

На правах рукописи

БЛИНОВА

Екатерина Алексеевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА –
ОСНОВНОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С
ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный руководитель:

Дзагурова Тамара Казбековна – доктор медицинских наук.

Официальные оппоненты:

Борисевич Сергей Владимирович – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, начальник Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации.

Евтушенко Екатерина Алексеевна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры вирусологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита состоится « ____ » _____ 20__ года в _____ час. на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, город Москва, поселение Московский, вн.тер.г. муниципальный округ Филимонковский, поселок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и на сайте <https://chumakovs.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Представители рода *Orthohantavirus* к настоящему времени обнаружены на всех континентах, кроме Антарктиды, и являются одними из важнейших вирусных зоонозов. Большинство видов хантавирусов связаны с одним, реже несколькими, видами мелких млекопитающих, в популяциях которых они циркулируют в виде бессимптомной инфекции. Данные о патогенности для человека известны только для хантавирусов, природными резервуарами которых являются грызуны (Бернштейн и др., 2010; Kuhn & Schmaljohn, 2023). У человека такие хантавирусы могут вызывать геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) – хантавирусы Старого Света, либо хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) – хантавирусы Нового Света (Vetter *et al.*, 2021).

На территории России обнаружены шесть патогенных для человека хантавирусов - возбудителей ГЛПС: Пуумала, Хантаан, Амур, Сеул, Куркино и Сочи.

Наиболее распространенным является хантавирус Пуумала, на долю которого приходится около 98% от числа всех случаев заболевания людей ГЛПС в России (Tkachenko *et al.*, 2019; 2023). Клинический анализ случаев заболевания ГЛПС, вызываемой хантавирусом Пуумала (ГЛПС-Пуумала) на территории наиболее активных природных очагов России показал, что по тяжести заболевания примерно 25% случаев протекают в тяжелой клинической форме, 50% – в среднетяжелой и 25% - в легкой форме (Морозов и др. 2017). При этом, численность летальных исходов при тяжелом течении болезни составляет около 1%. Резервуарным хозяином хантавируса Пуумала является рыжая полевка *Myodes glareolus* (Yanagihara *et al.*, 1985; Bernshtein *et al.*, 1999), в результате чего наиболее эпидемиологически активные природные очаги ГЛПС, вызываемой этим хантавирусом, определены ареалом рыжей полевки, обитающей, в основном, в широколиственных и хвойно-широколиственных смешанных лесах на Урале и Среднем Поволжье (Окулова, 2005; Tkachenko *et al.*, 2019; Garanina *et al.*, 2009). Следует отметить, что абсолютное большинство изолированных в России к настоящему времени генетических вариантов хантавируса Пуумала относятся к территории Приволжского федерального округа (Yashina *et al.*, 2022; Kabwe *et al.*, 2022; Davidyuk *et al.*, 2020; 2021; Martynova *et al.*, 2021; Savitskaya *et al.*, 2019). В то же время, в регионах с относительно низкой заболеваемостью ГЛПС имеются лишь единичные данные о нуклеотидных последовательностях вируса Пуумала.

Таким образом, с учётом имеющихся в литературе данных, необходимо получить более исчерпывающие сведения о возможном существовании на территории Российской Федерации ранее неизвестных генетических вариантов хантавируса Пуумала.

Получение таких данных представляет научный интерес относительно эволюции и распространения генетических вариантов хантавируса Пуумала, расширяющих возможности усовершенствования известных и создания новых препаратов для специфической диагностики ГЛПС методом ПЦР (полимеразной цепной реакции), что и обуславливает актуальность данной диссертационной работы.

Степень разработанности темы исследования

Хантавирус Пуумала впервые был выделен в 1980 году от рыжей полевки, отловленной в окрестностях Финского озера Пуумала («Haemorrhagic fever with renal syndrome: memorandum from a WHO meeting.», 1983). Его вирионы содержат три сегмента РНК (рибонуклеиновой кислоты) отрицательной полярности. Опубликованные в 2001 году данные по генетической систематизации хантавируса Пуумала (Sironen *et al.*, 2001), свидетельствовали о существовании семи генетических линий этого вируса. Разделение генетических линий проводилось на основании дендрограмм, построенных на основании нуклеотидных последовательностей S сегмента, кодирующего белок нуклеокапсида. В 2012

была описана еще одна генетическая линия, обнаруженная на территории Латвии (Razzauti *et al.*, 2012).

Таким образом, современное разнообразие вируса Пуумала описывают как восемь генетических линий: Центральноевропейская (CE), Альпийско-Адриатическая (ALAD), Датская (DAN), Южно-Скандинавская (S-SCAN), Северо-Скандинавская (N-SCAN), Финская (FIN), Русская (RUS) и Латвийская (LAT) (Klempa, 2018).

В работе Кастеля в 2019 году были высказаны предположения, относительно распространения генетических линий во время схождения ледника около 18 000 лет назад (Castel *et al.*, 2019). Согласно этой гипотезе, хантавирус Пуумала находился в трех рефугиях, из которых пошло дальнейшее распространение вируса по территории Европы. Различные биоинформатические методы дали некоторые расхождения, однако все они показали, что линии RUS, FIN и LAT имеют общее происхождение и распространились из одного рефугия.

К началу нашей диссертационной работы на территории России были известны две генетические линии: RUS и FIN.

Линия RUS была выявлена на территории Приволжского федерального округа, где располагаются основные очаги заболеваемости ГЛПС-Пуумала: в Республике Башкортостан (Dekonenko *et al.*, 2003), Республике Татарстан (Xiao *et al.*, 1993; Lundkvist *et al.*, 1997), Удмуртской Республике (Plyusnin *et al.*, 1995), Самарской области (Kariwa *et al.*, 2009). Еще несколько представителей линии RUS были обнаружены за пределами России в странах Балтии и в Польше. Для них известны лишь S сегментные последовательности.

Финская линия была обнаружена в Карелии (три изолята с известными последовательностями S сегмента (Asikainen *et al.*, 2000)), и несколько изолятов из Омска, с известными последовательностями S и M сегментов (Dekonenko *et al.*, 2003). Также имелись данные о циркуляции Финской ветви в Тюменской области на основании неполных S сегментных последовательностей (Ризванов и др., 2019).

Отсутствие системных исследований генетического разнообразия хантавируса Пуумала на территориях России, не относящихся к Приволжскому федеральному округу, предопределили цель и задачи настоящей работы.

Цель исследования

Исследование генетических вариантов хантавируса Пуумала на территории Российской Федерации и разработка кандидатной тест-системы для дифференциальной диагностики данного возбудителя.

Задачи исследования

1. Разработать методику пробоподготовки образцов для секвенирования кодирующих последовательностей всех сегментов хантавируса Пуумала из минимального количества исходного биоматериала.
2. Секвенировать геноизоляты хантавируса Пуумала от рыжих полевок, отловленных в различных природных очагах ГЛПС, а также из аутопсийных материалов погибшего от ГЛПС больного.
3. Разработать кандидатную тест-систему для дифференциальной диагностики хантавируса Пуумала.
4. Провести филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей хантавируса Пуумала.

Научная новизна

Установлена циркуляция на территории Курской, Ивановской, Московской областей генетических вариантов вируса Пуумала, кластеризующихся в виде отдельной сублинии W-RUS в составе генетической линии RUS. Обнаружение представителей этой

клады позволило также выявить события реассортации с участием предков штаммов хантавируса Пуумала, циркулирующих на территории Приволжского федерального округа.

Впервые выявлена циркуляция Финской генетической линии хантавируса Пуумала в Архангельской области, а также впервые получены более 90% кодирующих последовательностей всех сегментов для представителей Финской линии на территориях Тюменской и Архангельской областей.

Впервые показано, что популяция генетических вариантов хантавируса Пуумала в Саратовской области (Саратовский район) была занесена из Удмуртской Республики.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате диссертационной работы выявлены новые ранее неизвестные генетические варианты хантавируса Пуумала, что расширило наши познания о генетическом разнообразии хантавируса Пуумала и представление о процессах его эволюции на территории России.

Результаты генетических исследований ранее известных и новых генетических вариантов хантавируса Пуумала явились основой для разработки кандидатной тест-системы для дифференциальной диагностики ГЛПС, вызванной хантавирусом Пуумала методом ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Методология и методы исследования

Для выполнения исследований и решения поставленных задач были использованы иммунологические и молекулярно-биологические методы лабораторных исследований, отражающие новизну научных подходов в изучаемой области. Планирование экспериментов и организация исследовательской деятельности осуществлялись на основании анализа отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны олигонуклеотиды для выявления РНК хантавируса Пуумала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентной детекцией, чувствительные к ранее известным и обнаруженным нами на территории Российской Федерации генетическим вариантам хантавируса Пуумала.

2. На территории Курской, Ивановской и Московской областей обнаружены ранее неизвестные генетические варианты хантавируса Пуумала, образующие отдельную кладу, относящуюся к генетической линии RUS вируса Пуумала, названную нами как сублиния W-RUS.

3. Обнаружены ранее неизвестные события реассортации в эволюционной истории генетической линии RUS хантавируса Пуумала.

