

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

Губарец Дарья Сергеевна

студентка

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

DOI 10.31483/r-138807

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА ШТАММОВ

ORTHOHANTAVIRUS PUUMALAENSE, ВЫЯВЛЕННЫХ

В КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

***Аннотация:** проведен молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей участков трех сегментов генома штаммов Orthohantavirus puumalaense (PUUV), выявленных у рыжих полёвок в Кировской области. Установлено, что штаммы принадлежат к сублинии East-FIN финской генетической линии PUUV.*

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

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

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – опасная зоонозная инфекция, широко распространённая в России. Только в 2024 году в стране было зарегистрировано 3 396 случаев заболевания [11]. Следует отметить, что более 84,6% от всех отмеченных случаев ГЛПС приходится на Приволжский федеральный округ (ПФО), где эндемичными являются все 14 субъектов [12]. При этом Кировская область занимает 7-е место в округе по показателям заболеваемости [10].

Ортохантавирусы – оболочечные вирусы с трёхсегментным отрицательным одноцепочечным РНК-геномом. Сегменты S, M, и L кодируют белок нуклеокапсида (N), предшественника гликопротеинов оболочки G_n и G_c (GPC) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), соответственно [4].

Основным возбудителем ГЛПС в России является *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV), циркулирующий в популяциях рыжей полёвки (*Clethrionomys glareolus*). На сегодня выявлено восемь генетических линий вируса PUUV, среди которых наиболее распространены на территории России финская (FIN) и русская (RUS) линии [2]. Внутри генетических линий также наблюдается значительная вариативность генома. Генетическое разнообразие PUUV, включая появление новых вариантов, связано с точечными мутациями, рекомбинацией и реассортацией генома [8]. Однако механизмы эволюции вируса, определяющие возникновение в том числе патогенных для человека штаммов, изучены недостаточно, в особенности на неисследованных территориях. Поэтому целью работы была идентификация штаммов PUUV в Кировской области и анализ их геномов.

Образцы лёгочной ткани рыжих полёвок, отловленных в 2023 году в Кировской области, были предоставлены ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)». Выделение общей РНК из легочной ткани проводили с использованием реагента «ExtractRNA» («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Для детекции вирусной РНК в полученных образцах выполняли ОТ-ПЦР с набором «БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×)» («Биолабмикс», Россия). На этапе синтеза кДНК использовали обратную тран-

скриптазу «RNAscribe RT» («Биолабмикс», Россия). Для проведения ПЦР применяли «5× Screen-mix» («Евроген», Россия) и праймеры собственной разработки. Разделяли ПЦР-продукты в 1,0% агарозном геле. Очистку ПЦР-продуктов выполняли набором «Cleanup S-Car» («Евроген», Россия). Секвенирование амплифицированных фрагментов S- и L-сегментов проводили по методу Сэнгера в Междисциплинарном центре коллективного пользования Казанского федерального университета (КФУ). Для участков M-сегмента применяли нанопоровое секвенирование, выполненное в ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии». Для обработки результатов нанопорового секвенирования использовалась программа Unipro UGENE v51.0 [7]. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей (НП) и построения филогенетических деревьев использовался метод Maximum Likelihood и модель Tamura-Nei из программы MEGA v12.0.7 [6]. В качестве референсных были использованы НП, размещённые в электронной базе данных GenBank. Последовательности участков сегментов генома *Orthohantavirus tulavense* (TULV) использовали в качестве внешней группы.

Всего в работе были исследованы образцы лёгочной ткани 58 особей рыжих полевков. В 7 образцах от полёвок, отловленных в Юрьянском и Слободском р-нах, была выявлена вирусная РНК. Для этих образцов были получены НП S-сегмента длиной 618 нд для 5 штаммов, M-сегмента длиной 740 нд для 7 штаммов и L-сегмента длиной 574 нд для 6 штаммов.

В результате сравнительного анализа НП участков S-, M- и L-сегментов наименьшие значения различий (5–8%) были получены при сравнении исследованных штаммов со штаммом Arkhangelsk/Cg8594 из окрестностей д. Мотоусовская, Устьянского района Архангельской области, относящимся к генетической линии FIN, к сублинии East-FIN по классификации Блиновой с соавт [1]. Несколько большие значения разницы НП (8–11%) были получены при сравнении со штаммом Tyumen/Cg8928 из окрестностей с. Преображенка, Тобольского района Тюменской области, также принадлежащим к сублинии East-FIN. При этом значения дивергенции с RUS, CE, N-SCA, LAT генетиче-

скими линиями PUUV и сублинией West-FIN оказались более значительными: 18–27% для S-сегмента, 20–24% для M-сегмента и 19–24% для L-сегмента (таблица 1).

