

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

Степанкова Дарья Андреевна

младший научный сотрудник

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

DOI 10.31483/r-138904

НОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ВАРИАНТ ORTHOHANTAVIRUS PUUMALAENSE, ВЫЯВЛЕННЫЙ В ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ

***Аннотация:** в статье проведён сравнительный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участков S-, M- и L-сегментов генома штаммов Orthohantavirus puumalaense, выявленных на территории Оренбургской области. У данных штаммов обнаружен новый вариант генома, возможно, относящийся к отдельной сублинии русской генетической линии вируса.*

***Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, Orthohantavirus puumlaense, геном, S-сегмент, M-сегмент, L-сегмент.*

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

Одним из самых распространенных природно-очаговых заболеваний, представляющих угрозу для населения на территории Российской Федерации, является геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), возбудителями которой служат вирусы из рода *Ortohantavirus*. На протяжении последних десятилетий Приволжский Федеральный Округ (ПФО) лидирует по заболеваемости ГЛПС в стране, в среднем на его долю приходится 85% всех зарегистрированных случаев. Основным возбудителем ГЛПС на территории ПФО является *Ortohantavirus puumalaense* (PUUV), переносимый рыжей полёвкой (*Clethrionomys glareolus*), поэтому изучение генома вируса является актуальной задачей для разработки мер по снижению уровня заболеваемости на территории округа и повышению эффективности лечения [9].

Геном ортохантавирусов представлен сегментированной одноцепочечной «минус»-РНК, заключенной в сферы диаметром 120–160 нм [5]. Он включает в себя три сегмента: S (малый), M (средний) и L (большой), кодирующих нуклеокапсидный белок (N-белок), предшественника оболочечных гликопротеинов Gn и Gc (GPC) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), соответственно [5]. Генетическое разнообразие PUUV, обусловленное как заменами нуклеотидов, так и процессами рекомбинации и реассортации, привело к формированию у вируса 8 генетических линий, две из которых – русская (RUS) и финская (FIN) – выявлены на территории России [2; 6].

Заболеваемость ГЛПС в Оренбургской области относительно невысока [8] и до настоящего времени эта область оставалась одним из регионов ПФО, в которой не проводилось исследований по выявлению PUUV, поэтому целью работы было определение генетических вариантов вируса, распространённых на территории области.

Замороженные образцы лёгочной ткани особей рыжей полевки, отловленных в Оренбургской области в 2024 году, были получены из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)». Выделение РНК проводили с использованием реагента «ExtractRNA» («Евроген», Россия). Для синтеза кДНК применяли обратную транскриптазу «RNAscribe RT» («Биолаб-

микс», Россия). ПЦР проводили с использованием «5× Screen Mix» («Евроген», Россия) и праймеров собственной разработки. ПЦР-продукты разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле. Очистку полученных ПЦР-продуктов проводили с использованием набора «Cleanup S-Cap» («Евроген», Россия). Секвенирование ПЦР-продуктов по Сэнгеру проводилось в Междисциплинарном центре коллективного пользования КФУ. Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей (НП) выявленных штаммов PUUV проводили в программе MEGA6.0 [7]. Построение филогенетических деревьев проводили методом Maximum Parsimony с использованием Tamura Nei model в программе MEGA6.0, количество бутстреп-повторений – 1000 [7]. Для сравнительного и филогенетического анализа использовали референсные последовательности штаммов PUUV, относящихся к разным генетическим линиям, из базы данных GenBank. НП сегментов генома *Orthohantavirus tulaense* (TULV) использовали в качестве внешней группы.

Ортохантавирусная РНК была выявлена в одном образце ткани рыжей полёвки из Медногорского городского округа (с. Русаево) и трёх образцах из Кувандыкского городского округа (с. Новокурс). Для четырёх штаммов были определены НП полной кодирующей области (CDS) S-сегмента, для двух штаммов – участка CDS M-сегмента длиной 495 нуклеотидов (нд) и для одного штамма – участка CDS L-сегмента длиной 533 нд.