4. На территории Архангельской области обнаружены генетические варианты хантавируса Пуумала сублинии East-FIN, ранее выявленной на территории Азиатской части России - в Омской и Тюменской областях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных молекулярно-биологических методов, программного обеспечения и статистической обработкой полученных результатов.

Все выводы и практические рекомендации диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Материалы исследования были представлены на следующих конференциях:

1. Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием, Москва (1–3 апреля 2019);

2. Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020, Москва (6-8 октября 2020);
3. X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов, Научноград Кольцово (26-29 сентября 2023);
4. Конференция молодых ученых ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Проблемы эпидемиологии, терапии и лабораторной диагностики инфекционных заболеваний», Москва (17-18 мая 2023);
5. Научно-практическая конференция, посвященная 60-летию ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Эпидемиология и инфекционные болезни: связь времен и поколений», Москва (13 октября 2023);
6. Конференция молодых ученых и специалистов ФГАНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита), Москва (23-24 ноября 2023);
7. X Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи (7-10 ноября 2023);
8. Научно-практический семинар «Трансмиссивные и природно-очаговые инфекции: диагностика и разбор клинических случаев» (3 апреля 2024).

Личное участие автора в получении результатов

Автором проведен анализ научной литературы по тематике диссертации, изучена степень разработанности проблемы, сформулированы цели и задачи исследования. Основные результаты исследования получены автором лично или при его непосредственном участии. Автор самостоятельно спроектировал дизайн праймеров, разработал протокол амплификации, подготовил материал к секвенированию, осуществил сборку первичных данных, построил дендрограммы, проанализировал полученные данные и сформулировал основные положения и выводы диссертации. Лично или с участием автора подготовлены основные публикации по материалам исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 8 «Проблемы экологии вирусов, их географического распространения, эпидемиологии и путей распространения вирусных инфекций, изучение путей передачи вирусов, их носительства, выявление естественных хозяев» и 10 «Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии» паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 6 научных работ из них 3 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК), опубликованные научные работы индексируются в международных библиографических базах данных – Web of Science и/или Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представлена на 138 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей

разработки темы, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 18 таблицами. Список литературы включает 203 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалы

В работе исследовали образцы легочной ткани рыжих полевок, отловленных на территориях Курской, Ульяновской, Саратовской, Ивановской, Московской (Приокско-Террасный заповедник; Волоколамский район), Пензенской, Архангельской, Тюменской областей, Удмуртской Республики, Республики Башкортостан, а также секционные материалы от пациента ГЛПС с летальным исходом. Все образцы биологического материала хранились в замороженном виде при температуре -70°C .

Иммунологические исследования

Антитела к хантавирусам определяли в сыворотке крови пациента, а также в настоях сердец грызунов методом флуоресцирующих антител (МФА) с помощью «Диагностикума ГЛПС» производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). При исследовании материалов от грызунов использовали ФИТЦ-конъюгат антител против иммуноглобулинов (IgG+IgM) мыши. Для серотипирования антител использовали слайды с моновалентными антигенами вирусов Пуумала и Куркино.

Экстракция вирусной РНК

Биоматериал гомогенизировали с помощью гомогенизатора QIAGEN TissueLyser. Экстракцию вирусной РНК проводили из 10% суспензии тканей легких грызунов, а также из секционных материалов, приготовленных на PBS буфере с использованием набора РИБО-преп (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) или методом фенол-хлороформной экстракции набором «РИБО-золь-АМ», входящим в состав тест-системы AmpliSens «RABV» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени с флуоресцентной детекцией

Для проведения ОТ-ПЦР, нами были разработаны праймеры и зонд, специфичные для хантавируса Пуумала. Для проведения обратной транскрипции и амплификации использовали реагенты производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва: 4,4мМ дНТФ (Т), ОТ-ПЦР-смесь-2-FER/FRT, Полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv), RT-G-mix-2.

Для измерения чувствительности тест-системы, а также проведения последующих экспериментов и контроля прохождения ПЦР были созданы контрольные образцы, представляющие собой MS2-фаг, содержащий в геноме целевой фрагмент амплификации в РНК-форме.

Для получения контроля проводили клонирование ампликона целевого фрагмента ДНК на основании штамма DTK-Ufa-97 в модифицированный вектор pET со встроенными генами созревания и оболочки MS2-фага (pET20-ms2 Xcm-stuff (core-XcmI-mut), clone 3), содержащий также фрагмент гена gag ВИЧ. Полученные плазмиды вводили в клетки E.coli штамма BL21, наращивали их в жидкой культуре до оптической плотности 0,1 и проводили индукцию экспрессии с помощью Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом для получения частиц MS2 фага в клетках бактерии. Наращенную культуру осаждали центрифугированием, обрабатывали лизоцимом и проводили замораживание-оттаивание

для лизиса клеток. Затем проводили обработку ДНКазой и РНКазой, центрифугировали и использовали супернатант, содержащий фаговые частицы, для дальнейшей очистки ультрацентрифугированием в градиенте плотности CsCl. Ультрацентрифугирование проводили в течение 20 часов при 200 000 g с помощью центрифуги Optima Max Ultracentrifuge Beckman Coulter. Полученный градиент разделяли на 7 фракций, которые тестировали с помощью ПЦР в реальном времени. В результате отбирали фракцию, содержащую наибольшее количество фаговых частиц и наименьшее количество примеси ДНК, и использовали ее в дальнейшем в качестве контрольного образца.

С помощью системы CQS-gag (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) была определена точная концентрация контрольных образцов, в сравнении с которыми определяли количество копий РНК хантавируса Пуумала, содержащихся в пробах биологического материала.

Амплификация протяженных последовательностей

В этой работе были созданы 24 пары вырожденных праймеров для получения ампликонов длиной 520-570 нуклеотидов с перекрытием для секвенирования последовательностей длиной 1781-1786 и 3627-3629 нуклеотидов для S и M сегментов соответственно, включающие их полные кодирующие последовательности; и 6405 нуклеотидов L сегмента, составляющие более 98% от его кодирующей последовательности.

Амплификацию выполняли в два этапа. Первый этап проводили в формате мультиплекс для того, чтобы обеспечить возможность получения ПЦР-продуктов из минимального объема материала. Он включал обратную транскрипцию и 15 циклов амплификации мультиплексной ПЦР с использованием набора SuperScript III one-step RT-PCR Platinum Taq HiFi kit (Invitrogen, США). При этом использовали два пула праймеров, один содержал четные, а другой нечетные праймерные пары. Таким образом, на первом этапе каждый образец амплифицировали в двух пробирках. Далее проводили 30 дополнительных циклов амплификации с Taq-полимеразой производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва. Для этой стадии ПЦР использовали отдельные пары праймеров. Далее образцы секвенировали методом Сэнгера.

Для подготовки образцов из Волоколамского района к секвенированию методом высокопроизводительного секвенирования использовали модифицированный протокол: на первой стадии ОТ-ПЦР использовали 3 пула праймеров с получением ампликонов размером около 1200 нуклеотидов с перекрывающимися областями около 500 нуклеотидов. Вторую стадию амплификации проводили аналогично, с использованием отдельных праймерных пар.

Амплификация участка L сегмента родоспецифичными праймерами

Для определения наличия вируса Пуумала в грызунах из Волоколамского района Московской области, а также в качестве референсного метода для определения диагностической чувствительности и специфичности метода ОТ-ПЦР использовали родоспецифичные праймеры на L сегмент представителей рода *Orthohantavirus*.

Вирусную кДНК получали с использованием набора «Реверта L» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили методом «вложенной» ПЦР, с использованием двух пар родоспецифичных праймеров HAN-L-F1/HAN-L-R1, HAN-L-F2/HAN-L-R2 амплифицирующих участок L сегмента хантавирусов (Klempa *et al.*, 2006). Полученные ампликоны были секвенированы методом Сэнгера с внутренних праймеров «вложенной» ПЦР.

Электрофорез в агарозном геле

Для визуализации результатов амплификации проводили электрофорез молекул ДНК в буфере TAE в 1% или 1,7% агарозном геле (в зависимости от длины целевого

фрагмента ДНК) с бромистым этидием. Электрофорез проводили в мини-камере для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Москва, Россия) при постоянном напряжении 80В. В случае образования неспецифичных продуктов амплификации, для дальнейшего секвенирования по методу Сэнгера целевые полосы вырезали из геля с помощью набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США), согласно инструкции производителя.

Секвенирование

Для секвенирования методом Сэнгера ампликоны очищали либо вырезанием из геля, либо с использованием смеси ферментов FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, Остин, Техас, США) и экзонуклеаза I из *E.coli*, 20 е.а./мкл, 4000 е.а. (Thermo Fisher Scientific, Остин, Техас, США) и далее секвенировали с использованием набора для секвенирования циклов BigDye Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific, Остин, Техас, США) на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500xL (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США).

