная замена Thr79Ala, аналогичная замена обнаружена у штамма MG1710 из Предволжья РТ и двух штаммов из Курской области. Для большинства штаммов из РМ характерна замена Ile131Leu, обусловленная нуклеотидными мутациями A435C и

T437C (у штамма ML2992 выявлена только замена A435C). Кроме того, у исследуемых штаммов была обнаружена уникальная аминокислотная замена – Leu193Ile, которая возможно является молекулярным маркером для штаммов, циркулирующих в исследованных локациях РМ.

Выявленные в РМ штаммы PUUV оказались идентичными как по НП участка М-сегмента, так и по АП кодируемого полипептида. В результате сравнительного анализа установлено, что разница НП выделенных штаммов из РМ и Курской области составляет 11,0–12,4%, а со штаммами из регионов Поволжья – 13,3–18,2% (табл. 2). Разница НП исследуемых штаммов со штаммами генетических линий FIN, CE, N-SCA составила 17,0–22,3%.

Таблица 2

Значения разницы НП* участка М-сегмента между штаммами PUUV, циркулирующими в популяциях рыжей полевки РМ и референсными штаммами, относящимися к генетической линии RUS и циркулирующими в популяциях рыжей полевки ряда регионов европейской части России, %

Обозначение выявленных штаммов	РТ, Предкамье	РТ, Закамье	РТ, Предволжье	Ульяновская область	Самара	Курск	Башкирия
ML2922	13.3–17.3	15.3–17.3	15.4	15.1	15.6	<i>11.0–11.6</i>	15.0
ML2923	13.3–17.3	15.3–17.3	15.4	15.1	15.6	<i>11.0–11.6</i>	15.0
ML2994	13.8–17.9	15.9–18.2	16.0	15.3	15.3	<i>11.8–12.4</i>	17.4

* – жирным шрифтом выделены минимальные значения разницы НП между исследованными и референсными штаммами PUUV

Разница АП исследуемых штаммов с референсными штаммами из генетической линии RUS варьировала от 0,7 до 1,5%, тогда при сравнении со штаммами генетических линий FIN, CE, N-SCA этот показатель составил 1,5–6,2%.

На филогенетических деревьях, построенных для участков S- и М- сегментов, штаммы из РМ образуют единую субкладу – «Мордовия» (рис. 1, 2). Эта

субклада расположена на соседней ветке с субкладой, объединяющей штаммы из Курской области (рис. 1, 2), и вместе с ней отделена от субклад, включающих штаммы из регионов Поволжья. Таким образом, результаты сравнительного анализа НП и АП, а также филогенетического анализа дают основание полагать, что штаммы PUUV, выявленные в РМ, являются генетически относительно близкородственными штаммам из Курской области и, возможно образуют вместе с ними отдельную сублинию в генетической линии RUS [2].