Таблица 1

Значения различий НП участков S-, M- и L-сегментов и АП белка N, полипептида GPC и белка RdRp исследуемых и референсных штаммов различных генетических линий и сублиний (%)

	Генетическая линия/сублиния PUUV							
	RUS		CE	N-SCA	LAT	FIN		
	Volga-RUS	W-RUS				West-FIN	East-FIN	
							Arkhangelsk/Cg8594	Tyumen/Cg8928
S-сегмент, поз. 727–1344*								
НП	23–27	24–25	21	24	22	18–21	5–6	8–9
АП	5–6	4	4	4	3	2–3	0,5–1,5	0,5–1,5
M-сегмент, поз. 1910–2649*								
НП	20–21	21–22	22	24	24	21–23	7	8–9
АП	4–5	5	8	8	9	4–5	0,4–0,8	0,8–1,2
L-сегмент, поз. 1561–2134*								
НП	19–23	20–21	21	24	20	22	7–8	10–11
АП	1–3	1–2	3–4	6	2	3–4	0,5–1,1	1,6–2,1

* – Позиции указаны по референсным последовательностям штамма Puu/Kazan Z84204, Z84205 и EF405801 для S-, M- и L-сегментов, соответственно.

По результатам сравнительного анализа АП установлено, что значения дивергенции между исследованными штаммами и генетическими линиями RUS (сублиниями Volga-RUS, W-RUS), CE, N-SCA, LAT и FIN (сублинией West-FIN) составляют для S-, M- и L-сегментов 2–6%, 4–9%, 1–6%, соответственно. Между тем, с генетической линией FIN (сублинией East-FIN) исследуемые штаммы различались значительно меньше – 0,5–1,5% для S-сегмента, 0,4–1,2% для M-сегмента и 0,5–2,1 для L-сегмента (табл. 1).

Таким образом, результаты сравнительного анализа НП и АП исследованных штаммов из Кировской области позволяют сделать вывод об их принадлежности к сублинии East-FIN финской генетической линии PUUV.

В результате филогенетического анализа установлено, что исследованные штаммы из Кировской области и референсные штаммы сублинии East-FIN содержат в геноме S-сегмент, близкородственный сублинии West-FIN, и M- и L-сегменты, менее родственные с сублинией West-FIN (рисунок 1, рисунок 2, рисунок 3).

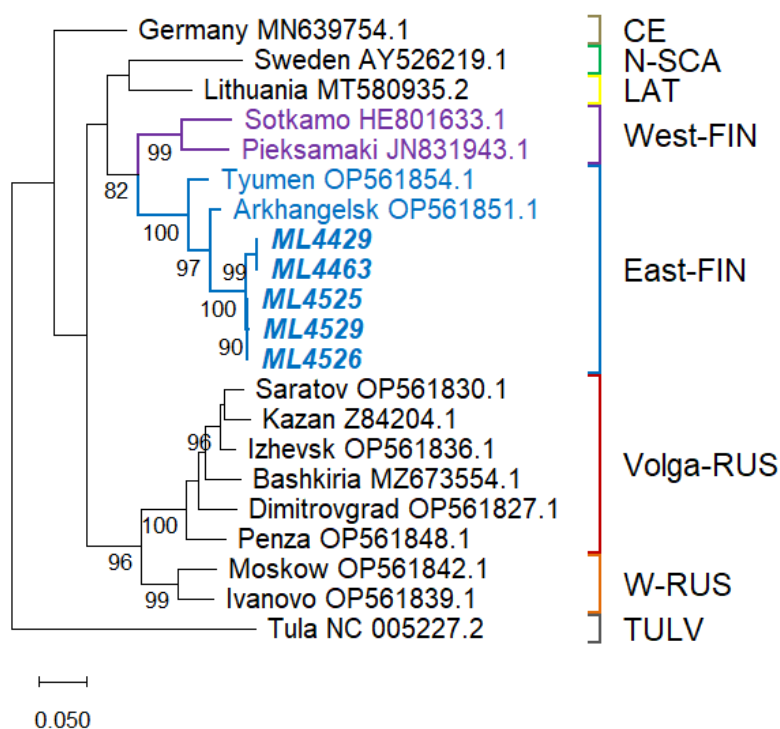


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для НП участка S-сегмента PUUV. Исследованные штаммы выделены голубым цветом и жирным курсивным шрифтом. Референсные штаммы сублинии West-FIN выделены фиолетовым цветом

