

Исмаилова Рузилья Камилевна

научный сотрудник

НИЛ Генетика микроорганизмов, 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-111922

**НОВЫЙ ВАРИАНТ ГЕНОМА ORTHOHANTAVIRUS PUUMALAENSE,
ВЫЯВЛЕННЫЙ У ШТАММОВ ВИРУСА ИЗ ТУЙМАЗИНСКОГО
РАЙОНА РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН**

Аннотация: по результатам проведённого сравнительного и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей участков генома установлено, что штаммы *Orthohantavirus puumalaense*, циркулирующие в Туймазинском Районе Республики Башкортостан наиболее родственны штаммам, выявленным ранее в Бавлинском районе Республики Татарстан, и входят в генетически обособленную группу штаммов, распространённых в долине реки Ик и, возможно, являющихся реассортантами. Особенности генома штаммов из этих двух районов могут быть доказательством в пользу выдвинутой ранее

гипотезы о независимой эволюции групп штаммов вируса в популяциях рыжей полёвки в пределах отдельных речных долин.

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

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

На протяжении последних десятилетий Приволжский федеральный округ (ПФО) является основным регионом распространения геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в Российской Федерации (РФ) [4]. В 2023 г. в ПФО было зарегистрировано 4313 случаев заболевания из общего количества 5093 случаев в стране. Основным возбудителем ГЛПС в ПФО является вирус *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV) из рода *Orthohantavirus* семейства *Hantaviridae*, переносимый рыжей полёвкой *Myodes glareolus* [4, 10].

Как и у других ортохантавирусов, геном PUUV состоит из трёх сегментов одноцепочечной РНК отрицательной полярности: малого (S), среднего (M) и большого (L), кодирующих нуклеокапсидный белок (N-белок), предшественник гликопротеинов Gn и Gc (GPC) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), соответственно [12]. Для генома PUUV характерна высокая вариабельность, результатом которой стало образование ряда генетических вариантов, получивших название генетических линий. Из восьми известных на сегодняшний день генетических линий две – русская (RUS) и финская (FIN) – распространены в РФ: RUS – на большей части европейской территории России (ЕТР), в том числе в ПФО, а FIN – на севере ЕТР и в Западной Сибири [13]. В настоящее время в литературе представлена информация о генетических вариантах PUUV, выявленных в ряде локаций Курской области [5], центрального региона [6], отдельных субъектов ПФО [1; 2; 11], в частности, Республики Татарстан [3, 7, 8]. Однако данные о вариантах генома PUUV, распространённых в Республике Баш-

кортостан (РБ), практически отсутствуют [9]. В то же время в 2023 г. в РБ было зарегистрировано 886 случаев заболевания, и по уровню заболеваемости (23,1 на 100 тыс. населения) РБ находилась на четвёртом месте в ПФО [4]. Поэтому изучение геномов штаммов PUUV, распространённых в РБ, является актуальной задачей, и целью исследования было определение генетических вариантов вируса, циркулирующих в Туймазинском районе республики.

Замороженные образцы лёгочной ткани рыжих полёвок, отловленных весной 2023 г. в окрестностях с. Серафимовский Туймазинского района РБ, были получены из Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Общую РНК из образцов выделяли с помощью реагента «ExtractRNA» (Евроген, РФ) согласно протоколу производителя. Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу «RNAscribe RT» (Биолабмикс, РФ) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-амплификацию участков генома PUUV проводили с использованием реакционной смеси «5× ScreenMix» (Евроген, РФ) и праймеров, последовательности которых приведены в [7]. Продукты ПЦР-амплификации разделяли методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле, целевые ПЦР-продукты очищали с использованием набора реагентов «Cleanup S-Cap» (Евроген, РФ) по методике производителя и секвенировали по Сэнгеру в Междисциплинарном центре коллективного пользования КФУ. Выравнивание нуклеотидных последовательностей (НП) проводили с использованием программы MEGA6.0 [14]. Референсными последовательностями служили НП сегментов генома штаммов PUUV разных генетических линий, размещенные в электронной базе данных GenBank, а также штаммов PUUV из ряда локаций РТ. Для построения филогенетических деревьев применяли метод Maximum Likelihood и модель Tamura-Nei из программы MEGA6.0 [14]. В качестве внешней группы использовали НП сегментов генома *Orthohantavirus tulaense*.