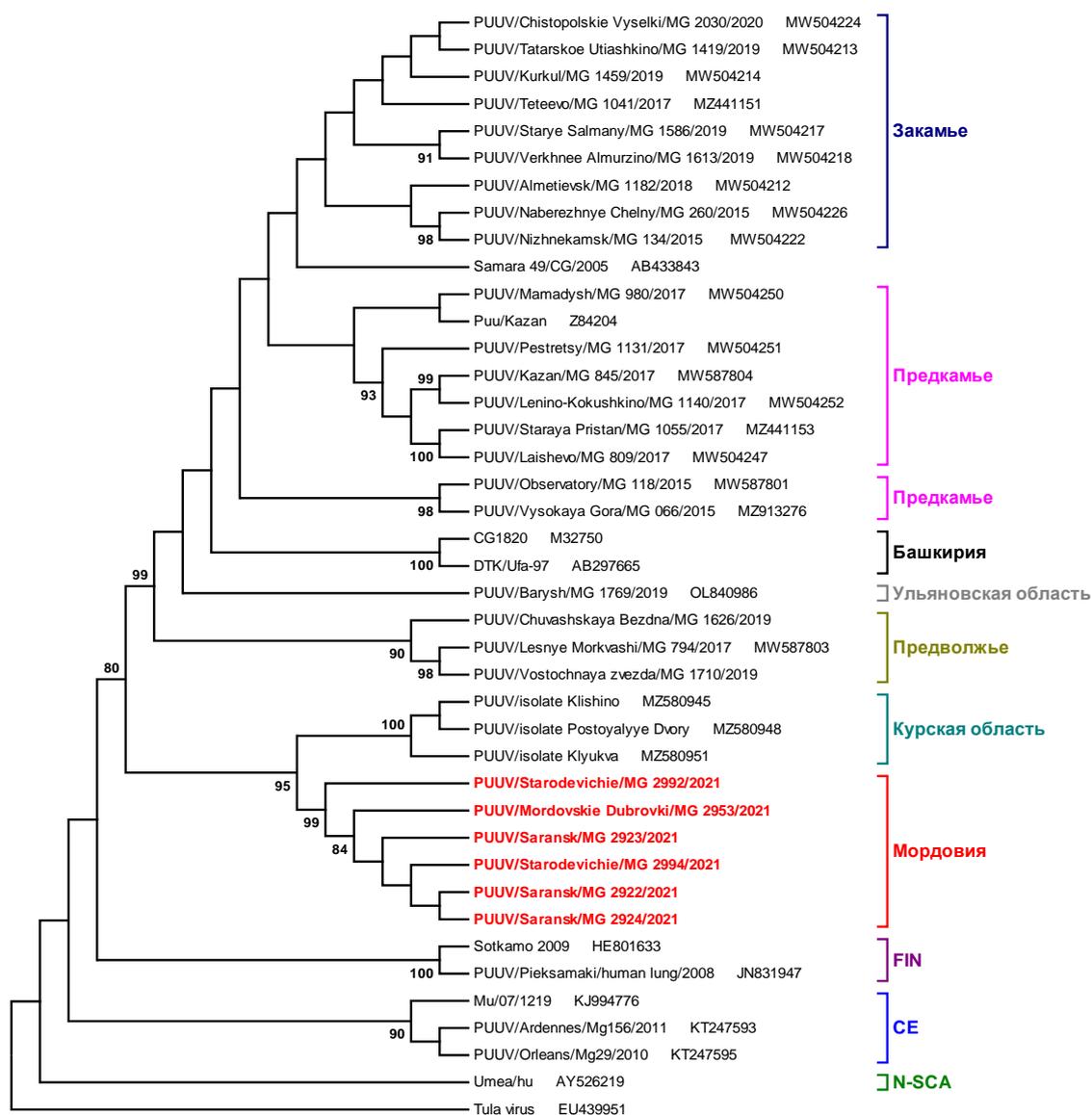


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для участка S-сегмента штаммов PUUV. Значения бутстрепов менее 70 не показаны

