

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-111921

**ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА ШТАММОВ ORTHOHANTAVIRUS
PUUMALAENSE, ВЫЯВЛЕННЫХ В РЫБНО-СЛОБОДСКОМ РАЙОНЕ
РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН**

Аннотация: проведены сравнительный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей отдельных сегментов генома штаммов *Orthohantavirus puumlaense* из Рыбно-Слободского района Республики Татарстан. Установлено, что исследованные штаммы наиболее близкородственны штаммам из Мамадышского района, вместе с ними образуют отдельную группу в Предкамье, варианты генома которой, вероятно, имеют гибридное происхождение.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, *Orthohantavirus puumalaense*, S-сегмент, M-сегмент, L-сегмент, вариабельность генома, рекомбинация, реассортация.

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

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является самым распространённым природно-очаговым заболеванием вирусной этиологии в России и серьёзной угрозой для санитарно-эпидемиологического благополучия населения. За последние десять лет с 2013 по 2023 год в стране было задокументировано 77269 случаев заболевания ГЛПС [19]. Большая часть случаев заболевания ГЛПС ежегодно приходится на европейскую часть страны, в особенности на Приволжский федеральный округ (ПФО). Так, в 2023 году всего было зарегистрировано 5093 случая заболевания ГЛПС в РФ, 4313 из них – в ПФО [19]. Возбудители ГЛПС – представители рода *Orthohantavirus*, их природными резервуарами преимущественно являются мелкие млекопитающие, часто грызуны. Основной возбудитель ГЛПС в России – *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV), циркулирующий в популяциях рыжей полёвки (*Myodes glareolus*) [19].

Геном ортохантавирусов представлен тремя сегментами одноцепочечной РНК отрицательной полярности: малым – Small (S), средним – Medium (M) и большим – Large (L). Они кодируют нуклеокапсидный белок (N), прекурсор поверхностных гликопротеинов Gn и Gc (GPC) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), соответственно [8]. Таким образом, серьёзное влияние на увеличение генетического разнообразия ортохантавирусов оказывают как однонуклеотидные замены и обмен отдельными участками генома вследствие рекомбинации, так и обмен целыми сегментами (процесс реассортации) [8].

В настоящее время для PUUV выделяют 8 генетических линий. В европейской части России широко распространены представители линии RUS, в меньшей степени – FIN. Внутри генетических линий также наблюдается разнообра-

зие вариантов генома. Так, на данный момент исследованы нуклеотидные последовательности (НП) участков генома штаммов PUUV генетической линии RUS из ряда субъектов Центрального федерального округа [1; 2; 15], ПФО [2; 4; 5; 7; 9; 10; 16–18; 20], в частности, из ряда районов РТ [4; 5; 9; 18]. Однако некоторые районы РТ до настоящего времени остаются неизученными в отношении распространённых на их территориях штаммов вируса. Поэтому целью работы являлось выявление штаммов PUUV, циркулирующих в Рыбно-Слободском районе Республики Татарстан (РТ), и анализ нуклеотидных последовательностей их геномов.

Образцы ткани лёгких *M. glareolus*, отловленных в Рыбно-Слободском районе в 2023 году, были получены из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)». Для выделения суммарной РНК применяли «ExtractRNA» («Евроген», Россия). Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы «RNAscribe RT» («Биолабмикс», Россия). Для проведения ПЦР применяли «5× Screen Mix» («Евроген», Россия), НП использованных праймеров приведены в [4]. Секвенирование ПЦР-продуктов по Сэнгеру проводилось в Междисциплинарном центре коллективного пользования КФУ. РНК четырёх образцов были просеквенированы методом NGS Illumina в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» министерства науки и высшего образования России, г. Новосибирск, НИИ вирусологии, лаборатории геномики и эволюции вирусов. Первичную обработку данных NGS и сборку участков генома проводили в НИЛ «Омиксные технологии» ИФМиБ КФУ. Выравнивание НП, сравнительный анализ и построение филогенетических деревьев проводили в MEGA 11 [14]. При построении филогенетических деревьев применяли метод Maximum Likelihood, модель Tamura-Nei, количество бутстреп-повторений – 1000 [13]. В качестве референсных последовательностей использовали НП сегментов генома штаммов PUUV из других регионов РФ и из Финляндии, размещённые в электронной базе данных GenBank. В качестве внешней группы использовали НП сегментов *Orthohantavirus tulaense*. Для обнаружения возможного рекомбинантно-