Из общего количества 13 образцов вирусная РНК была выявлена в четырёх. Для этих образцов были получены НП, идентифицированные как участки генома PUUV: полная кодирующая область (CDS) S-сегмента длиной 1302 н, участок CDS M-сегмента длиной 966 н и участок L-сегмента длиной 486 н. В

результате сравнительного анализа НП установлено, что наибольшие значения идентичности для участков S- и M-сегментов были получены при сравнении исследованных штаммов со штаммами PUUV, циркулирующими в окрестностях с. Александровка Бавлинского р-на РТ (табл. 1). Значения идентичности для S-сегментов, превышающие 92%, были получены при сравнении с референсными штаммами, распространёнными в различных локациях на территории РТ и РБ. Поскольку эти референсные штаммы относятся к генетической линии RUS, то можно сделать вывод, что и все исследованные штаммы PUUV также относятся к этой линии.

В то же время результаты сравнительного анализа участка M-сегмента продемонстрировали, что относительно высокие значения идентичности НП – более 90,9% – были получены при сравнении исследованных штаммов с референсными штаммами из РТ, а при сравнении со штаммами из РБ значения были значительно ниже – 85,0–85,9%. При сравнении НП L-сегмента исследованных штаммов с референсными значения идентичности в большинстве случаев не превышали 90,0% (табл. 1). Несмотря на значительный разброс значений идентичности НП исследованных и референсных штаммов PUUV из РТ и РБ для разных сегментов генома, результаты сравнительного анализа АП продемонстрировали высокие значения идентичности для всех кодируемых полипротеинов: от 98,6–100,0% для N-белка, до 95,7–98,8% для RdRp (табл. 1).

На филогенетических деревьях, построенных для НП S- и M-сегментов исследованные штаммы из с. Серафимовский Туймазинского района РБ группируются со штаммом из с. Александровка Бавлинского района РТ в одну субкладу «Долина р. Ик, РТ+РБ», так как оба населённых пункта расположены на берегах или поблизости от притоков реки Ик (рис. 1, рис. 2).

Таблица 1

Значения идентичности нуклеотидных (НП) и рассчитанных аминокислотных последовательностей (АП) исследованных штаммов PUUV из Туймазинского района РБ с последовательностями референсных штаммов, %.

Генетическая линия PUUV

	RUS								FIN
	Долина реки Ка- занка, РТ	Долина реки Мёша, РТ	Мамадышский район, РТ	Восточное Закамье, РТ	Западное Закамье, РТ	Бавлинский район, РТ	Республика Башкортостан	Курская область	
S-сегмент									
НП	93,9– 94,2	93,5– 95,1	93,6– 95,2	92,6– 94,9	93,2– 94,8	97,3– 99,2	95,1– 95,4	87,9– 88,8	85,8– 86,7
АП	98,8– 100,0	98,6– 99,8	99,1– 99,8	98,6– 99,8	99,1– 99,8	99,5– 100,0	98,6– 99,5	98,4– 99,1	96,3– 97,5
M-сегмент									
НП	92,0– 92,7	92,2– 93,2	91,4– 92,0	91,9– 93,3	90,9– 92,8	98,6– 98,8	85,0– 85,9	86,0– 86,7	83,2– 84,8
АП	98,8– 99,4	98,8– 99,4	99,1– 99,7	98,4– 99,7	98,8– 99,7	99,4– 99,7	96,3– 98,1	98,1– 98,8	96,5– 96,9
L-сегмент									
НП	85,4– 87,2	86,2– 88,7	86,4– 88,5	86,2– 87,9	84,6– 87,2	н/о	89,9– 90,5	84,6– 85,6	80,5– 82,1
АП	95,7– 96,9	96,9– 98,8	97,5– 98,8	96,3– 98,8	96,9– 98,8	н/о	97,5– 98,1	94,4– 96,3	92,6– 93,8

На дереве, построенном для НП участка L-сегмента, исследованные штаммы также расположены на отдельной ветке, образуя отдельную субкладу, также названную «Долина р. Ик, РТ+РБ» (рис. 3). При этом на деревьях для S- и L-сегментов самой близкорасположенной к этой субкладе является субклада «РБ», включающая референсные штаммы из Башкирии, а на дереве M-сегмента субклада «Долина р. Ик, РТ+РБ» находится на отдельной ветке, с которой соседствуют ветки субклад, содержащих штаммы из различных частей РТ, а субклада «РБ» является более отдалённой. Таким образом, топология дерева M-сегмента отличается от топологии двух других сегментов, что может быть признаком реассортантного происхождения исследованных штаммов из Туймазинского района.



Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для НП полной CDS S-сегмента.

Значения бутстрепов меньше 70 не показаны.

Исследованные штаммы выделены красным цветом

В целом, исследованные штаммы из Туймазинского района РБ вместе с референсным штаммом из Бавлинского района РТ образуют отдельную группу, обозначенные на рис. 1, рис. 2 и рис. 3 как субклада «Долина р. Ик, РТ+РБ» генетически обособленную от географически близкорасположенных групп штаммов из Западного и Восточного Закамья РТ.

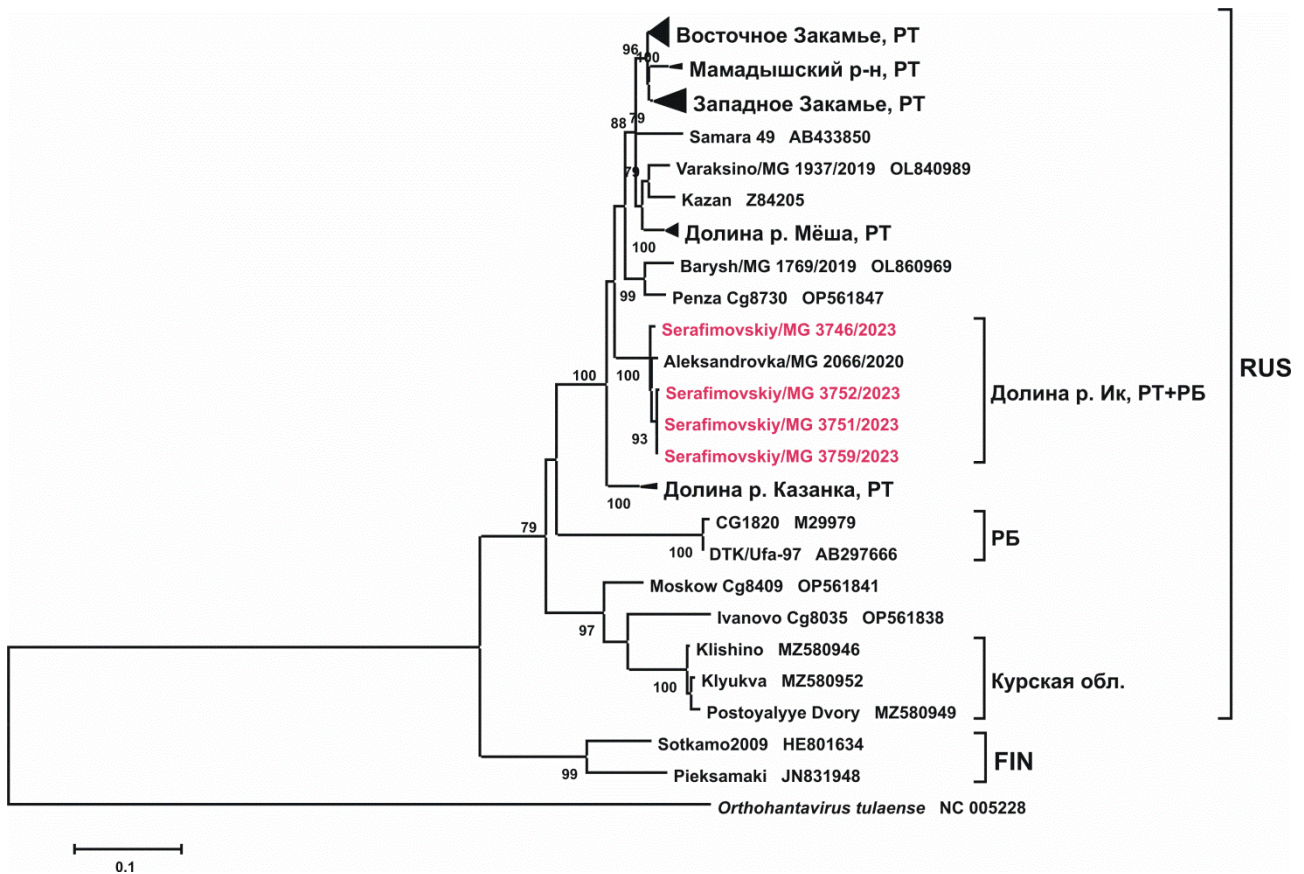


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное для НП участка CDS длиной 966 н М-сегмента. Значения бутстрепов меньше 70 не показаны.