Для проведения высокопроизводительного секвенирования полученные ампликоны для каждой из проб были смешаны в эквимольном соотношении. Для получения индексированных библиотек использовали набор Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, USA), согласно инструкции производителя. Выделение фрагментов ДНК в диапазоне от 200 до 400 п.н. проводили с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA). Диапазон длин фрагментов оценивали с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Germany) на биоанализаторе Agilent 2100. Измерение концентрации полученных библиотек проводили при помощи количественной ПЦР (NEBNext® Library Quant Kit for Illumina, New England Biolabs, UK). Нормализованные библиотеки секвенировали на приборе MiSeq с использованием MiSeq Reagent Kit v3.

Обработка первичных данных секвенирования

Для первичной обработки данных секвенирования по Сэнгеру и сборки полученных последовательностей использовали программное обеспечение DNASTAR Lasergene SeqMan версии 7.0.0.

Для предварительной обработки fastq файлов, полученных методом NGS, использовали программы Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014) и cutadapt v3.4 (Martin, 2011). Выравнивание ридов на референсы проводили в программе bowtie2 v2.4.4 (Langmead and Salzberg, 2012), в качестве референсов использовали последовательности вируса Пуумала NC_005224.1, NC_005223.1, NC_005225.1 для S, M и L сегментов, соответственно. Сборку консенсусов проводили последовательно 2 раза. Сначала с использованием программ Lofreq v2.1.5 (Wilm *et al.*, 2012) и bcftools consensus v1.13 (Danecek *et al.*, 2021), после чего полученные консенсусы использовали повторно в качестве референсов в программе bowtie2. Вторую сборку консенсусов проводили с использованием GATK HaplotypeCaller v4.2.0.0 (Van der Auwera and O'Connor, 2020) и программы bcftools consensus.

Анализ нуклеотидных последовательностей

Для филогенетического анализа последовательности были предварительно выровнены с использованием алгоритма Muscle в программе MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Построение филогенетических деревьев выполнялось с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием модели General Time Reversible (G+I) со значением Bootstrap 1000, с помощью программы MEGA X. Полученные последовательности были дополнены последовательностями из базы данных GenBank.

Сканирование сходства и графики загрузочного сканирования были сгенерированы с использованием программы Simplot 3.5.1 (размер окна 1000, шаг 5) (Lole *et al.*, 1999).

Среднее попарное генетическое расстояние рассчитывали с использованием R, с размером окна 100 нуклеотидов и шагом 10 нуклеотидов.

Точки географического происхождения последовательностей вируса отмечали на карте в программе QGIS 3.28.0.

Статистическая обработка результатов исследования метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Расчет диагностических характеристик (специфичности и чувствительности) с доверительной вероятностью 95% производился по методу Клоппера-Пирсона с использованием онлайн калькуляторов по формуле:

$$\left(1 + \frac{n - x + 1}{xF(1 - \alpha/2; 2x, 2(n - x + 1))}\right)^{-1} < p < \left(1 + \frac{n - x}{(x + 1)F(\alpha/2; 2(x + 1), 2(n - x))}\right)^{-1}$$

где x - количество положительных/отрицательных образцов среди n – количества истинно-положительных/отрицательных образцов, $F(c; d1, d2)$ – квантиль 1 - α из распределения Фишера со степенями свободы $d1$ и $d2$, p – диагностическая чувствительность/специфичность, α при доверительной вероятности 95% равна 0,05.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расследование летального случая ГЛПС-Пуумала в Курской области

В 2019 году на территории Курской области был зарегистрирован первый для этого региона смертельный случай ГЛПС-Пуумала (Blinova *et al.*, 2022). При вскрытии были обнаружены множественные кровоизлияния в различных органах. Аутопсийный материал из почек, легких, сердца, печени и селезенки был изъят для дальнейшего анализа.

Антиген вируса Пуумала был обнаружен во всех образцах аутопсии иммуноферментным методом. Из этих образцов была выделена РНК и проанализирована методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Содержание РНК в различных органах оценивали в сравнении с известными концентрациями контрольного образца, представляющего собой MS2-фаг, содержащий в геноме целевой фрагмент амплификации в РНК-форме. Все образцы содержали РНК вируса Пуумала, при этом самая высокая вирусная нагрузка была обнаружена в селезенке, тогда как самая низкая - в печени и сердце (Рисунок 1).

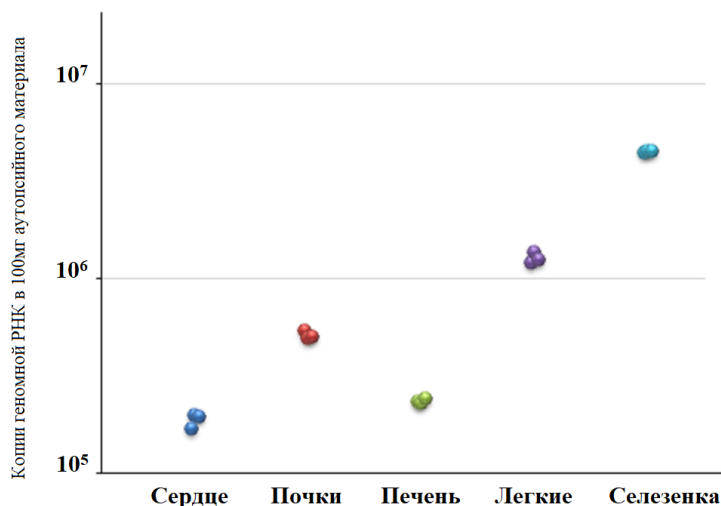


Рисунок 1 - Содержание РНК хантавируса Пуумала в органах погибшего пациента в пересчете на 100 мг аутопсийного материала

Наибольшее количество вирусной РНК было обнаружено в селезенке, а не в почках. По-видимому, это связано с тем, что хантавирусы активно размножаются в лейкоцитах, в том числе в дендритных клетках, которые мигрируют в регионарные лимфатические узлы и селезенку, где стимулируют пролиферацию и дифференцировку антигенспецифических лимфоцитов. Это предположение косвенно подтверждается высокой вирусной нагрузкой в лимфатических узлах, выявленной в случае инфекции хантавируса Добрава-Сочи, закончившейся летальным исходом (Kruger *et al.*, 2015). Более того, активное размножение хантавируса Пуумала в моноцитах, макрофагах/гистиоцитах и дендритных клетках является характерным свойством тропизма хантавирусов и определяет тяжесть течения заболевания (Raftery *et al.*, 2020).

Секвенирование нуклеотидных последовательностей

В данной работе были исследованы мелкие млекопитающие из 10 регионов Российской Федерации. Настои сердец мелких млекопитающих были исследованы на наличие хантавирусных антител. Положительные образцы были протестированы с помощью собственной тест-системы ОТ-ПЦР в реальном времени (Таблица 1). Рыжие полевки из Волоколамского района Московской области были протестированы методом «вложенной» ПЦР, амплифицирующей участок L гена (Klempa *et al.*, 2006).

Полевки с наибольшим количеством вирусной РНК по данным ОТ-ПЦР были отобраны из каждого места отлова для дальнейшего секвенирования. Последовательности всех трех сегментов были получены по меньшей мере для одного геноизолята из каждого региона. Для некоторых образцов рыжих полевок, а также аутопсийного материала пациента, были получены нуклеотидные последовательности только S сегментов. В результате работы были получены нуклеотидные последовательности от 24 РНК-изолятов, в том числе одного пациента и 23 рыжих полевок (номера в GeneBank MZ580941-MZ580953, OP561825-OP561854, OQ606918, OQ606921) (Blinova *et al.*, 2022; Blinova *et al.*, 2023; Блинова и др., 2023).

Таблица 1 - Результаты исследований мелких млекопитающих на инфицированность вирусом Пуумала

Территория отлова мелких млекопитающих	Число исследован- ных особей	Число особей с антителами к вирусу Пуумала	Число ПЦР- положитель- ных особей	Число секвениро- ванных образцов
Курская область	60	25	22/25	4
Ульяновская область	98	7	7/7	1
Саратовская область	44	14	14/14	3
Удмуртская Республика	32	9	9/9	1
Ивановская область	2	2	2/2	1
Московская область (Рузский район)	61	12	10/12	2
Пензенская область	54	28	27/28	2
Архангельская область	43	10	8/10	2
Тюменская область	110	10	9/10	5
Московская область (Волоколамский район)	82	Не исследованы	6/82	2
Всего	586	117	114/199	23

Разработка кандидатной тест-системы для выявления хантавируса Пуумала

Для исследования аутопсийного материала от погибшего пациента, а также для обнаружения РНК вируса Пуумала в легких рыжих полевок был использован метод ОТ-

ПЦР в реальном времени, с использованием олигонуклеотидов, подобранных на основе ранее известных последовательностей.

При исследовании образцов рыжих полевок из Курской и Московской областей было обнаружено, что некоторые кривые накопления ДНК имели наклоненный вид. Анализ полученных в этой работе последовательностей показал наличие нуклеотидных замен в зоне посадки использованных олигонуклеотидов, что выявило необходимость доработки тест-системы, для обеспечения чувствительности ко всем генетическим вариантам хантавируса Пуумала, циркулирующим на территории России.

Мишень амплификации была выбрана в наиболее консервативной области генома, соответствующей перекрывающимся рамкам считывания белков N и NSs, закодированных в S сегменте (Hiltbrunner, *et al.*, 2020).