го происхождения сегментов PUUV использовали методы MaxChi и Chimaera из программы RDP4 [11].

Из 21 образца тканей *M. glareolus* РНК ортохантавирусов была выявлена в пяти: от полёвок, пойманных вблизи с. Новый Арыш (MG3840, MG3841, MG3842), с. Кызыл-Юлдузский лесхоз (MG3830), с. Кукеево (MG3822) Рыбно-Слободского района РТ. Для этих образцов были получены НП полной кодирующей области (CDS) S-сегмента, а также участков CDS M- и L-сегментов. По результатам сравнительного анализа значения идентичности полученных НП S-, M- и L-сегментов выявленных штаммов составили 97,5–99,8%, 97,9–100,0% и 96,9–98,7%, соответственно; рассчитанных АП белка N, GPC и RdRp – 99,1–99,8%, 96,8–100,0% и 100,0%, соответственно. Значения идентичности, полученные при сравнении НП исследованных и референсных штаммов, представлены в таблице 1. По результатам сравнения НП CDS S-сегмента исследованных штаммов и референсных штаммов русской генетической линии из районов РТ значения идентичности превышали 93%, что позволяет сделать вывод о принадлежности исследованных штаммов к генетической линии RUS.

В рассчитанных АП белка N штаммов MG3841, MG3842 была выявлена уникальная аминокислотная замена Thr79Ala, произошедшая вследствие нуклеотидной замены A277G. Возможно, что эта мутация является специфичной для штаммов из данной локации.

На филогенетических деревьях, построенных для S- M-, L-сегментов (рис. 1–3), исследованные штаммы образуют отдельную субкладу «Рыбно-Слободский» и располагаются вблизи ветки штаммов из локаций Мамадышского района, но не из географически более близких локаций Пестречинского и Лаишевского районов. Это свидетельствует о более близком родстве исследованных штаммов с референсными штаммами из Мамадышского района, чем из Пестречинского и Лаишевского районов. На филогенетических деревьях для S- и L-сегментов штаммы субклады «Рыбно-Слободский» располагаются вблизи других штаммов из Предкамья, в то же время на дереве для M-сегмента они располагаются на одной ветке со штаммами из Закамья. Различное положение

исследованных штаммов на филогенетических деревьях может являться признаком гибридного происхождения их генома, в частности произошедших рекомбинации и/или реассортации [12].

Таблица 1

Значения идентичности НП CDS S-сегмента, участков CDS M- и L-сегментов, АП белка N, участков GPC и RdRp исследованных штаммов PUUV из Рыбно-Слободского района и референсных штаммов генетических линий RUS и FIN

