

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии физиологии растений

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА ВИРУСА
ПУУМАЛА НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 3 курса 331 группы
направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
биологического факультета
Краснова Ярослава Михайловича

Научный руководитель:

д-р биол. наук, доц.

УМ 26.11.25.

Д.В. Уткин

Научный консультант:

зав. отделом, канд. биол. наук

Осина 26.11.25

Н.А. Осина

Зав. кафедрой:

д-р биол. наук, доц.

УМ 26.11.25.

Д.В. Уткин

Саратов 2025

Введение

Актуальность темы. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является одной из серьезных проблем общественного здравоохранения Российской Федерации. ГЛПС – это острое вирусное зоонозное природно-очаговое заболевание [1]. В 1978 году ГЛПС включена в официальную отчетность Министерства здравоохранения Российской Федерации [2]. Самые активные эпидемические очаги ГЛПС в России находятся в Приволжском федеральном округе (ПФО). Только в течение последних 10 лет (2015–2024 годы) в России зарегистрировано 64954 случая заболевания ГЛПС, то есть, ежегодно происходило от 2 до 14 тысяч случаев заболевания ГЛПС [3].

Районирование территории Саратовской области показало, что в 16 из 38 её административных районов за период с 2010 по 2022 годы была отмечена высокая интенсивность эпидемических проявлений ГЛПС. К особенно неблагополучным районам Саратовской области относится, в том числе Гагаринский район, включая природный парк «Кумысная поляна», окаймляющий современный город Саратов с запада [4].

Наиболее распространенным возбудителем ГЛПС является вирус Пуумала (*Puumala orthohantavirus*), основной природный носитель (хозяин) которого – рыжая полевка *Myodes glareolus* (Schreber, 1780). Вирус Пуумала, как и другие хантавирусы, принадлежит к роду *Orthohantavirus* семейства *Hantaviridae* [5, 6].

Молекулярная эволюция ортохантавирусов может привести к появлению вариантов, более адаптированных к хозяину-грызуну, а также к существенным изменениям патогенности вируса по отношению к человеку [7].

Анализ научных работ показал ограниченность данных о генетическом разнообразии вируса Пуумала в Гагаринском районе и полном отсутствии таких данных из других районов Саратовской области [8-12].

Понимание процессов, приводящих к разнообразию вариантов генома, способствует прогнозу и оценке потенциальной инфекционной способности у вновь выделяемых вариантов вируса вызывать тяжелые заболевания и

вспышки. Таким образом, изучение вариаций генома вируса Пуумала имеет фундаментальное и практическое значение для эпидемиологического контроля за ГЛПС.

Цель и задачи исследования. Цель работы - изучение молекулярно-генетического разнообразия вариантов генома вируса Пуумала на территории Саратовской области и установление их филогенетического родства с вариантами данного вируса из других субъектов России.

Для решения указанной цели были определены следующие задачи:

1. Подготовка генетического материала, содержащего нуклеиновые кислоты генома вируса Пуумала, выделенные из биологических исследуемых образцов, собранных на территории Саратовской области;
2. Проведение секвенирования подготовленных фрагментов ДНК (ПЦР-продуктов), сборка сегментов генома вариантов вируса Пуумала;
3. Молекулярно-генетический анализ вариантов генома вируса Пуумала циркулирующих на территории Саратовской области;
4. Установление филогенетического родства исследованных вариантов вируса Пуумала с вариантами данного вируса из других субъектов России.

Научная новизна и практическая значимость работы:

- Определены нуклеотидные последовательности 33 вариантов генома вируса Пуумала, циркулирующего на мышевидных грызунах на территории четырех районов Саратовской области. Полученные полные геномы вирусов депонированы в международной базе данных NCBI GenBank. Варианты генома вируса Пуумала из Энгельсского, Новобурасского Хвалынского районов Саратовской области были впервые депонированы в базу NCBI.

- Установлено, что варианты вируса Пуумала, циркулирующие в Гагаринском, Энгельсском, Новобурасском районах и в меньшей степени в Хвалынском районе Саратовской области, имеют высокую степень подобия геномов, что говорит об их принадлежности к одному природному очагу ГЛПС.