По результатам сравнительного анализа было установлено, что значения идентичности НП S-сегмента не превышали 90,9% при сравнении исследованных штаммов со всеми референсными (Таблица 1). Для сравниваемого участка M-сегмента эти значения составили 94,4–95,2% при сравнении с референсными штаммами из центральной Башкирии («DTK/Ufa-97», «strain K27», «CG1820» и «CG17 Baskiria-2001») и не превышали 86,6% при сравнении с остальными референсными штаммами. В случае участка L-сегмента значения идентичности НП равнялись 94,7% при сравнении с референсными штаммами из центральной Башкирии, 90,8–91,2% при сравнении со штаммами из Туймазинского района Башкирии и менее 87,8% при сравнении с остальными штаммами генетической

линии RUS (табл. 1). Значения идентичности с НП штаммов финской, северо-скандинавской (N-SCA) и центральноевропейской (CE) линий находились в интервале 82,0–84,6%. При сравнении НП участков генома выявленных штаммов с штаммом TULV эти значения были меньшими, чем 76%. Таким образом, можно сделать вывод, что выявленную в образцах лёгочной ткани ортоханта-вирусную РНК можно идентифицировать как РНК PUUV.

Результаты сравнительного анализа соответствующих аминокислотных последовательностей (АП) продемонстрировали, что значения идентичности АП N-белка находились в интервале 98,2–99,1% при сравнении со штаммами генетической линии RUS и менее 97,0% при сравнении со штаммами из других генетических линий. При сравнении АП участка GPC установлено, что значения идентичности исследованных штаммов с референсными штаммами из центральной Башкирии составили 98,2–100,0%, а с остальными референсными штаммами: 96,4–98,2% – при сравнении со штаммами генетической линии RUS, 95,8–98,2% – при сравнении со штаммами линии FIN и 93,3–95,2% – при сравнении со штаммами из других линий. Похожая картина наблюдалась при сравнении АП участка RdRp: значения идентичности составили 99,4% – при сравнении со штаммами из центральной Башкирии, 96,0–98,9% – при сравнении со штаммами русской генетической линии, 93,8–96,6% – при сравнении со штаммами финской линии и 91,0–94,4% при сравнении со штаммами других линий (Таблица 1).

Таблица 1

Значения идентичности НП участков S-, M- и L-сегментов и АП соответствующих белков исследованных штаммов PUUV из Оренбургской области

	<i>Генетическая линия/сублиния PUUV</i>						
	<i>RUS</i>			<i>CE</i>	<i>N-SCA</i>	<i>FIN</i>	
	<i>Volga-RUS</i>	<i>Башкирия</i>	<i>W-RUS</i>			<i>West-FIN</i>	<i>East-FIN</i>

S-сегмент, поз. 43–1344*							
НП	89,2–90,9	87,2–88,8	83,5–83,7	85,1–85,3	86,6–87,1	86,1–86,6	
АП	98,2–99,1	98,4–98,6	95,9–96,3	96,1	96,5–97,0	96,5	
М-сегмент, поз. 2018–2512*							
НП	83,8–86,6	84,6–95,2	83,4–84,8	81,2–82,8	81,2	82,8–83,2	82,6–84,4
АП	97,0–97,6	96,4–100	97,0–97,6	94,5–95,2	93,3–93,9	97,6–98,2	95,8–97,0
L-сегмент, поз. 1030–1562*							
НП	87,1–89,9	90,8–94,7	83,9–87,8	83,9–84,4	82,0	83,9–84,6	83,7–84,1
АП	96,0–97,7	98,9–99,4	96,6–98,3	93,8–94,4	91,1	93,8	96,0–96,6

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

Филогенетические деревья, построенные для участков S-, M- и L-сегментов заметно топологически отличаются. Так, на дереве S-сегмента, выявленные штаммы хотя и находятся на отдельной ветке, отдалённой от референсных штаммов из Башкирии и соседней по отношению к субкладе Volga-RUS (по классификации Блиновой с соавт [1]), однако относятся к кладе RUS (Рисунок 1), возможно представляя собой отдельную сублинию. В то же время на дереве L-сегмента ветка штамма из Оренбургской области находится внутри субклады, объединяющей штаммы из центральной (субклада «Башкирия») и западной (Туймазинский район) Башкирии, что свидетельствует об их близком родстве. Эта субклада расположена между субкладами Volga-RUS и W-RUS, что позволяет отнести L-сегмент исследованного штамма к русской генетической линии, возможно, к отдельной сублинии (рис. 2). Однако на дереве M-сегмента исследованные штаммы и штаммы из центральной Башкирии объединены в отдельную субкладу, расположенную вне клады, объединяющей штаммы сублиний Volga-RUS и W-RUS (рис. 3). Это даёт основания для предположения, что M-сегмент исследованных штаммов имеет реассортантное и/или рекомбинантное происхождение и может относиться как к отдельной сублинии в линии RUS, так и к отдельной линии вируса.