| | | | S-сегмент | | M-сегмент | | L-сегмент | |
|-------------------------|-----|------------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|-----------------|
| | | | НП | АП | НП | АП | НП | АП |
| Генетическая линия PUUV | RUS | РТ, Предкамье, Пестречинский район | 94,8– 96,2 | 98,8– 100,0 | 93,7– 95,3 | 96,8– 100,0 | 93,7– 96,5 | 100,0– 100,0 |
| | | РТ, Предкамье, Лаишевский район | 94,4– 96,3 | 99,3– 100,0 | 93,2– 96,0 | 96,8– 100,0 | 94,4– 95,4 | 99,5– 100,0 |
| | | РТ, Предкамье, Мамадышский район | 96,9– 99,0 | 98,9– 100,0 | 96,0– 97,8 | 95,1– 100,0 | 96,9– 98,2 | 100,0– 100,0 |
| | | РТ, Западное Закамье | 94,1– 95,2 | 99,5– 99,1 | 92,7– 95,6 | 98,0– 100,0 | 91,7– 95,0 | 99,0– 99,5 |
| | | РТ, Восточное Закамье | 93,2– 94,2 | 98,6– 99,5 | 93,4– 96,2 | 98,0– 100,0 | 92,5– 95,1 | 99,0– 100,0 |
| | | РТ, Предволжье | 93,4– 94,9 | 98,5– 99,1 | 88,4– 90,0 | 96,8– 100,0 | н/о | н/о |
| | | Республика Башкортостан | 94,1– 94,9 | 98,5– 99,1 | 86,6– 86,8 | 98,3– 100,0 | 85,6– 86,1 | 98,5– 98,5 |
| | | Курская область | 87,8– 89,4 | 98,1– 98,6 | 86,7– 88,8 | 93,4– 96,8 | 84,8– 85,3 | 96,4– 96,5 |
| | FIN | | 85,9– 87,0 | 96,4– 97,4 | 86,0– 87,8 | 91,7– 95,9 | 82,5– 83,3 | 92,2– 92,6 |

При помощи программы RDP4 было выявлено, что S-сегмент исследованных штаммов может иметь рекомбинантное происхождение. По результатам анализа участки 1–500, 1136–1302 и 1–481, 1003–1302 штаммов MG3830, MG3822, MG3842 и MG3840, MG3841, соответственно, могли быть

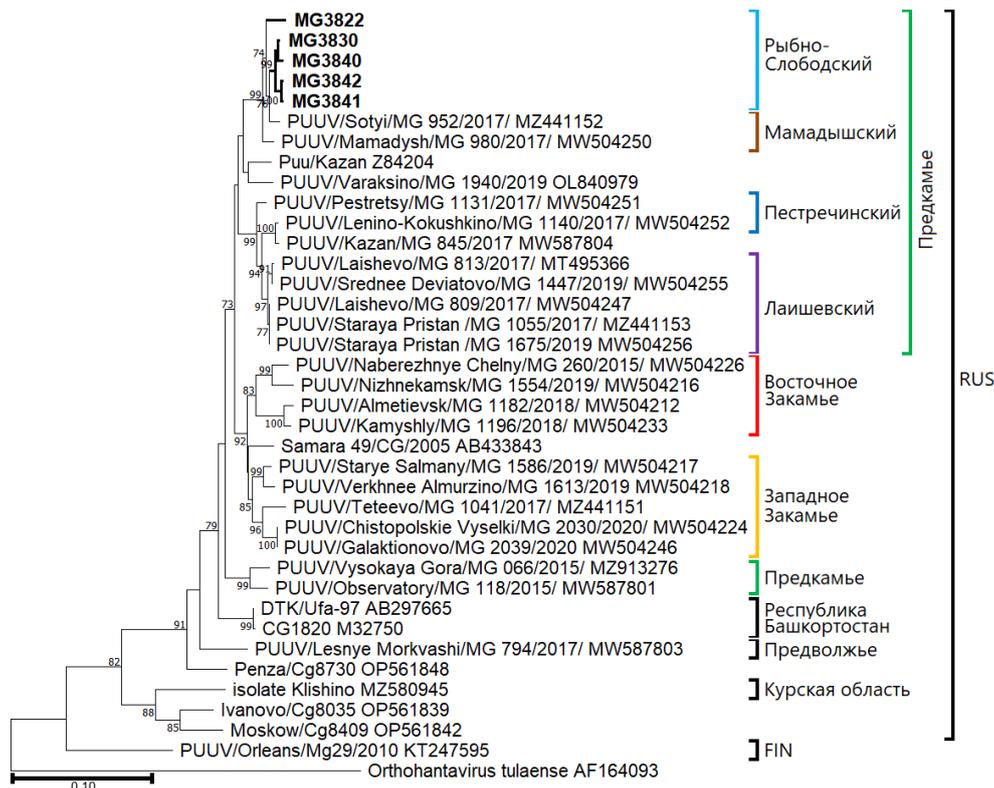


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для НП CDS S-сегмента PUUV длиной 1302 н. Исследованные штаммы выделены жирным шрифтом.