Новые олигонуклеотиды были предварительно протестированы на штаммах вирусов Пуумала (ТКД/Уфа-97, CG/Казань-79, CG/13891 (Бельгия), Halnas 82-L20 (Швеция), H46/Уфа, P-360 (Саратов), CG 1820 (Уфа), Соткамо (Финляндия). Все перечисленные образцы были определены как положительные.

Далее полученную методику верифицировали на образцах мелких млекопитающих, отловленных на территории нескольких регионов: были отобраны 292 образца фрагментов легких грызунов с наличием хантавирусных антител из Курской, Московской, Воронежской, Тюменской, Архангельской и Саратовской областей, 92 образца без антител к хантавирусам из Московского региона, а также 300 образцов от мелких млекопитающих, отловленных на территории Республики Башкортостан (Мочалкин и др., 2024), не проанализированных на наличие антител. В качестве метода сравнения была выбрана альтернативная «вложенная» ПЦР с использованием родоспецифичных праймеров, амплифицирующих участок L сегмента (Klempa *et al.*, 2006) с последующим секвенированием методом Сэнгера с внутреннего праймера «вложенной» ПЦР. Всего исследовали 684 образца (Таблица 2).

Метод ПЦР в реальном времени выявил 142 положительных образца. Референсный метод «вложенной» ПЦР выявил 145 положительных образцов, из которых 106 были подтверждены секвенированием как содержащие хантавирус Пуумала. В остальных 39 образцах секвенирование выявило другие хантавирусы: Добрава-Белград, Адлер, Тула, Сивис. Результаты секвенирования депонированы в GeneBank под номерами PQ256518-PQ256648, PP375544-PP375538 (Мочалкин и др., 2024).

Таблица 2 – Результаты выявления хантавируса Пуумала методом ОТ-ПЦР в сравнении с референсным методом

Всего исследовано 684 образца		Результаты «вложенной» ПЦР	
		положительные	отрицательные
Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени	положительные	106	36
	отрицательные	0	542

Рассчитаны диагностические характеристики с доверительной вероятностью 95%:

- диагностическая чувствительность (106/106) составила 100% (96,58-100%);
- диагностическая специфичность (542/578) составила 93,77% (91,48-95,60%).

Наличие хантавирусных антител во всех дискордантных образцах косвенно свидетельствует о том, что они не являются ложноположительными результатами, а иллюстрируют более высокую чувствительность ОТ-ПЦР по сравнению со «вложенной» ПЦР. Метод с амплификацией меньшего размера ампликона имеет преимущество в чувствительности для образцов, в которых РНК была фрагментирована вследствие работы внутриклеточных нуклеаз или замораживании/оттаивании материала в процессе хранения.

Аналитическую специфичность определяли путем проверки на наличие перекрестных реакций с РНК ортохантавирусов Тула, Добрава-Белград (Куркино, Сочи),

Сеул, Хантаан (Хантаан, Амур), Сивис; РНК вирусов желтой лихорадки, Чикунгунья, Денге, Зика, японского энцефалита, Западного Нила, Лангат, Повассан; РНК/ДНК микроорганизмов *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium jeikeium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *H. influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* (Serogroup B), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Shigella sonnei* Weldin, *Campylobacter jejuni*, *Human adenovirus 41*, *Human hepatitis A virus*, *Leptospira kirschneri* (серогруппа Bataviae), *L. borgpetersenii* (серогруппа Tarassovi), *Rickettsia prowazekii*, *R. sibirica subsp. sibirica*, *R. heilongjiangensis*, *R. conorii subsp. conorii*, *R. raoultii*, *Borrelia miyamotoi*; а также ДНК млекопитающих *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *A. uralensis*, *A. agrarius*, *Microtus oeconomus*, *M. arvalis*, *M. minutus*, *Clethrionomys rutilus*, *Neomys fodiens*, *Mus musculus*, *Sorex araneus*, *S. minutus* и человека. Неспецифических перекрестных реакций обнаружено не было.

Аналитическая чувствительность метода была проверена в ходе испытаний на модельных образцах плазмы крови человека и гомогената органов грызунов. Модельные образцы контаминировали контролем, содержащим РНК целевого фрагмента амплификации. Экспериментальным путем устанавливали концентрацию контроля, соответствующую пределу обнаружения при различных способах экстракции (Таблица 3).

Таблица 3 - Аналитическая чувствительность

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий /мл
Плазма венозной крови	100	«РИБО-преп»	1×10^3
	200	«МАГНО-сорб»	$2,5 \times 10^3$
	1000		5×10^2
Гомогенат легких грызунов	100	«РИБО-преп»	5×10^3
	100	«МАГНО-сорб»	5×10^3

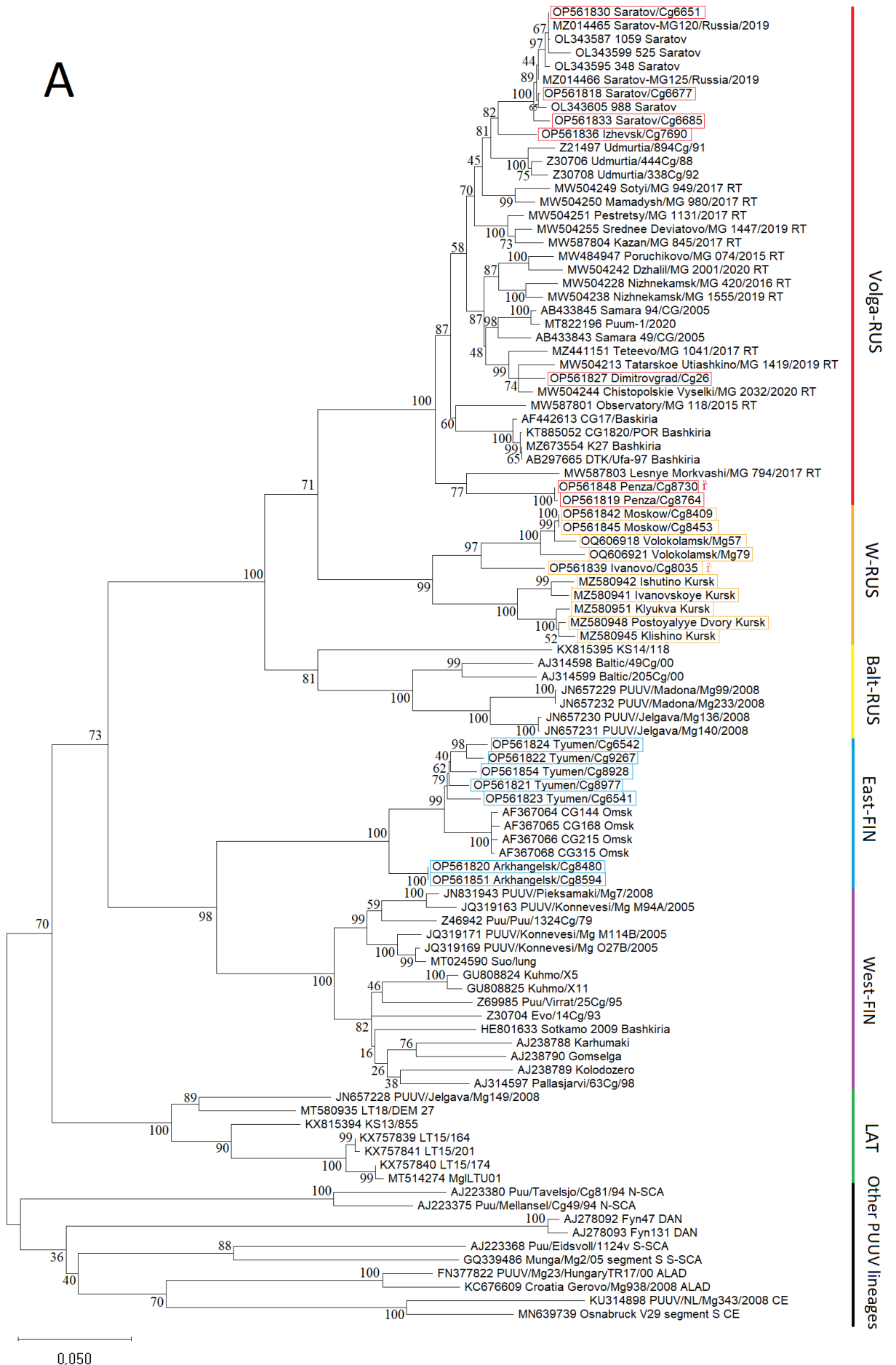
На основании испытанных олигонуклеотидов на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора ведется разработка коммерческого набора реагентов для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на ГЛПС, а также для скрининговых исследований грызунов.