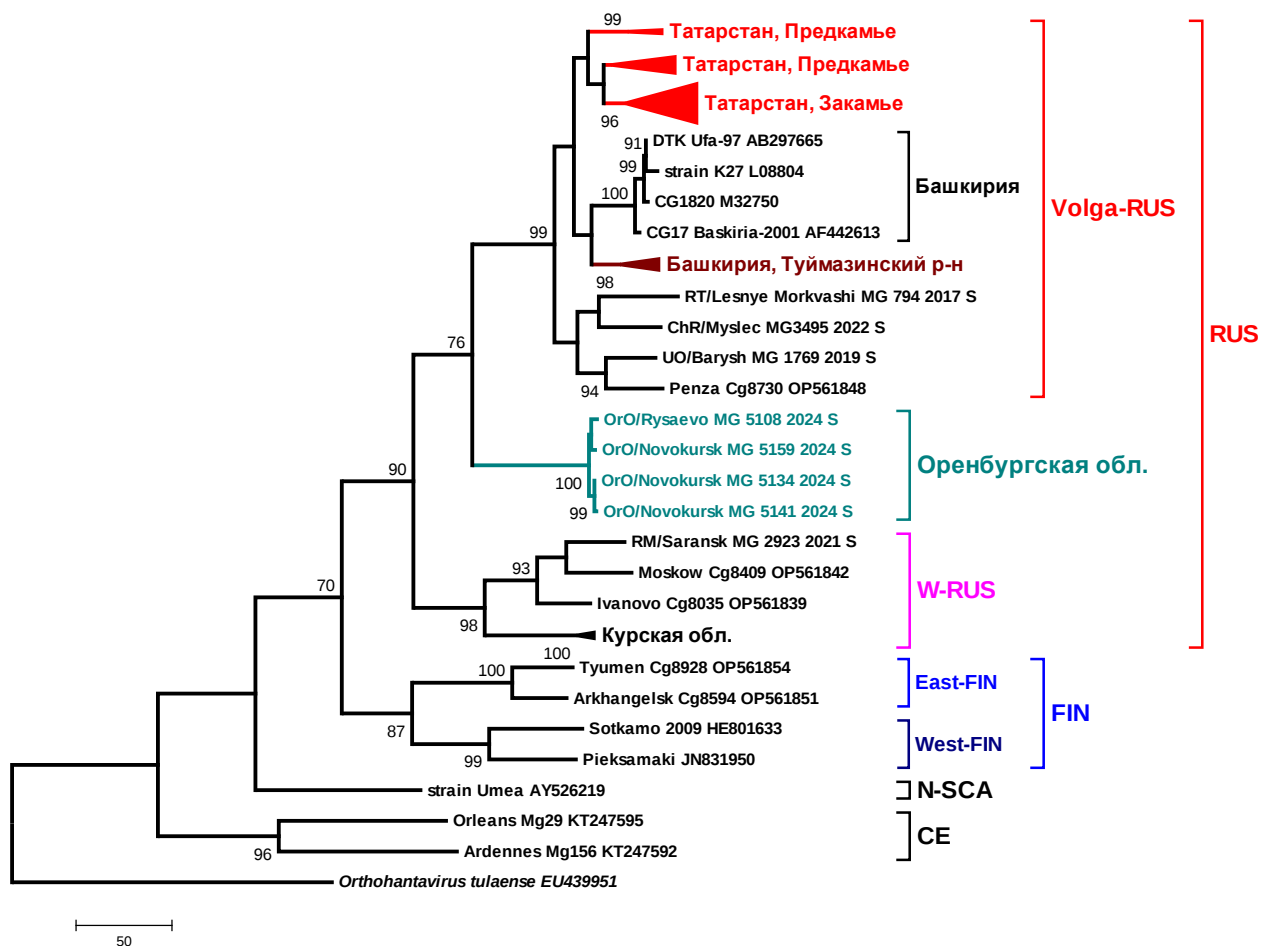


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для участка S-сегмента штаммов PUUV. Исследованные штаммы из Оренбургской области выделены бирюзовым цветом