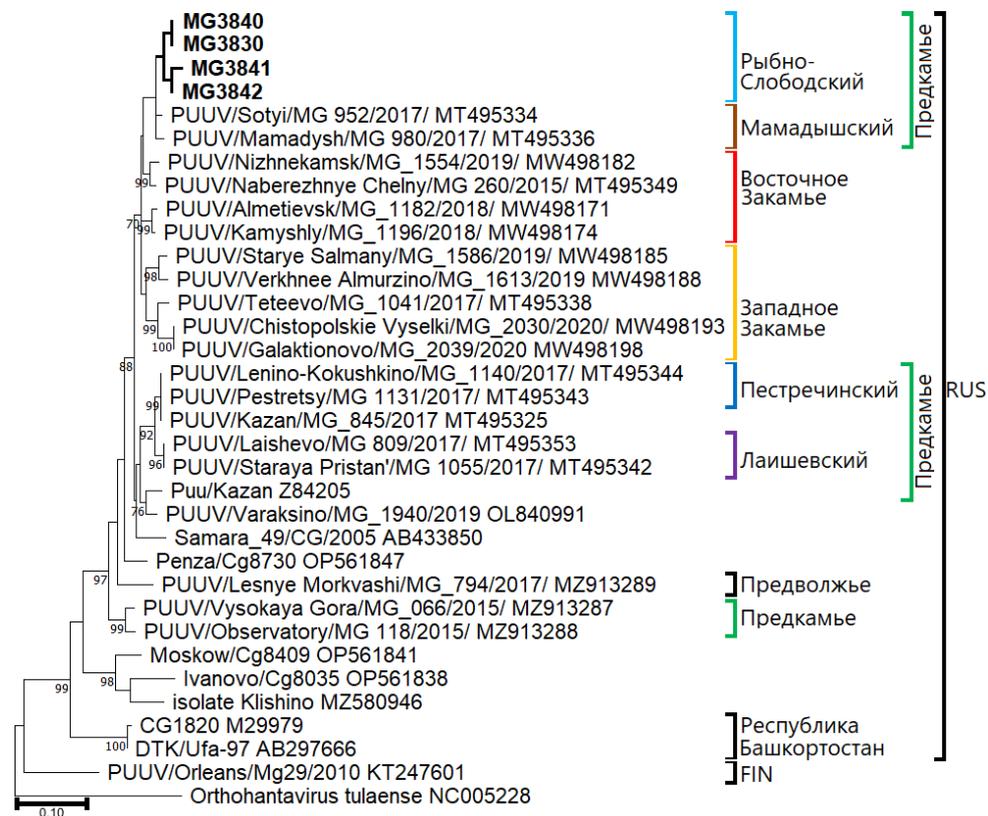


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное для НП участка M-сегмента PUUV длиной 1014 н. Исследованные штаммы выделены жирным шрифтом