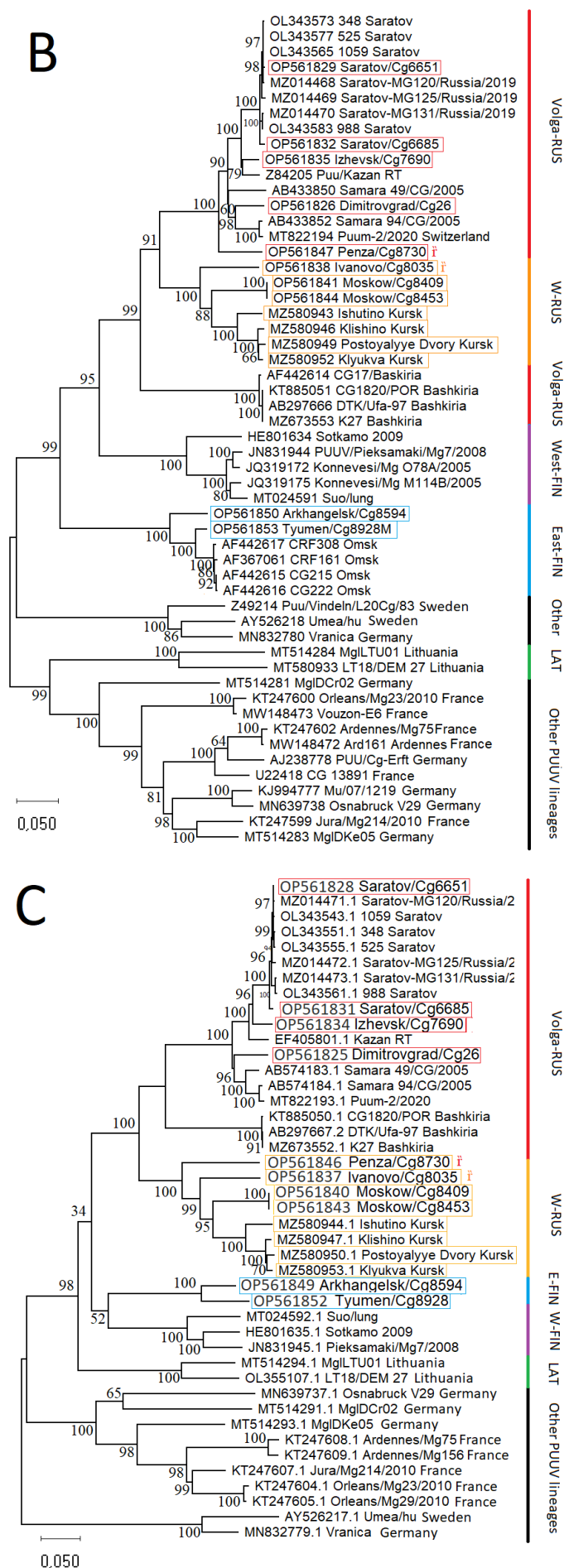
Анализ полученных последовательностей

Для проведения филогенетического анализа полученные нуклеотидные последовательности всех сегментов были дополнены представителями других генетических линий. На дендрограммах генетические линии RUS, FIN и LAT были представлены наиболее подробно, поскольку наиболее филогенетически близки друг к другу (Castel *et al.*, 2019). Остальные генетические линии вируса Пуумала находятся вне фокуса нашего внимания в этом исследовании, поэтому они были включены в филогенетический анализ как внешняя группа и обозначены как “other” (Рисунок 2).

Дендрограмма по S сегменту (Рисунок 2А) включает представителей всех восьми филогенетических линий и показывает, что филогенетическое дерево вируса Пуумала разделено на две большие клады, на одной из которых находятся линии LAT, FIN и RUS, а на другой - все оставшиеся европейские линии. Такой характер ветвления подтверждает результаты предыдущих исследований (Castel *et al.*, 2019).

A





А – филогенетическое дерево на основании полной последовательности OPC S сегмента (1302 нуклеотида); В – филогенетическое дерево на основании частичной последовательности OPC M сегмента (2923 нуклеотида, соответствует 525-3447 нуклеотидам OPC); С – филогенетическое дерево на основании частичной последовательности OPC L сегмента (6405 нуклеотидов, соответствует 5-6409 нуклеотидам OPC). Линия RUS делится на три сублинии: Volga-RUS, обозначена красным, W-RUS, обозначена оранжевым; Balt-RUS, обозначена желтым. Линия FIN разделена на две сублинии: East-FIN, обозначена синим цветом, и West-FIN, обозначена фиолетовым цветом. Линия LAT обозначена зеленым цветом. Остальные линии обозначены черным цветом. Последовательности, полученные в этом исследовании, выделены рамкой. ð - реассортантные геноизоляты. Построение филогенетических деревьев выполняли методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием модели General Time Reversible (G+I) со значением Bootstrap 1000, в программе MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Рисунок 2 - Филогенетические деревья

Выделение генетических линий вируса Пуумала изначально было основано на S-сегментном филогенетическом дереве (Sironen *et al.*, 2001; Razzauti *et al.*, 2012). В нашей работе для выделения сублиний мы также рассматриваем дендрограмму, построенную на основании S-сегмента: линия RUS будет рассматриваться здесь как три отдельных сублинии: Volga-RUS, Balt-RUS, W-RUS, а линия FIN - как две ветви: East-FIN и West-FIN.

Значения идентичности между сублиниями в кладе, содержащей ветви RUS, FIN и LAT представлены в Таблице 4. Для расчета были выбраны аминокислотные и нуклеотидные последовательности S сегмента, поскольку в базе данных GeneBank содержится значительно меньше длиннопротяженных нуклеотидных последовательностей M и L сегментов, по сравнению с количеством полных рамок считывания нуклеопротеина, закодированного в S сегменте. Из-за этого дендрограммы M и L сегментов менее подробные. В частности, это выражается в том, что сублиния Balt-RUS в них совсем не представлена.

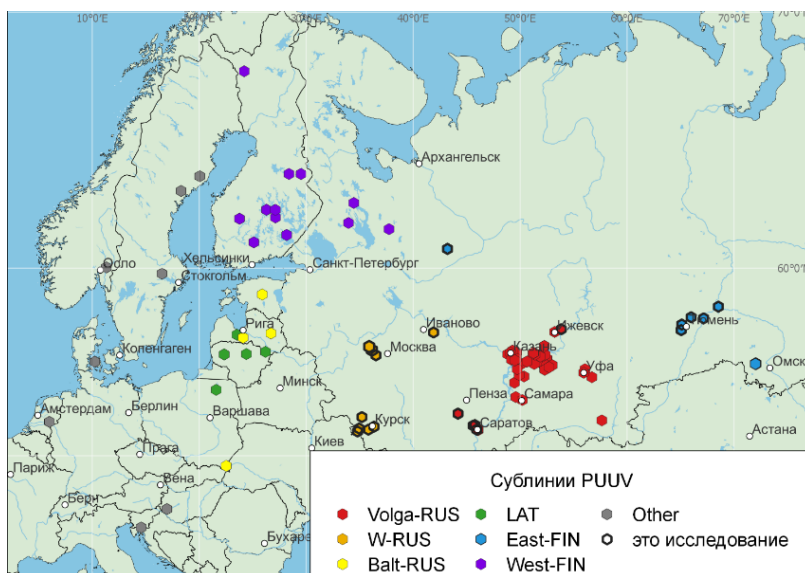
Таблица 4 - Степень идентичности между сублиниями на основании полной OPC S сегмента (нижняя треугольная матрица, нижнее значение по главной диагонали), и последовательностью нуклеопротеина (верхняя треугольная матрица, верхнее значение по главной диагонали)

	Volga-RUS (37 seq)	W-RUS (10 seq)	Balt-RUS (7 seq)	East-FIN (11 seq)	West-FIN (15 seq)	LAT (7 seq)
Volga-RUS	97.47-100/ 92.93-100	96.07-98.85	95.39-98.16	95.39-97.47	94.01-97.7	95.16-97.24
W-RUS	86.57-90.17	98.38-100/ 90.55-100	96.77-98.39	96.54-97.7	94.23-97.93	96.54-97.23
Balt-RUS	85.88-88.86	85.57-88.88	97.93-100/ 87.92-100	96.31-97.7	94.70-97.93	96.31-97.93
East-FIN	84.57-86.86	85.17-87.42	85.34-87.39	98.85-100/ 94.24-100	96.08-99.08	97.00-97.93
West-FIN	84.27-86.87	84.33-86.77	83.86-86.73	87.02-89.55	96.54-100/ 91.01-100	95.39-97.93
LAT	84.38-87.19	84.93-87.27	84.49-86.94	85.93-87.57	84.77-88.23	99.31-100/ 89.77-100

Несмотря на филогенетическое разделение, процентное содержание идентичных нуклеотидов и аминокислот внутри сублиний и между ними не позволяет установить четкие критерии для разграничения сублиний. В частности, вариабельность внутри линии Balt-RUS превышает минимальные различия между некоторыми сублиниями, которая подразумевает возможность дальнейшего дробления этой сублинии, что подтверждается мнениями некоторых исследователей (Dashian *et al.*, 2024).

Для обозначения групп генетических вариантов в качестве отдельной сублинии принимался в расчет также географический критерий.