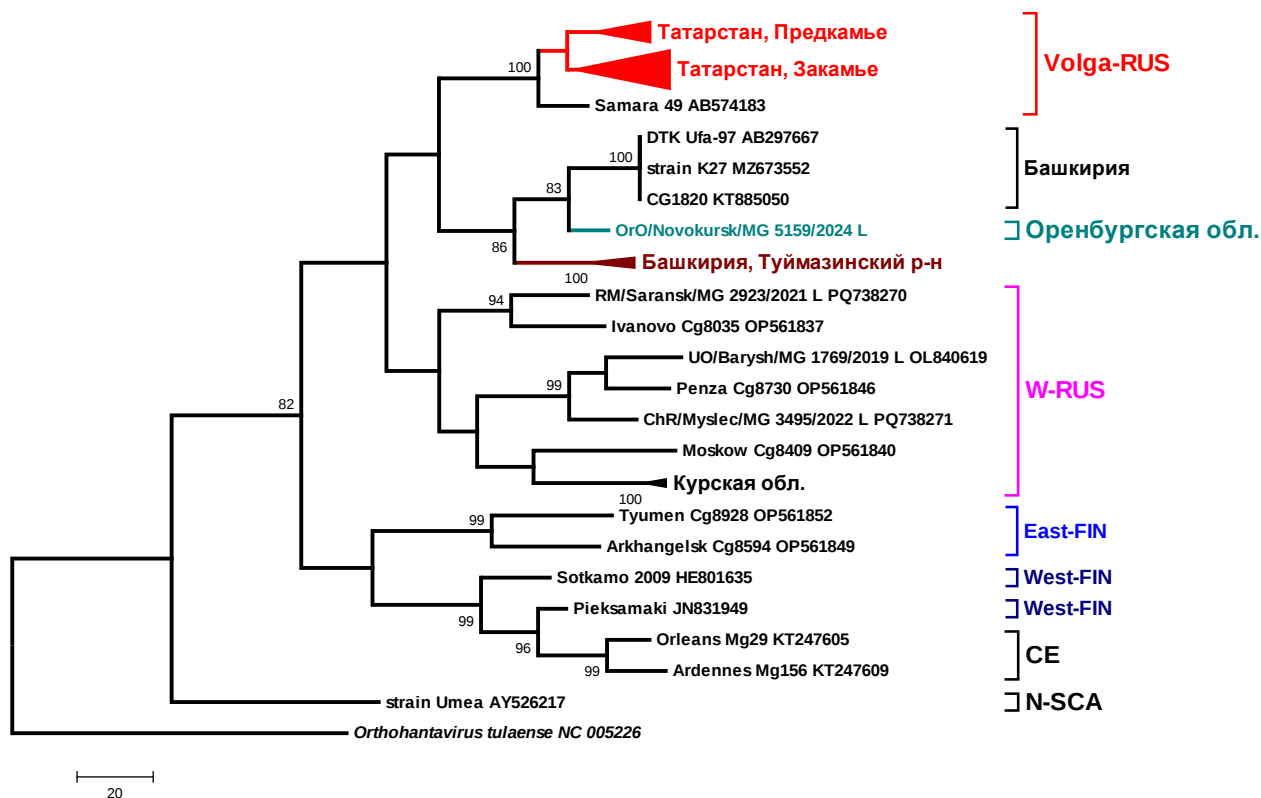


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное для участка L-сегмента штаммов PUUV. Исследованные штаммы из Оренбургской области выделены бирюзовым цветом