- Обнаружено, что варианты вируса Пуумала из Хвалынского района имеют значительные отличия по сегменту S генома от вариантов, полученных

из центральных районов Саратовской области. Варианты вируса Пуумала из Хвалынского района имеют реассортацию по сегменту S, который был ими получен, вероятно, при контакте с вариантами этого вируса из природного очага ГЛПС юга Ульяновской области.

Практическое значение для эпидемиологического контроля за ГЛПС в Саратовской области и субъектах ПФО имеют полученные новые данные о вариантах генома вируса Пуумала из четырех районов Саратовской области, которые позволяют по геному вируса довольно точно определять район возможного инфицирования заболевших ГЛПС и места обитания переносчиков данных вариантов вируса.

Материал и методы исследования. Объектом исследования являлся генетический материал, выделенный из органов 38 мышевидных грызунов, собранных в 2019–2022 гг. в Гагаринском (включая природный парк «Кумысная поляна»), а также в Энгельском, Новобурасском и Хвалынском районах Саратовской области. Всего было протестировано проб выделенных от 176 мышевидных грызунов. В результате чего 38 проб имели положительный ответ (РНК Пуумала+, со значением $Ct \leq 25$) при тестировании набором реагентов «ОМ-Скрин-ГЛПС-РВ».

В работе использованы молекулярно-генетические и биоинформатические методы исследования.

Молекулярно-генетические методы

Выделение нуклеиновых кислот осуществляли согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» с помощью набора для экстракции РНК/ДНК «АмплиПрайм РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) по инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили комплектом реагентов «Реверта-Л» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Присутствие генетического материала вируса Пуумала в полевых образцах определяли, набором реагентов «ОМ-Скрин-ГЛПС-РВ» (НПК «Синтол», Россия).

Для специфического обогащения нуклеотидных фрагментов генома вируса Пуумала (сегменты S, M и L) в образцах нуклеиновых кислот, выделенных из полевого материала, использовали ПЦР со специфическим набором праймеров, рассчитанных сотрудниками отдела микробиологии.

Стратегия определения нуклеотидной последовательности полученных специфичных продуктов ПЦР строилась на применении технологии высокопроизводительного секвенирования и последующей доработки проблемных участков генома с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Высокопроизводительное секвенирование проводили по технологии Ion Torrent на системе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США).

Секвенирование по Сэнгеру выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 xl (Applied Biosystems, США).

Биоинформатические методы

Сборку секвенированных фрагментов в одну полную последовательность каждого из сегментов генома у исследуемых вариантов вируса, осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) и UGENE (<http://ugene.net>).

При построении филогенетических деревьев использовался алгоритм maximum parsimony и программный пакет BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Бельгия). Анализировались полученные нуклеотидные последовательности сегментов S, M и L генома вируса Пуумала, определенные у 33 его вариантов в результате проведенных исследований, а также соответствующие последовательности вариантов этого вируса представленные в международной базе данных NCBI GeneBank.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, приложения. Общий объем работы 62

страницы. Работа содержит 4 таблицы, иллюстрирована 10 рисунками. Список использованной литературы содержит 45 наименований.

Основное содержание работы

В первой главе представлен анализ литературных данных о характеристике вируса Пуумала. Рассмотрена экология вируса Пуумала, ареал обитания его хозяев (грызуны и насекомоядные), пути передачи вируса в популяции его переносчиков и от них человеку [13, 14, 15]. Рассмотрено строение генома ортохантавирусов, который представляет собой одноцепочечную РНК с отрицательным смыслом, разделенную на три сегмента: S (маленький), M (средний) и L (большой), кодирующие белок нуклеокапсида (N), гликопротеины оболочки (Gn и Gc) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), соответственно [16]. Представлены сведения о генетическом разнообразии и эволюции вируса Пуумала в мире и на территории России, а также дана эпидемиологическая обстановка по ГЛПС в России и на территории Саратовской области [3, 4, 8-12]. Рассмотрены молекулярно-генетические методы анализа при исследовании генома хантавирусов, как оптимальные для идентификации вируса в биологическом материале [17, 18]. Рассмотрен геномный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вирусного генома, являющиеся эффективным инструментом для проведения генетического типирования вирусов, идентификации новых вирусов, выполнения эволюционного анализа [8-12].

В третьей главе представлены результаты молекулярно-генетического анализа полученных последовательностей генома вариантов вируса Пуумала на территории Саратовской области.