Для того, чтобы визуализировать географическое расположение пунктов изоляции вирусов, мы нанесли соответствующие точки на карту (Рисунок 3). На ней показаны все точки выделения штаммов вируса Пуумала, принадлежащих к линиям LAT, FIN и RUS, которые мы нашли в базе данных GenBank с полной кодирующей последовательностью S-сегмента. Представители других линий были выбраны случайным образом. Каждая точка на карте соответствует одному изоляту, однако в некоторых случаях в одной и той же географической точке было выделено несколько генетических вариантов.

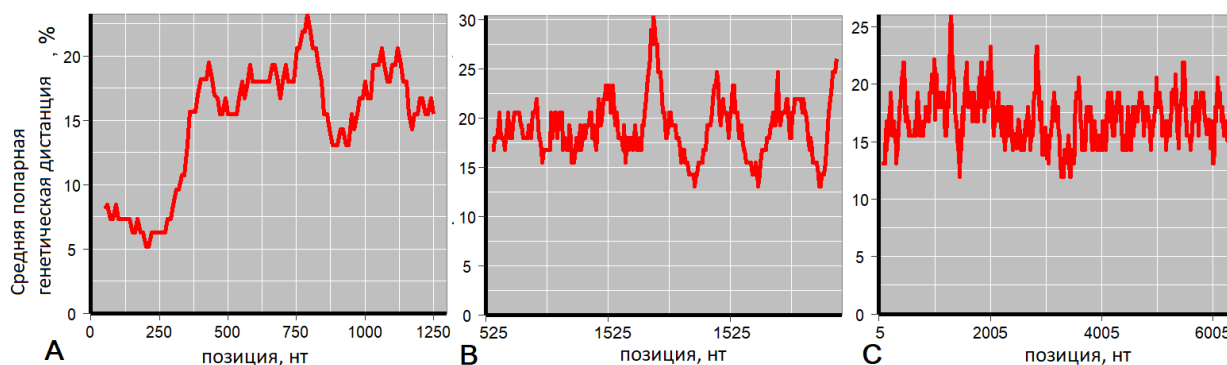


На карте представлены точки изоляции генетических вариантов вируса Пуумала с полной кодирующей последовательностью S сегмента. Volga-RUS, обозначена красным, W-RUS, обозначена оранжевым; Balt-RUS, обозначена желтым. Линия FIN разделена на две сублинии: East-FIN, обозначена синим, и North-FIN, обозначена фиолетовым цветом. Линия LAT обозначена зеленым цветом. Остальные линии обозначены серым.

Рисунок 3 - Карта точек изоляции вируса Пуумала

Таким образом, карта позволяет визуальнo оценить примерные зоны расположения исследованных сублиний. Можно заметить, что большинство рассмотренных сублиний (Volga-RUS, W-RUS, West-FIN, East-FIN) занимают отдельную, довольно обширную территорию. Исключением являются сублиния Balt-RUS и линия LAT, чьи зоны циркуляции заметно перекрываются.

С учетом последовательностей, полученных в этом исследовании, был также проведен анализ вариабельности различных частей генома (Рисунок 4), путем расчета средней генетической дистанции для каждой из возможных пар анализируемых последовательностей. Для анализа были взяты выравнивания, использованные для построения филогенетических деревьев.



А – Полная кодирующая последовательность сегмента S длиной 1302 нуклеотида, В – частичная кодирующая последовательность сегмента М, соответствующая 525-3447 нуклеотидам ОРС, С - частичная кодирующая последовательность сегмента L соответствующая 5-6409 нуклеотидам ОРС. Среднее попарное генетическое расстояние рассчитывали с размером окна 100 нуклеотидов и шагом 10 нуклеотидов.

Рисунок 4 - График консервативности генома

Этот анализ также показал, что наиболее вариабельным является М сегмент. Наиболее консервативная часть генома приходится на начало кодирующей последовательности S сегмента, где расположена перекрывающаяся рамка считывания неструктурного белка NSs вируса Пуумала (Binder et al., 2020; Kabwe et al., 2020). Это подтверждает данные предыдущих исследований (Hiltbrunner и Heckel, 2020), на основании которых была выбрана область амплификации для ПЦР в реальном времени, описанном в предыдущем разделе.

Генетическая линия RUS

В этой работе мы рассматриваем линию RUS как состоящую из трех больших отдельных ветвей, которым были даны названия: Volga-RUS, Balt-RUS, W-RUS.

Первая ветвь была обозначена здесь как Volga-RUS, потому что ее представители циркулируют на территории Поволжья. Она содержит последовательности из Саратовской, Ульяновской и Самарской областей, Удмуртской Республики, Республики Татарстан и Республики Башкортостан. Исторически эта линия была обнаружена самой первой (Xiao *et al.*, 1993; Razzauti *et al.*, 2012). Кроме того, она наиболее полно представлена в базе данных GenBank.

К линии Volga-RUS принадлежат новые полученные нами изоляты: Dimitrovgrad/CG26, Saratov/CG6651, Saratov/CG6685, Saratov/CG6685, Saratov/CG6677, Izhevsk/CG7690, Penza/CG8764, а также, согласно дендрограммам по М и S сегментам, изолят Penza/CG8730 (Blinova *et al.*, 2023). Принадлежность Penza/CG8730 к разным сублиниям, на основании дендрограмм по разным сегментам свидетельствует о том, что он появился в результате реассортации.

Последовательность из Димитровграда (Dimitrovgrad/Cg26) располагается на одной из ветвей с многочисленными последовательностями из Татарстана и Самары (Рисунок 2), что соответствует их географической близости.

Новые последовательности из Саратова (Saratov/Cg6651, Saratov/Cg6685, Saratov/Cg6677) группируются с другими ранее известными последовательностями из данного региона. Они состоят в родстве с последовательностями из Удмуртской Республики, включая Izhevsk/Cg7690 (Рисунок 2), что подтверждается результатами предыдущих исследований (Яшина и др., 2019). Тот факт, что все последовательности из Саратова группируются на одной из нескольких ветвей, относящихся к Удмуртской Республике, свидетельствует о том, что некоторые штаммы, циркулировавшие в Удмуртской Республике (скорее всего поблизости от Ижевска) были случайным образом занесены в Саратов и дали начало всему местному разнообразию. Предположительно, это могло произойти вследствие перевоза (вероятно, на корабле или барже с зерном) одной или нескольких зараженных полевых вниз по рекам Каме и Волге в обход Самары.

Вторая сублиния была обозначена здесь как Balt-RUS, поскольку ее представители были изолированы на побережье Балтийского моря, на территории Эстонии (Sironen *et al.*, 2001), Латвии и Польши (Razzauti *et al.*, 2012). К настоящему времени для этой сублинии известно только 8 полных кодирующих последовательностей сегмента S, и ни одной полной последовательности для М и L сегментов.

Еще одна ветвь, ранее неизвестная, была обнаружена на территории Курской, Московской и Ивановской областей. Мы дали ей название W-RUS (Western-RUS), поскольку ее представители были обнаружены неподалеку от западной границы России. По результатам нашей работы получены и опубликованы в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности 10 геноизолятов с полными рамками считывания S сегмента: геноизолят от пациента (Ivanovskoye_patient), 4 геноизолята от полевых, отловленных на территории Курской области (Ishutino, Klishino, Postoyalyye_Dvory, Klyukva) (Blinova *et al.*, 2022), 4 геноизолята из Московской области (Moscow/CG8409, Moscow/CG8435, Volokolamsk/Mg57, Volokolamsk/Mg79) (Блинова и др., 2023) и один из Ивановской области (Ivanovo/CG8035) (Blinova *et al.*, 2023), а также, согласно дендрограмме по L сегменту, геноизолят Penza/CG8730.