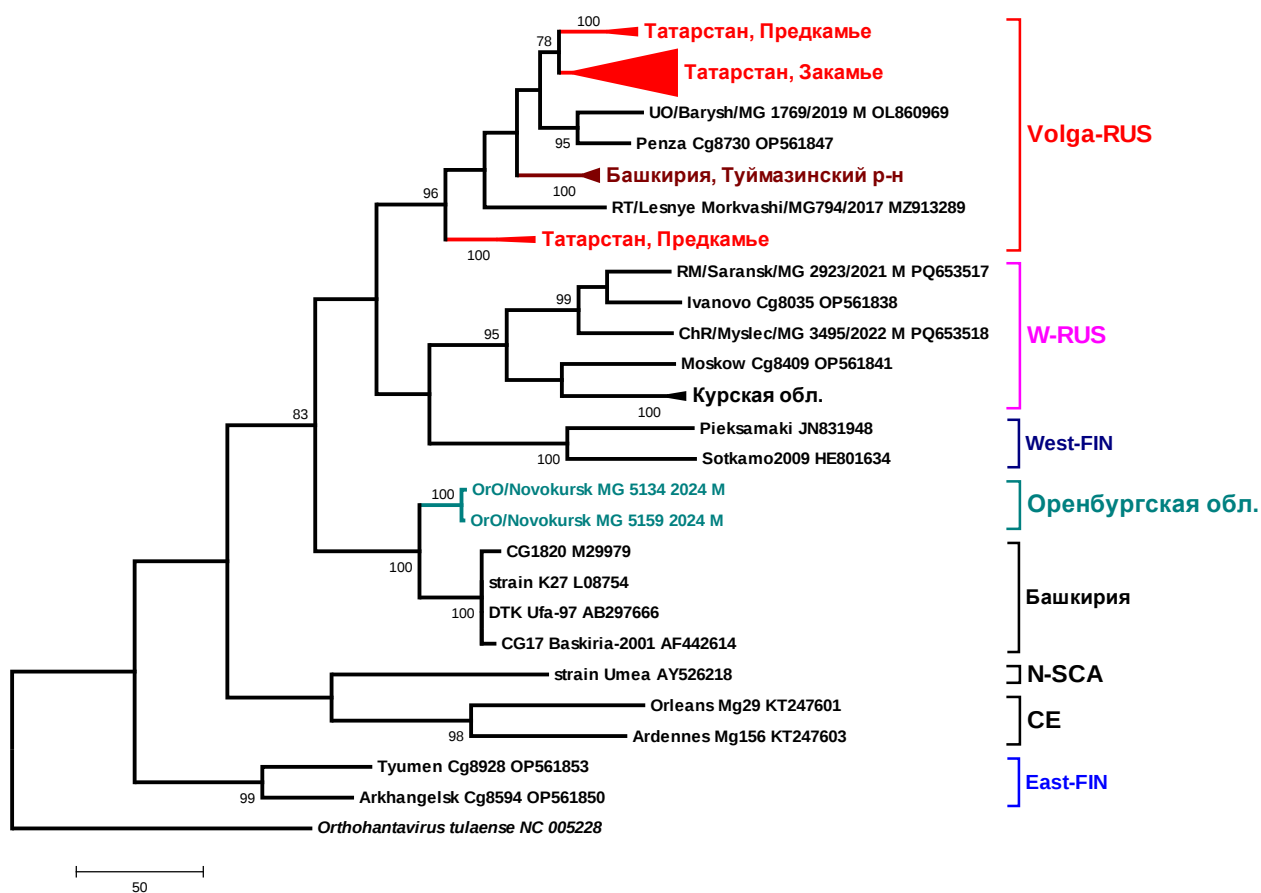


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное для участка М-сегмента штаммов PUUV. Исследованные штаммы из Оренбургской области выделены бирюзовым цветом

Таким образом, результаты сравнительного и филогенетического анализа продемонстрировали, что выявленные в Оренбургской области штаммы PUUV, по всей видимости, относятся к генетической линии RUS, однако содержат новый вариант генома. Для этого варианта характерны относительно низкие значения идентичности НП проанализированных участков генома при сравнении с большинством референсных штаммов русской генетической линии: менее 91% для S-сегмента, менее 87% для М-сегмента и менее 89% для L-сегмента. Исключение составляют только М-сегмент штаммов из центральной Башкирии и L-сегмент всех референсных штаммов из Башкирии. Согласно Dashian с соавт. [3] такие значения позволяют отнести исследованные штаммы к отдельному кластеру. В данном случае, по-видимому, речь может идти об отдельной сублинии в русской генетической линии вируса, а, возможно, и об отдельной линии. Можно предположить, что происхождение выявленного в Оренбургской области генетического варианта PUUV может быть связано с гипотетическим Уральским рефугиумом, по мнению ряда авторов, существовавшим во время последнего ледникового периода [2; 4]. То есть выявленный вариант генома, возможно, образовался вследствие как независимой эволюции штаммов в популяциях рыжей полёвки, сформировавшихся в ходе миграций из Уральского рефугиума в постледниковый период, так и в результате рекомбинации и/или реассортации исходного генетического варианта PUUV со штаммами русской генетической линии. Однако более точное определение происхождения обнаруженного в Оренбургской области генетического варианта вируса требует дальнейших исследований.

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. Dashian M.A. Genotypic differentiation and evolutionary dynamics of puumala orthohantavirus (PUUV) / M.A. Dashian, I.A. Volkhin, P.Y. Volchkov, A.A. Deviatkin // *Acta Virol.* 2024. Vol. 68. A. 13168. DOI 10.3389/av.2024.13168. EDN GQDONS

4. Deffontaine V. Beyond the Mediterranean Peninsulas: Evidence of Central European Glacial Refugia for a Temperate Forest Mammal Species, the Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*) / V. Deffontaine, R. Libois, P. Kotlík, R. Sommer, C. Nieberding, E. Paradis, J.B. Searle, J.R. Michaux // *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14. Pp. 1727–1739.

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

6. 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.

7. 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. Vol. 10. Pp. 512–526. EDN ITKNLD

8. 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, Н.В. Попов; ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. – 2025. – 21 с.

9. Хантавирусные болезни: обзор эпидемиологической ситуации в мире. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почеч-

ным 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.