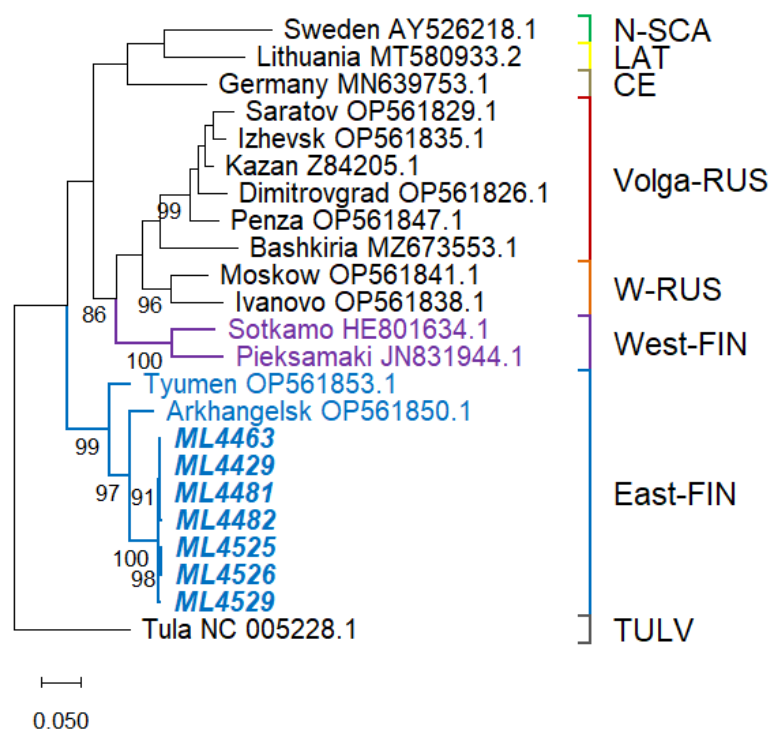


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное для НП участка М-сегмента PUUV. Исследованные штаммы выделены голубым цветом и жирным курсивным шрифтом. Референсные штаммы сублинии West-FIN выделены фиолетовым цветом

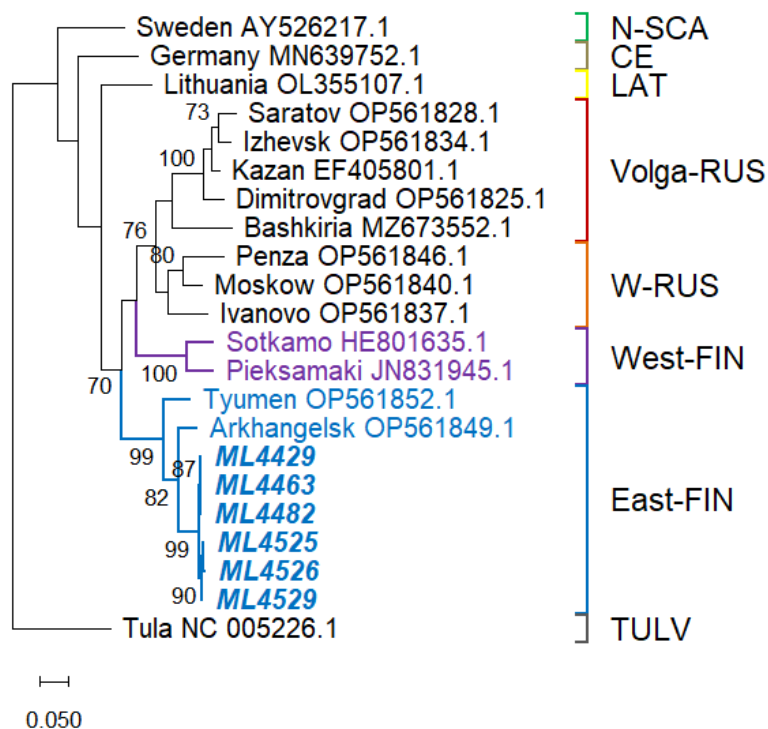


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное для НП участка L-сегмента PUUV. Исследованные штаммы выделены голубым цветом и жирным