Полученные полные геномы вирусов в количестве 33 вариантов с наиболее качественным уровнем прочтения депонированы в международной базе данных NCBI GenBank.

Молекулярно-генетический анализ вариантов сегмента S генома вируса Пуумала показал, что на территории трех центральных районов Саратовской

области (Гагаринский, Энгельсский и Новобурасский) циркулируют гомологичные друг другу варианты вируса Пуумала с отличием в нуклеотидной последовательности сегмента S генома не более 1,5 %. По-видимому данные территории являются одним природным очагом ГЛПС. Сегмент S генома вариантов вируса Пуумала из Хвалынского района Саратовской области при сравнении с вариантами этого вируса из Гагаринского, Энгельсского и Новобурасского районов, отличались от последних в среднем на 4,9 %. Найденные отличия представлены только множеством единичных мутаций (около 65). Таким образом, по сегменту S выявлено достаточно большое количество отличий среди вариантов генома вируса Пуумала из удаленного Хвалынского района по сравнению с вариантами из Энгельсского, Гагаринского и Новобурасского районов, которые граничат друг с другом.

Молекулярно-генетический анализ вариантов сегментов M и L генома вируса Пуумала показал, что на территории всех четырех исследованных районов Саратовской области (Гагаринский, Энгельсский, Новобурасский и Хвалынский) циркулируют гомологичные друг другу варианты вируса Пуумала с отличием в нуклеотидной последовательности, по сегментам M или L не более 3 %. Однако все варианты из Хвалынского района содержат в несколько раз больше мутаций, отличающих их от группы вариантов из Гагаринского, Энгельсского и Новобурасского районов, которые в свою очередь не отличаются друг от друга более, чем на 1,6 %. Таким образом, по сегментам M и L выявлена высокая идентичность последовательностей для вариантов вируса Пуумала из Энгельсского, Гагаринского и Новобурасского районов. Варианты вируса Пуумала из Хвалынского района по последовательности сегментов M и L немного удалены от группы описанных выше вариантов из центральных районов.

Филогенетический анализ геномов вируса Пуумала подтвердил выявленные отличия в виде соответствующей кластеризации и характеру расположения на филогенетическом дереве исследованных вариантов генома

вируса Пуумала. Так, в случае сегмента S варианты вируса из Энгельсского, Гагаринского и Новобурасского районов сформировали компактную гомологичную группу, расположенную на отдельной ветви в кластере, представленном вариантами вируса Пуумала из ПФО. При этом варианты из Хвалынского района также располагались в данном кластере, но на своей отдельной ветви и значительно ближе к вариантам вируса Пуумала из Самарской области, Республики Татарстан и Ульяновской области (рисунок 1). Полученные в работе данные позволяют утверждать, что варианты вируса Пуумала из Хвалынского района имеют реассортацию в геноме по сегменту S, последовательность которого близка к вариантам этого вируса из природных очагов ГЛПС юга Ульяновской области и/или западной части Самарской области. В целом кластеризация по сегменту S показывает, что все варианты генома вируса с территории ПФО, использованные в анализе имеют общее происхождение от одного предкового варианта вируса Пуумала или нескольких близких друг к другу его вариантов.

В случае сегментов M и L, варианты вируса из Энгельсского, Гагаринского и Новобурасского районов, также сформировали компактную гомологичную группу. При этом в обоих случаях варианты из Хвалынского района располагались вместе с ними на одной ветви в кластере, представленном вариантами вируса Пуумала из субъектов ПФО.

Таким образом, полученные данные о вариантах генома вируса Пуумала из четырех районов Саратовской области показывают принадлежность данных вирусов к одному очагу ГЛПС. Однако, варианты вируса Пуумала из Хвалынского района имеют реассортацию в геноме по сегменту S, вероятно, ввиду зоны контакта с носителями вируса в природных очагах ГЛПС на территории Ульяновской и/или Самарской области.