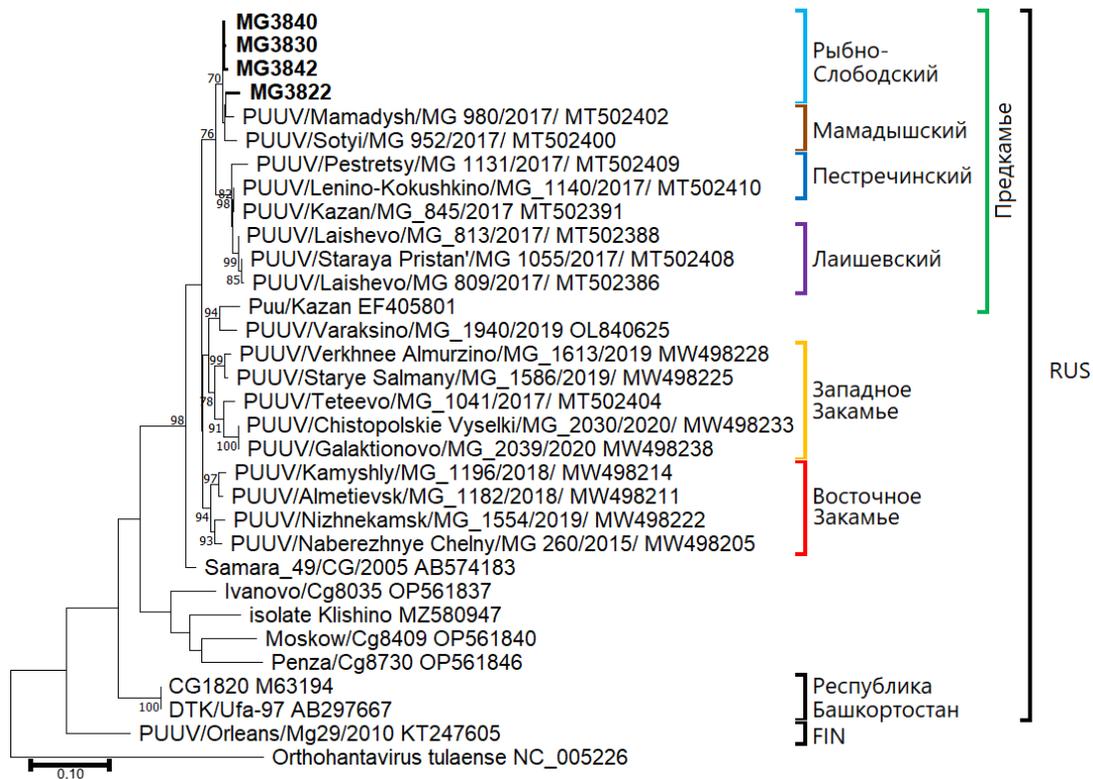


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное для участка L-сегмента PUUV длиной 605 н. Исследованные штаммы выделены жирным шрифтом

унаследованы от общего предка со штаммом из локации с. Тетеево РТ; другой участок S-сегмента – от общего предка со штаммом из Восточного Закамья. Также возможно, что участки 1–478 и 1145–1302 были унаследованы от предка штамма из Лаишевского района, участок 479–1144 – от предка штамма из Высокогорского района.

Согласно современной точке зрения, различия в топологии филогенетических деревьев разных сегментов могут являться следствием генетического обмена между различными группами штаммов PUUV [4]. Предполагается, что миграции рыжих полёвок происходят вдоль речных долин, а водоразделы служат географическим препятствием. При таких условиях могло произойти географическое и генетическое обособление групп штаммов PUUV, циркулирующих в популяциях рыжей полёвки в долинах разных рек [4]. Возможно, что такие группы на территории РТ сформировались в результате разнонаправленных миграционных потоков *M. glareolus* в постледниковый период с южного и с западного направлений из приазовского рефугиума [3; 6].