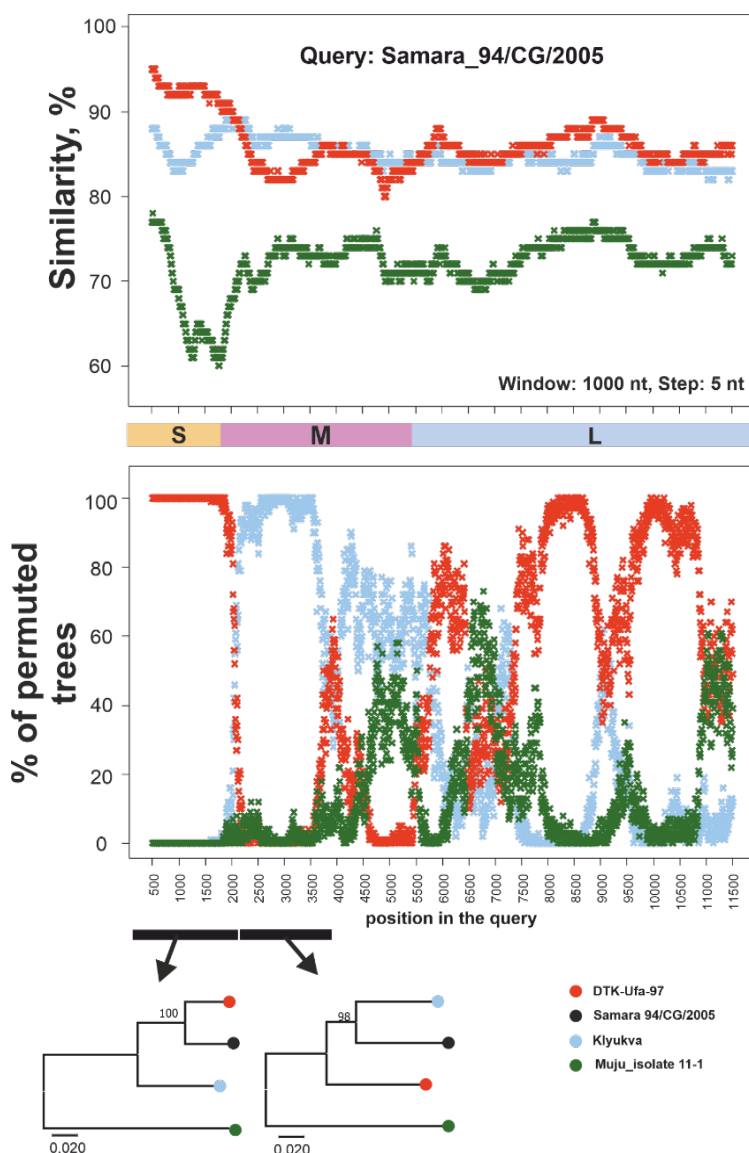
В характере ветвления сублинии W-RUS важно отметить положение последовательности из Ивановской области – Ivanovo/CG8035. На дендрограммах, построенных по М и L сегментам он располагается как внешняя группа по отношению к остальным представителям сублинии W-RUS (исключая реассортантный геноизолят Penza/CG8730 на L сегментном дереве, о чем речь пойдет в следующем разделе). В то же время, на дендрограмме, построенной по S сегменту, Ivanovo/CG8035 кластеризуется вместе с последовательностями из Московской области (Moscow/CG8409, Moscow/CG8435,

Volokolamsk/Mg57, Volokolamsk/Mg79), что указывает на появление этого геноизолята в следствии получения S сегмента от предка последовательностей из Московской области в результате реассортации.

Сигналы реассортации в пределах линии RUS

Обнаружение новых геноизолятов из Курской, Московской и Ивановской областей, формирующих отдельную кладу W-RUS, позволило установить реассортационные события в пределах линии RUS.

Событие рекомбинации или реассортации показано на примере штаммов DTK-Ufa-97, Klyukva и Samara_94/CG/2005 (Рисунок 5). Это позволяет предположить, что штамм Samara_94/CG/2005 возник в результате реассортации или рекомбинации между предками сублинии W-RUS и штамма DTK-Ufa-97 из Башкирии. Важно отметить, что этот филогенетический конфликт был обнаружен с использованием довольно большого размера окна (1000 нуклеотидов), что подтверждает достоверность находки и, следовательно, факт событий рекомбинации или реассортации, происходивших в истории формирования линии RUS.



На верхней панели показана идентичность последовательностей относительно изолята Samara94/CG/2005. На средней панели обозначены конфликтующие филогенетические деревья участков генома. В нижней части рисунка показаны филогенетические деревья по разным участкам генома для изолятов, перечисленных в правом столбце. Построение графика подобия и загрузочное сканирование были выполнены с размером окна/шага 1000/5 нт.

Рисунок 5 - Филогенетическое несоответствие нуклеотидных последовательностей DTK-Ufa-97, Klyukva, and Samara94/CG/2005

Однако, штаммы DTK-Ufa-97, Klyukva и Samara_94/CG/2005 являются лишь частными представителями групп, между которыми происходила реассортация.

Анализ филогенетических деревьев показывает, что по S и L сегментным деревьям линия W-RUS формирует отдельную ветвь, которая является внешней группой по отношению к Volga-RUS (Рисунок 2А,С). А согласно М сегментному филогенетическому дереву (Рисунок 2В), она находится внутри Volga-RUS, и группируется вместе с кладой, содержащей последовательности из Саратовской, Самарской, Пензенской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики. При этом клада, состоящая из штаммов из Республики Башкортостан является внешней группой по отношению к ним. Вероятно, здесь имело место реассортационное событие между предками сублинии W-RUS и Башкирской ветвью, вследствие чего образовалась группа штаммов, которая получила М сегмент от сублинии W-RUS, а S и L сегменты от предков Башкирской клады. Это позволяет предполагать, что штаммы, циркулирующие на территории Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики являются реассортантами.

Что касается Пензенской области, изолят Penza/CG8730 относится к линии Volga-RUS, согласно деревьям, построенным на основании S и М сегментных последовательностей (Рисунок 2А,В). На S сегментном дереве он формирует внешнюю группу по отношению к последовательностям из Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан, Удмуртской Республики, и Республики Башкортостан. На М сегментном дереве он также является внешней группой по отношению к последовательностям из Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики. Однако согласно филогенетическому дереву, построенному на основании L сегмента он принадлежит к сублинии W-RUS. Такое расположение свидетельствует том, что данный изолят является продуктом реассортации и получил L сегмент от предков сублинии W-RUS. Кроме того, тот факт, что на М сегментном дереве изолят Penza/CG8730 кластеризуется с последовательностями из Саратовской и Самарской областей, Татарстана и Удмуртии как внешняя группа по отношению к ним, может свидетельствовать о том, что М сегмент также был получен в результате реассортации от предков сублинии W-RUS. При этом два сегмента могли быть получены как одновременно, так и последовательно, в результате двухсადийной реассортации.

Вероятно также и другое объяснение топологии ветвей, наблюдаемой в пределах генетической линии RUS. Ветвь, относящаяся к Республике Башкортостан, могла получить М сегмент в результате реассортации с неизвестным генетическим вариантом, вследствие чего ее расположение на М сегментном дереве переместилось во внешнюю группу по отношению ко всем остальным представителям генетической линии RUS. В пользу этой версии говорит неизменное на S и М сегментных деревьях взаимное расположение сублинии W-RUS, изолята Penza/CG8730 и клады, состоящей из последовательностей из Саратовской и Самарской областей, Республики Татарстан и Удмуртской Республики.

В этом случае изолят Penza/CG8730 мог получить в результате реассортации от сублинии W-RUS только L сегмент. Стоит отметить, что в большинстве случаев в реассортационном событии участвует М сегмент. Здесь же дочерний штамм получил от одного родительского генотипа L сегмент, а от другого - S и М сегменты, и такие события у хантавирусов более редки (Klempa 2018; Razzauti *et al.*, 2008).

Интересно, что на территориях Приволжского федерального округа регистрируется высокая заболеваемость ГЛПС-Пуумала, часто с тяжелым течением, причем наиболее эпидемиологически активными областями являются Республика Башкортостан и Удмуртская Республика (Tkachenko *et al.*, 2023). А на территориях, где была обнаружена сублиния W-RUS (Курская, Московская и Ивановская области) – показатели заболеваемости более низкие. В литературе это объясняется тем, что в Поволжье находится оптимум ареала популяции рыжей полевки, благодаря обилию кормовой базы, основу которой составляют семена липы (Garanina *et al.*, 2009). Однако вопрос о том, как реассортация повлияла на патогенные свойства вируса остается открытым.

Генетическая линия FIN

Генетическая линия FIN ранее была обнаружена на территории Финляндии, Карелии, а также в Омской области. Есть также данные о циркуляции этой линии в Тюменской области, однако в GenBank имеются лишь неполные нуклеотидные последовательности. Филогенетически линия FIN разделяется на две большие клады, которые содержат последовательности, распространенные на огромном расстоянии друг от друга. К одной из них относятся штаммы из Финляндии и Карелии, к другой – из Омской области.

В этой работе были получены нуклеотидные последовательности пяти геноизолятов вируса Пуумала, выделенных из рыжих полевков, отловленных на территории Тюменской (Tyumen/CG8928, Tyumen/CG6542, Tyumen/CG6541, Tyumen/CG9267, Tyumen/CG8977), и двух - из Архангельской области (Arkhangelsk/CG8594, Arkhangelsk/CG8480) (Blinova *et al.*, 2023).

Нуклеотидные последовательности изолятов из Тюменской, а также Архангельской областей были наиболее близки к последовательностям из Омска согласно S и M сегментным дендрограммам (последовательности L сегмента из Омска не представлены в базе данных GenBank). Ветвь, содержащая последовательности из Омской, Тюменской и Архангельской областей была названа здесь East-FIN (маркирована синим цветом на Рисунке 3). Сублиния содержащая последовательности из Карелии и Финляндии обозначена как West-FIN (маркирована фиолетовым цветом на Рисунке 3).

Интересным является то, что сублинии East-FIN и West-FIN формируют общую ветвь (FIN) на дендрограммах, построенных на основании S и L сегментов. А согласно M сегментному дереву они являются отдельными ветвями (Рисунок 2).

В настоящее время принято считать, что представители линии FIN оказались разнесенными настолько далеко друг от друга (расстояние Карелия-Омск составляет более 2300км) вследствие раннего разделения во время реколонизации освободившихся территорий после окончания ледникового периода (Sironen *et al.*, 2001). Одна часть популяции полевков мигрировала на территорию современной Финляндии, а другая часть, отделенная Уральским горным хребтом, заняла территории к востоку от него.