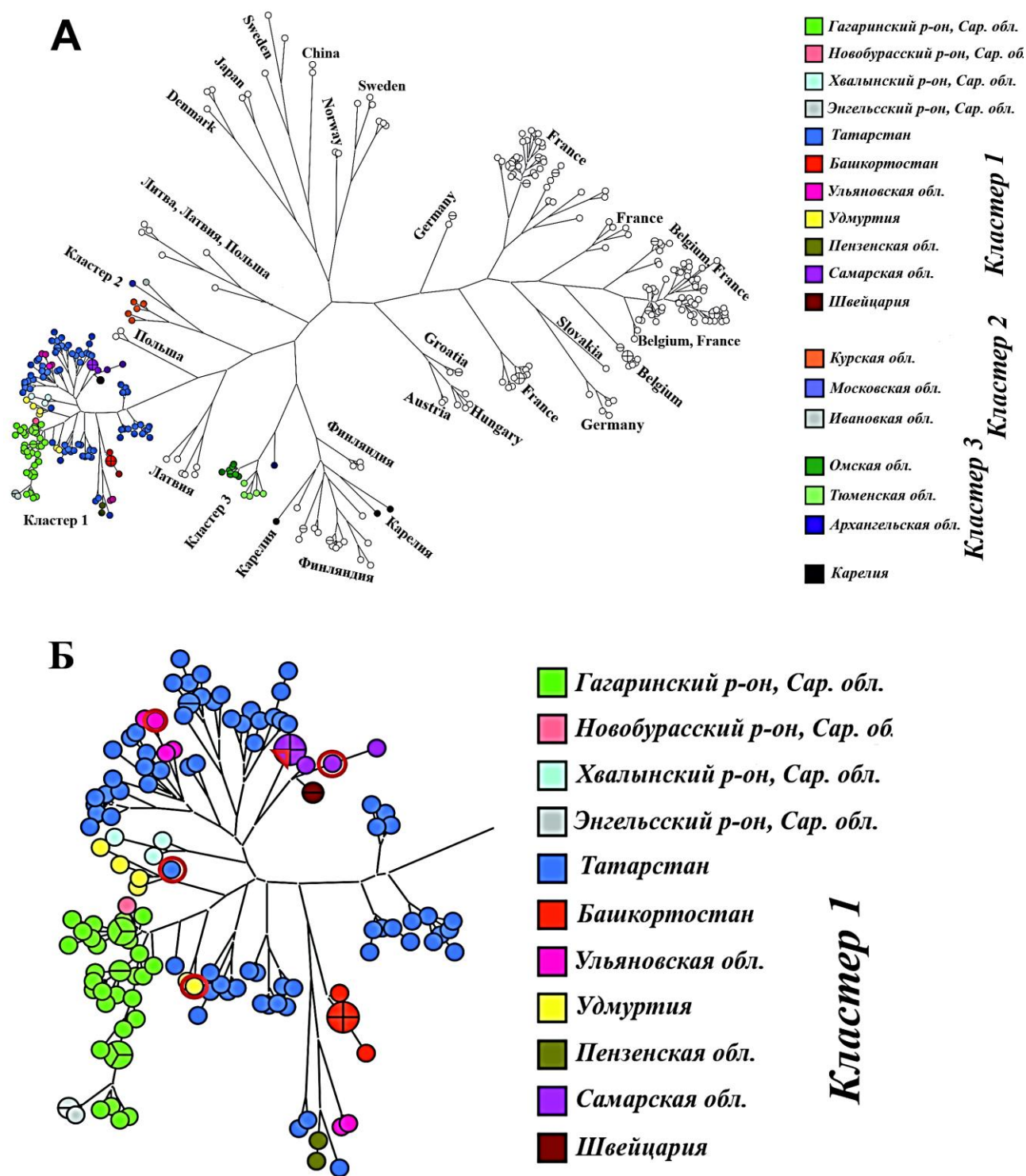


Рисунок 1 — Филогенетическое дерево, отображающее близость родства между 368 вариантами генома (сегмент S) вируса Пуумала с территории России, стран ближнего и дальнего зарубежья (А), увеличенный кластер 1 (Б)

Выводы

1. Варианты вируса Пуумала, циркулирующие в Гагаринском, Энгельсском, Новобурасском районах и в меньшей степени в Хвалынском районе Саратовской области имеют высокую степень подобия геномов, что свидетельствует об их принадлежности к одному природному очагу ГЛПС.

2. Последовательности генома вариантов вируса Пуумала из Хвалынского района имеют реассортацию по сегменту S, последовательность которого близка к вариантам этого вируса из природных очагов ГЛПС юга Ульяновской области и/или западной части Самарской области. Это единственное значительное отличие вариантов из Хвалынского района от вариантов вируса Пуумала, полученных из центральных районов Саратовской области.