Наши результаты могут служить подтверждением данного предположения. Так, установлено, что исследованные штаммы PUUV из Рыбно-Слободского района РТ близкородственны штаммам из Мамадышского района, вместе они образуют отдельную группу штаммов в Предкамье. Геном исследованных штаммов может иметь рекомбинантное и реассортантное происхождение. Вероятно, территории, на которых в настоящее время циркулируют эти штаммы являются зоной контакта популяций рыжих полёвок, переносивших генетически отличные штаммы PUUV. Причиной возникновения этой зоны может являться пересечение двух разнонаправленных миграционных потоков *M. glareolus*. По всей видимости, один поток двигался с северо-западного направления, что объясняет генетическое родство по S- и L-сегментам исследованных штаммов со штаммами из долины реки Мёша. Вместе с тем близкое родство выявленных штаммов со штаммами из Закамья по M-сегменту может быть следствием независимой миграции полёвок в направлении юг-север. Дальнейшее расширение района исследований, идентификация штаммов PUUV и анализ их генома позволят точнее определить границы зоны контакта популяций *M. glareolus* в Предкамье и времени её возникновения.

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. – V. 102. – A. 105295. DOI 10.1016/j.meegid.2022.105295. EDN NCOMTU
2. Blinova E. Evolutionary Formation and Distribution of Puumala Virus Genome Variants, Russia / E. Blinova, A. Deviatkin, M. Makenov [et al.] // Emerging infectious diseases. – 2023. – V. 29. – P. 1420–1424. DOI 10.3201/eid2907.221731. EDN BOADFE
3. Castel G. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe / G. Castel, F. Chevenet, M. Razzauti [et al.] // Viruses. – 2019. – V. 11. – A. 679. DOI 10.3390/v11080679. EDN YYRSDB

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.] // Pathogenes. – 2020. – Vol. 9. – Art. 540.

5. 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. – V. 10. – A.1169.

6. 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. – V. 3. – P. 245–257. DOI 10.1016/S1567-1348(03)00088-1. EDN LHXOQX

7. 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. – V.7,3. – A.46. DOI 10.3390/tropicalmed7030046. EDN OWBQNB

8. Kabwe E. Orthohantaviruses, Emerging Zoonotic Pathogens / E. Kabwe, Y. Davidyuk, A. Shamsutdinov [et al.] // Pathogens. – 2020. – V. 9. – A.775. DOI 10.3390/pathogens9090775. EDN VKOBXG

9. 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. – V.24. – A.1018.

10. 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. – V. 71. – P. 1569–1578. DOI 10.1292/jvms.001569. EDN MWWRJH

11. Martin D.P. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes / D.P. Martin, B. Murrell, M. Golden [et al.] // Virus Evolution. – 2015. – V.1. – I.1.

12. 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.] // *The Journal of general virology*. – 2009. – V. 90. – P. 1923–1931. DOI 10.1099/vir.0.011304-0. EDN XXJCEK

13. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*. – 1993. – V.10. – P. 512–526. EDN ITKNLD

14. Tamura K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Strecher, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. – 2021. – V.38. – P. 3022–3027.

15. Блинова Е.А. Генетические особенности вируса Пуумала (Hantaviridae: Orthohantavirus), обнаруженного в Московской области / Е.А. Блинова, М.Т. Макенов, Е.С. Морозкин [и др.] // *Вопросы вирусологии*. – 2023. – №68. – С. 283–290. DOI 10.36233/0507-4088-177. EDN NUUNOK

16. Елбоева П.И. Молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генома Puumala orthohantavirus, выявленных в Республике Мордовия / П.И. Елбоева, Ю.Н. Давидюк // *Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии*. – 2023. – С. 57–65. DOI 10.31483/r-106903. EDN WPSFEI

17. 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. – №69. – С. 162–174.

18. Насыров Т.Р. Анализ генома штаммов Puumala orthohantavirus, выявленных в Бавлинском районе Республики Татарстан / Т.Р. Насыров, Ю.Н. Давидюк // *Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии*. – 2023. – С. 74–80. DOI 10.31483/r-106792. EDN AREWFO

19. Савицкая Т.А. Хантавирусные болезни: обзор эпидемиологической ситуации в мире. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. / Т.А. Савицкая, А.В. Иванова, А.А. Зубова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – №1. – С. 113–124.

20. 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. – №4. – С. 150–156. DOI 10.21055/0370-1069-2021-4-150-156. EDN DXXSEY