курсивным шрифтом. Референсные штаммы сублинии West -FIN выделены фиолетовым цветом

Можно предположить, что сублинии East-FIN и West-FIN происходят от общего предка, который в процессе эволюции разделился на две группы штаммов. Первая группа эволюционировала независимо и сформировала сублинию East-FIN. Вторая группа в результате миграции рыжей полёвки из уральского рефугиума в направлении Финляндии (поток 3), согласно гипотезе Castel *et al.*, пересеклась с группой штаммов линий RUS и/или LAT, переносимых потоком 2 из района Карпатских гор в направлении Прибалтики и южной Финляндии [2]. В результате процессов рекомбинации и реассортации произошёл обмен генетическим материалом M- и L-сегментов с русской и/или латвийской линией вируса и сформировалась сублиния West-FIN. При этом исходный S-сегмент, общий с сублинией East-FIN, сохранился в геноме. Однако для проверки этого предположения требуются дополнительные исследования и сравнительный анализ геномов штаммов PUUV из разных регионов, прежде всего с северо-запада европейской части России.

Нужно отметить, что штаммы PUUV сублинии East-FIN обнаружены на территории ПФО впервые. На большей части ПФО распространены штаммы генетической линии RUS: причём в Республике Татарстан, Республике Башкортостан, Удмуртской Республике, Ульяновской, Пензенской, Самарской, Саратовской областях циркулируют штаммы сублинии Volga-RUS [1; 3; 5], а в Республике Мордовия – штаммы сублинии W-RUS [9]. Штаммы, исследованные в данной работе, обнаружены в локациях, расположенных приблизительно в 50 км севернее и северо-восточнее г. Киров. Ранее было установлено, что штаммы, выявленные в окрестностях г. Ижевск, относятся к генетической линии RUS [5]. Поэтому можно предположить, что на территории между г. Киров и г. Ижевск располагается «зона контакта» между финской и русской генетическими линиями PUUV, где возможно возникновение гибридных генетических

вариантов вируса. Однако для её обнаружения необходимы дальнейшие исследования.

Список литературы

1. Blinova E. Evolutionary Formation and Distribution of Puumala Virus Genome Variants, Russia / E. Blinova, A. Deviatkin, M. Makenov [et al.] // Emerging infectious diseases. 2023. Vol. 29. Pp. 1420–1424. DOI 10.3201/eid2907.221731. EDN BOADFE
2. Castel G. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe / G. Castel, F. Chevenet, M. Razzauti [et al.] // Viruses. 2019. Vol. 11. P. 679. DOI 10.3390/v11080679. EDN YYRSDB
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.] // Pathogens. 2020. Vol. 9. P. 540. DOI 10.3390/pathogens9070540. EDN TMAUFS
4. Jiang H. Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture / H. Jiang, X. Zheng, L. Wang [et al.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2016. Vol. 6. P. 1. DOI 10.3389/fcimb.2016.00001. EDN YWLWKF
5. 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. Vol. 7. P. 46. DOI 10.3390/tropicalmed7030046. EDN OWBQNB
6. Kumar S. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing / S. Kumar, G. Stecher, M. Suleski [et al.] // Molecular Biology and Evolution. 2024. Vol. 41. P. 263. DOI 10.1093/molbev/msae263. EDN XJLZTL
7. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // Bioinformatics. 2012. Vol. 28. Pp. 1166–1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091. EDN PDNJNV

8. 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.

9. Елбоева П.И. Молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генома Puumala orthohantavirus, выявленных в Республике Мордовия: сборник трудов конференции / 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

10. Зырянов П.М. Обзор численности носителей и переносчиков зоонозов, эпизоотической и эпидемиологической обстановки в Приволжском федеральном округе в 2024 г. и прогноз на I полугодие 2025 г. / П.М. Зырянов, А.Н. Матросов, А.В. Иванова // ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://microbe.ru/files/PFO_rev2024_prog2025_I.pdf (дата обращения: 12.04.2025).

11. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом // Официальный портал органов власти Чувашской Республики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://zivil.cap.ru/news/2025/03/17/gemorragicheskaya-lihoradka-s-rochechnim-sindromom> (дата обращения: 12.04.2025).

12. 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. – С. 113–124. DOI 10.21055/0370-1069-2024-1-113–124. EDN WVTEWS