3. Полученные варианты генома вируса Пуумала от его переносчиков с территории Саратовской области входят в один общий филогенетический кластер, образованный вариантами этого вируса с территории субъектов ПФО, что подтверждает единство происхождения вируса Пуумала в этом регионе.

4. Наблюдается выраженная территориальная приуроченности носителей вариантов вируса Пуумала к определенным регионам и областям. Это позволяет по геному вируса довольно точно определять район возможного инфицирования заболевших ГЛПС и места обитания переносчиков данных вариантов вируса *Puumala orthohantavirus*.

Список использованных источников

1. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. / Т. А. Савицкая [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. – С. 85–95. – DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-85-95.

2. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: учебное пособие. – URL: https://irbis.rmapo.ru/UploadFilesUchebPosobiya/uchposobie_gemorragicheskaya_lihoradka_s_pochechnim_sindromom.pdf (дата обращения: 13.10.2025).

3. 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 [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. – № 1. – С. 113–124. – DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-113-124.

4. Районирование территории Саратовской области по интенсивности эпидемических проявлений ГЛПС с использованием ГИС-анализа / Е. А. Чумачкова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 3. – С. 156–163. – DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-156-163.

5. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia / E. A. Tkachenko [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 25, № 12. – P. 2325–2328. – DOI: 10.3201/eid2512.181649.

6. ICTV. Taxonomy Browser. – URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 13.05.2024). – Current ICTV Taxonomy Release.

7. First insights into *Puumala orthohantavirus* circulation in a rodent population in Alsace, France / E. Monchatre-Leroy [et al.] // Zoonoses and Public Health. – 2018. – Vol. 65. – P. 540–551.

8. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 г. / Л. Н. Яшина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 4. – С. 150–156. – DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-150-156.

9. Evolutionary formation and distribution of Puumala virus genome variants, Russia / E. Blinova [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2023. – Vol. 29, № 7. – P. 1420–1424. – DOI: 10.3201/eid2907.221731.

10. The Distribution of *Puumala orthohantavirus* genome variants correlates with the regional landscapes in the Trans-Kama area of the Republic of Tatarstan / Y. N. Davidyuk [et al.] // Pathogens. – 2021. – Vol. 10, № 9. – P. 1169. – DOI: 10.3390/pathogens10091169.

11. *Puumala orthohantavirus* reassortant genome variants likely emerging in the watershed forests / E. Kabwe [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 2. – P. 1018. – DOI: 10.3390/ijms24021018.

12. Analysis of *Puumala orthohantavirus* genome variants identified in the

territories of Volga Federal District / E. Kabwe [et al.] // Tropical Medicine and Infectious Disease. – 2022. – Vol. 7, № 3. – P. 46. – DOI: 10.3390/tropicalmed7030046.

13. Особенности природной очаговости хантавирусных зоонозов / А. Д. Бернштейн [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 2. – С. 5–13. – URL: <https://elibrary.ru/micwyl> (дата обращения: 13.05.2024).

14. Phylogeographic diversity and hybrid zone of *Hantaan orthohantavirus* collected in Gangwon Province, Republic of Korea / G. Y. Lee [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2020. – Vol. 14, № 10: e0008714. – DOI: 10.1371/journal.pntd.0008714.

15. Puumala virus infection in family, Switzerland / P. Vetter [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 27, № 2. – P. 658–660. – DOI: 10.3201/eid2702.203770.

16. Mir M. A. Hantaviruses / M. A. Mir // Clinics in Laboratory Medicine. – 2010. – Vol. 30, № 1. – P. 67–91. – DOI: 10.1016/j.cll.2010.01.004.

17. Волков, А. Н. Молекулярно-генетические методы в практике современных медико-биологических исследований. Часть I: Теоретические основы ПЦР-диагностики / А. Н. Волков, Л. В. Начева // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2020. – Т. 5, № 4. – С. 133–140.

18. Волков, А. Н. Молекулярно-генетические методы в практике современных медико-биологических исследований. Часть II: использование ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний человека / А. Н. Волков, Л. В. Начева, Ю. В. Захарова // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2021. – Т. 6, № 1. – С. 77–85. – DOI: 10.23946/2500-0764-2021-6-1-77-85.