Согласно деревьям (Рисунок 2А-В), Тюменская и Омская клады были разделены уже после того, как Архангельская клада отделилась от их общего предка. Такой характер ветвления предполагает 2 возможных пути распространения сублинии East-FIN: с северо-запада России на юго-восток, через Уральские горы в Западную Сибирь; или распространение из Предуралья в 2-х направлениях, в Западную Сибирь и в Архангельскую область. Последняя предполагает вторую волну миграции полевков на север после разделения линии FIN на East-FIN и West-FIN в постледниковый период.

Несмотря на данные о заболеваемости ГЛПС на территориях между Архангельском и Зауральем (Республика Коми, Ненецкий, Ямало-Ненецкий, Ханты-Мансийский автономные округа, Свердловская область) (Tkachenko *et al.*, 2019), в базах данных отсутствуют последовательности вируса Пуумала из этих регионов, которые могли бы пролить больше света на вопрос о распространении финской линии. Это подчеркивает актуальность дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами была разработана методика амплификации последовательностей всех сегментов хантавируса Пуумала: выбраны праймеры, подобрана двухстадийная программа амплификации для последующего секвенирования полученных ампликонов (первая стадия в формате мультиплекс, вторая стадия с отдельными парами праймеров). С помощью этой методики были исследованы образцы рыжих полевков, содержащие вирусный материал из Курской, Ульяновской, Саратовской, Ивановской, Московской, Пензенской, Архангельской, Тюменской областей, Удмуртской Республики и Республики

Башкортостан, а также аутопсийный материал пациента, погибшего от ГЛПС. На основании результатов секвенирования вирусного материала, а также данных, представленных в базе GenBank были построены дендрограммы, позволившие сформулировать положения и гипотезы, которые стали выводами данной диссертационной работы. Все они были рассмотрены и обсуждены в контексте современных работ по данной тематике, опубликованных отечественными и зарубежными авторами.

Проведенные нами исследования выявили разнообразие генетических вариантов хантавируса Пуумала, циркулирующих на европейской территории РФ. Нами впервые показано, что на территории Курской, Ивановской и Московской областей имеются очаги сублинии, названной нами W-RUS, относящейся к генетической линии RUS вируса Пуумала. В Архангельской области установлена циркуляция сублинии East-FIN вируса Пуумала, ранее обнаруженной в Омской и Тюменской областях. Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей хантавируса Пуумала свидетельствуют о, вероятно, частых эпизодах реассортации в популяции вируса. Так на территории Приволжского федерального округа установлена циркуляция штаммов, получивших M сегмент в результате реассортации. На территории Пензенской области обнаружен генетический вариант хантавируса Пуумала, который, по-видимому, образовался в результате реассортации, получив L сегмент от предков сублинии W-RUS, что является относительно редким событием в эволюционной истории хантавирусов – как правило, реассортанты обмениваются M сегментом.

В данной диссертационной работе была разработана методика количественного определения РНК хантавируса Пуумала с помощью ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. С помощью этого метода был выполнен количественный анализ аутопсийного материала от погибшего пациента из Курской области.

На основании полученных данных об актуальном разнообразии штаммов хантавируса Пуумала, циркулирующих на территории РФ, разработана кандидатная тест-система для выявления хантавируса Пуумала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. На ее основании на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора ведется разработка коммерческого набора реагентов для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на ГЛПС, а также для скрининговых исследований грызунов на инфицированность хантавирусом Пуумала.

ВЫВОДЫ

1. Разработан протокол пробоподготовки биологического материала, содержащего хантавирус Пуумала, для последующего секвенирования.

2. Получены более 98% кодирующих последовательностей L сегмента для 14 новых генетических вариантов хантавируса Пуумала; полные кодирующие последовательности M сегмента для 12 геноизолятов и около 90% кодирующих последовательностей M сегмента для 2 геноизолятов хантавируса Пуумала; полные кодирующие последовательности S сегмента для 24 геноизолятов хантавируса Пуумала.

3. Разработана кандидатная тест-система для дифференциальной диагностики хантавируса Пуумала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Установлена ее чувствительность к генетическим вариантам вируса Пуумала, циркулирующим в различных регионах России.

4. На территории ЦФО обнаружены представители новой клады хантавируса Пуумала, что позволило выявить ранее неизвестные события реассортации в эволюционной истории генетической линии RUS хантавируса Пуумала.

5. В Архангельской области впервые выявлены представители восточной клады генетической линии FIN хантавируса Пуумала, ранее обнаруженной на территории Западной Сибири.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В настоящее время молекулярно-генетические методы постоянно развиваются и совершенствуются, однако на момент написания данной диссертационной работы на территории Российской Федерации отсутствуют рекомендованные в медицинской практике наборы для диагностики ГЛПС-Пуумала методом ПЦР.

Разработанные нами олигонуклеотиды для проведения ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией будут использованы для создания набора реагентов для клинической лабораторной диагностики больных с подозрением на ГЛПС-Пуумала. Разработка такого набора является логичным продолжением представленного исследования. Для его регистрации в качестве медицинского изделия и внедрения в медицинскую практику предстоит проведение клинических испытаний набора.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для получения сведений об актуальном разнообразии хантавируса Пуумала на всей территории РФ необходимо получить данные о генетических вариантах, циркулирующих на территории всех регионов, в которых наблюдается заболеваемость ГЛПС-Пуумала. На данный момент в базах данных отсутствуют сиквенсы вируса Пуумала, циркулирующего в Белгородской, Брянской, Владимирской, Воронежской, Калужской, Костромской, Липецкой, Орловской, Рязанской, Смоленской, Тамбовской, Тверской, Тульской, Ярославской областях, относящихся к Центральному федеральному округу; в Республике Коми, Вологодской, Ленинградской, Мурманской, Новгородской, Псковской областях, Ямало-Ненецком, Ханты-Мансийском автономных округах, Свердловской области. Также интерес представляет Калининградская область, где, вероятно, можно будет обнаружить сублинию Balt-RUS вируса Пуумала и получить последовательности М и L сегментов, не представленные в базах данных.

Получение этих сведений позволит совершенствовать методы диагностики ГЛПС, а также пролить свет на эволюционную историю хантавируса Пуумала, и выдвинуть предположения о путях его распространения по территории Российской Федерации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мочалкин П.А., Акимкин В.Г., Углева С.В., Морозкин Е.С., **Блинова Е.А.**, Сычева К.А., Скрипниченко Д.Д., Бондаренко Т.А., Эпик Ю.О., Макенов М.Т., Казак А.А., Попова А.К., Скотарева М.А., Иванова О.В., Гарифуллин Б.Р., Попов Н.В. / Сочетанная циркуляция хантавирусов Пуумала, Тула, Сивис на территории Республики Башкортостан // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. – №. 2. – С. 140-147. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-140-147 (Scopus, перечень ВАК, K1, 0,500/0,031п.л.).
2. **Блинова Е.А.**, Макенов М.Т., Морозкин Е.С., Холодилов И.С., Федорова М.В., Журенкова О.Б., Роев Г.В., Хафизов К.Ф., Карань Л.С. / Генетические особенности вируса Пуумала (Hantaviridae: Orthohantavirus), обнаруженного в Московской области // Вопросы вирусологии. - 2023. - Т. 68. - №4. - С. 283-290. DOI: 10.36233/0507-4088-177 (RSCI, Scopus, PubMed, перечень ВАК, K1, 0,500/0,056п.л.).
3. **Blinova E.**, Deviatkin A., Makenov M., Popova Y., Dzagurova T. / Evolutionary Formation and Distribution of Puumala Virus Genome Variants, Russia // Emerging Infectious Diseases. – 2023. – V. 29. – №. 7. – P. 1420. DOI: 10.3201/eid2907.221731 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q1, 0,313/0,063п.л.).
4. Tkachenko E., Kurashova S., Balkina A., Ivanov A., Egorova M., Leonovich O., Popova Y., Teodorovich R., Belyakova A., Tkachenko P., Trankvilevsky D., **Blinova E.**, Ishmukhametov A., Dzagurova T. / Cases of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Russia

during 2000-2022 // *Viruses*. – 2023. – V. 15. – №. 7. – P. 1537. DOI: 10.3390/v15071537 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q1, 0,813/0,058п.л.).

5. Ветрова А.Н., Курашова С.С., Теодорович Р.Д., Попова Ю.В., **Блинова Е.А.**, Набатников П.А., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. / Влияние условий хранения на стабильность хантавирусных вакцинных препаратов на основе вируса Пуумала // *Инфекция и иммунитет*. - 2023. - Т. 13. - №2. - С. 376-382. DOI: 10.15789/2220-7619-OOS-2116 (Web of Science, RSCI, Scopus, перечень ВАК, K1, 0,438/0,055п.л.).

6. **Blinova E.**, Deviatkin A., Kurashova S., Balovneva M., Volgina I., Valdokhina A., Bulanenko V., Popova Y., Belyakova A., Dzagurova T. // A fatal case of haemorrhagic fever with renal syndrome in Kursk Region, Russia, caused by a novel Puumala virus clade // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2022. – V. 102. – P. 105295. DOI: 10.1016/j.meegid.2022.105295 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2, 0,375/0,038п.л.).