Исследованные штаммы выделены красным цветом

В предыдущей работе мы предположили, что миграции рыжей полёвки в пост-ледниковый период происходили вдоль речных долин, что привело к образованию генетически отличающихся групп штаммов PUUV [8]. Полученные результаты подтверждают это предположение: и с. Александровка Бавлинского района РТ, и с. Серафимовский Туймазинского района РБ расположены в бассейне р. Ик, отделённом водоразделами от бассейнов соседних рек Мензели на западе и Белой – на востоке. При этом нужно отметить, что в целом штаммы из субклады «Дolina р. Ик, РТ+РБ» по значениям идентичности НП S-сегмента более близки к референсным штаммам из РБ, чем к штаммам из Закамья РТ, по значениям идентичности НП М-сегмента – наоборот, ближе к штаммам из Закамья, чем к штаммам из РБ, а по значениям идентичности L-сегмента – несколько ближе к штаммам из РБ, однако эти значения не превышают 90,5% (табл. 1). Разница в значениях идентичности НП разных сегментов может сви-

детельствовать, прежде всего, о более низкой скорости молекулярной эволюции S-сегмента генома PUUV и о большем давлении отбора на него по сравнению с двумя другими сегментами.

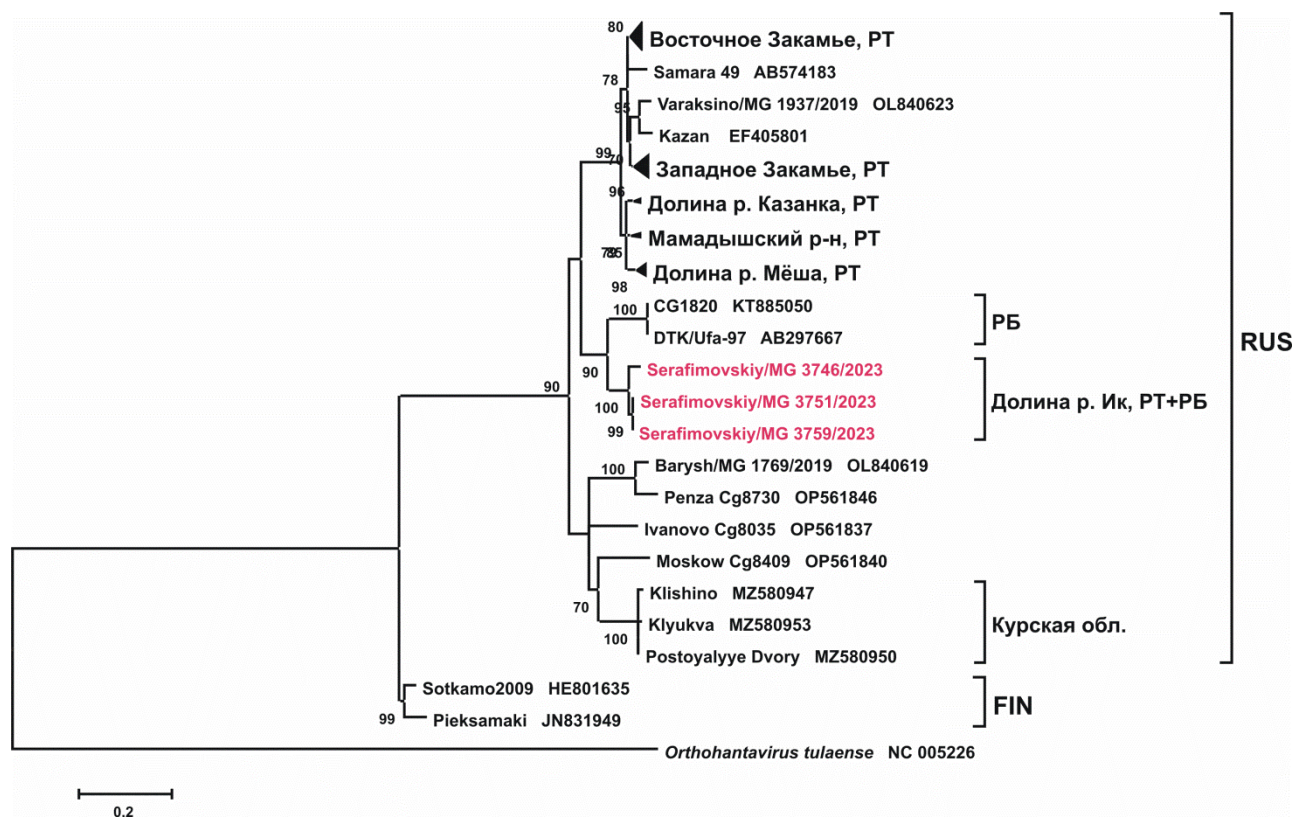


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное для НП участка CDS длиной 486 н L-сегмента. Значения бутстрепов меньше 70 не показаны.