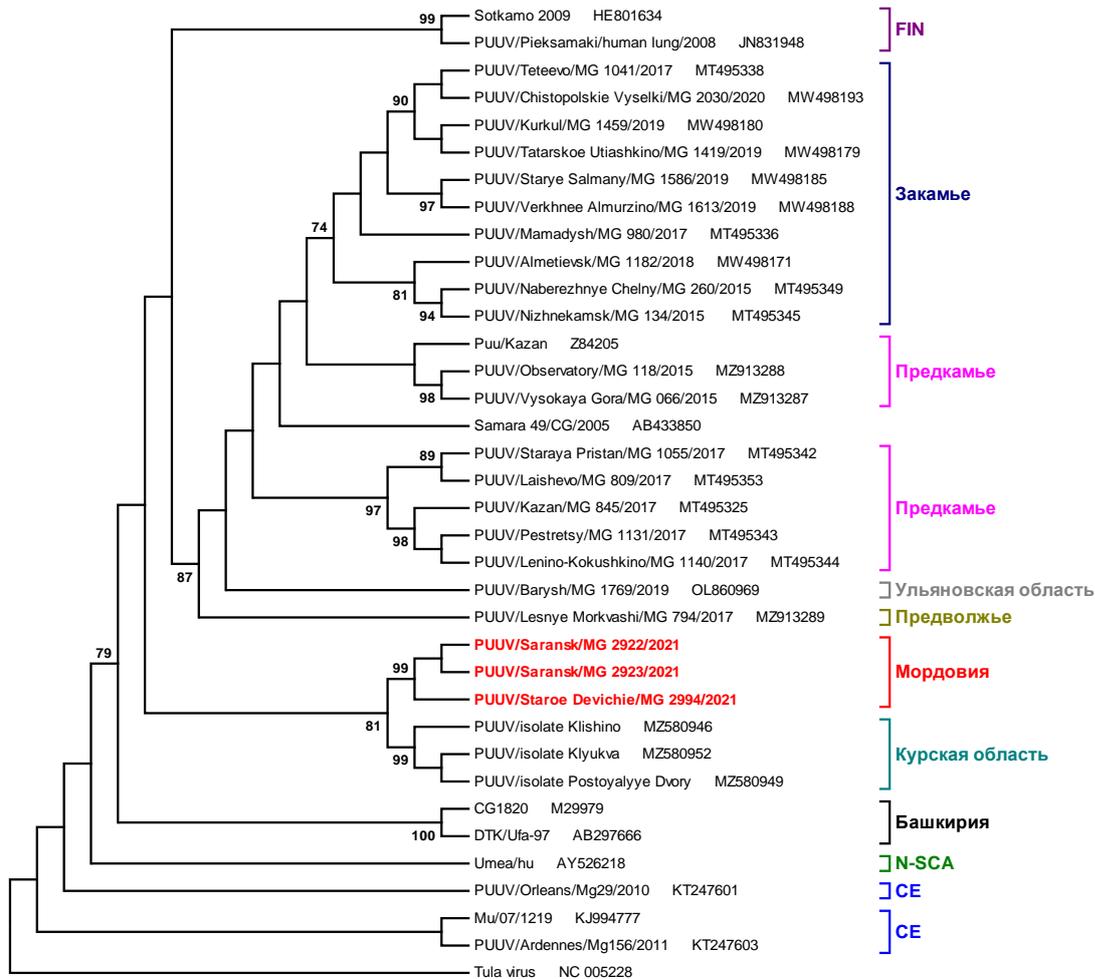


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное для участка М-сегмента штаммов PUUV. Значения бутстрепов менее 70 не показаны

Нужно отметить, что географически исследованные локации из РМ расположены намного ближе к районам циркуляции штаммов PUUV в Поволжье, чем к локациям из Курской области. Тем не менее генетическая разница между штаммами из РМ и Поволжья заметно выше, чем между штаммами из РМ и Курской области. Возможно, что такое распределение генетических вариантов PUUV является следствием миграций рыжих полёвок по Восточноевропейской равнине в пост-ледниковый период. Существуют предположения, что один из миграционных потоков двигался из Карпатского рефугиума в общем направлении «запад-восток» [3], а другой – из приазовского рефугиума в общем направлении «юг-север-северо-запад» [5; 9]. Представляется вероятным, что выявленные в РМ штаммы были принесены рыжими полёвками, двигавшимися

с запада, а в регионы Поволжья штаммы вируса были принесены миграциями полёвок с юга или юго-востока. Однако имеющихся результатов недостаточно для полного понимания причин выявленного распределения генетических вариантов PUUV в европейской части России.

Список литературы

1. 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. – Т. 1. – С. 85–95.

2. 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.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2022. – V. 102. – P. 105–111.

3. Castel G. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe / G. Castel, F. Chevenet, M. Razzauti [et al.] // Viruses. – 2019. – V. 11. – P. 679–687.

4. 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. – Art. 540.

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. – 2003. – V. 4. – P. 245–257.

6. Douglas K.O. Serological Evidence of Human Orthohantavirus Infections in Barbados, 2008 to 2016 / K O. Douglas, T.A. Samuels, M. Gittens-St. Hilaire // Pathogens. – 2021. – V. 10. – P. 571–584.

7. Drewes S. Identification of a novel hantavirus strain in the root vole (*Microtus oeconomus*) in Lithuania, Eastern Europe / S. Drewes, K. Jeske, P. Strakova [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2020. – V. 90. – P. 1–10.

8. Hägele S. Cells of the human respiratory tract support the replication of pathogenic Old World orthohantavirus Puumala / S. Hägele, C. Nussbag, A. Müller [et al.] // Virology Journal. – 2021. – V. 18. – P. 169–178.

9. Razzauti M. Microevolution of Puumala hantavirus in its host, the bank vole (*Myodes glareolus*): dis. M. Razzauti PhD; 24.02.12 / M. Razzauti, Haartman Institute Faculty of Medicine. – Helsinki, 2012. – 88 l.

10. Srisawat N. Tropical Infections Causing Acute Kidney Injury / N. Srisawat, S. Peerapornratana, S. Eiam-Ong // *Critical Care Nephrology*. – 2019. – V. 3 – P. 492–499.

11. Tamura K. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson [et al.] // *Molecular biology and evolution*. – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729.

12. Tkachenko E.A. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (History, problems and Research Perspectives) / E.A. Tkachenko, J.K. Dzagurova, A.D. Bernshtein [et al.] // *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. – 2016. – V. 15. – P. 23–34.