Исследованные штаммы выделены красным цветом

Кроме того, относительно низкие значения идентичности НП M- и L-сегментов исследованных штаммов с референсными НП из РТ и РБ могут быть итогом как достаточно длительной независимой эволюции штаммов PUUV в долине р. Ик, так и результатом гибридного происхождения их геномов вследствие реассортации. Возможными вариантами в таком случае может быть унаследование M-сегмента штаммами из долины р. Ик от общего предка со штаммами из Закамья и/или получение L-сегмента от неизвестного варианта генома PUUV, по всей видимости, распространённого на неисследованной до настоящего времени территории РТ или РБ. В целом, выявленные особенности генома штаммов из Туймазинского района могут быть свидетельством их принадлеж-

ности к отдельной суб-линии генетической линии RUS, отличающейся от трёх суб-линий, идентифицированных Блиновой с соавт. [6]. Для проверки этого предположения необходимо проведение дальнейших исследований по выявлению вариантов генома PUUV, циркулирующих на ещё неизученных территориях РТ и РБ.

Список литературы

1. 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: сборник материалов VI Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием (Ульяновск, 22 мая 2023 г.) / гл. ред. Е.И. Антонова; Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова. – Чебоксары: Среда, 2023. – 260 с. DOI 10.31483/r-106903. EDN WPSFEI

2. 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.

3. 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: сборник материалов VI Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием (Ульяновск, 22 мая 2023 г.) / гл. ред. Е.И. Антонова; Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова. – Чебоксары: Среда, 2023. – 260 с. DOI 10.31483/r-106792. EDN AREWFO

4. 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. – 2024. – №1. – С. 113–124. DOI 10.21055/0370-1069-2024-1-113-124. EDN WVTEWS

5. Blinova E., Deviatkin A., Kurashova S. [et al.] A fatal case of haemorrhagic fever with renal syndrome in Kursk Region, Russia, caused by a novel Puumala virus clade // *Infect. Gen. Evol.* – 2022. – Vol. 102. – Art. 105295. DOI 10.1016/j.meegid.2022.105295. EDN NCOMTU

6. Blinova E., Deviatkin A., Makenov M. [et al.] Evolutionary formation and distribution of Puumala virus genome variants, Russia. // *Emerg. Inf. Dis.* – 2023. – Vol.29, No7. – P. 1420–1424. DOI 10.3201/eid2907.221731. EDN BOADFE

7. Davidyuk Y., Shamsutdinov A., Kabwe E. [et al.] Prevalence of the Puumala orthohantavirus Strains in the Pre-Kama Area of the Republic of Tatarstan, Russia. // *Pathogens.* – 2020. – Vol. 9. – Art. 540. DOI 10.3390/pathogens9070540. EDN TMAUFS

8. Davidyuk Y.N., Kabwe E., Shamsutdinov A.F. [et al.] The Distribution of Puumala orthohantavirus genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan // *Pathogens.* – 2021. – Vol.10. – Art. 1169. DOI 10.3390/pathogens10091169. EDN NPFRJL

9. Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A. [et al.] 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. – Vol. 3. – P. 245–257. DOI 10.1016/S1567-1348(03)00088-1. EDN LHXOQX

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

11. Kabwe E., Al Sheikh W., Shamsutdinov A.F. [et al.] Analysis of Puumala orthohantavirus genome variants identified in the territories of Volga federal district. // *Trop. Med. Infect. Dis.* – 2022. Vol. 7. – Art.46. DOI 10.3390/tropicalmed7030046. EDN OWBQNB

12. Pluysnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution // *J. Gen. Virol.* – 1996. – Vol. 77. – P. 2677–2687. DOI 10.1099/0022-1317-77-11-2677. EDN LOMDBD

13. Razzauti M., Plyusnina A., Niemimaa J. [et al.] Co-circulation of two Puumala hantavirus lineages in Latvia: a Russian lineage described previously and a novel Latvian lineage // *J. Med. Virol.* – 2012. – Vol. 84. – P. 314–318. DOI 10.1002/jmv.22263. EDN XZWJYZ

14. Tamura K., Strecher G., Peterson D. [et al.] MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.