

С.В. Альховский, А.М. Щетинин, Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов, П.Г. Дерябин, Д.Н. Львов, Е.И. Самохвалов,
А.К. Гительман, А.Г. Ботиков

Вирус Хурдун (KHURV): новый вирус рода *Orthobunyavirus* (*Bunyaviridae*)

фГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва

Вирус Хурдун (*Khurdun virus*, KHURV) был изолирован в 2001 г. от лысухи (*Fulica atra* Linnaeus, 1758) в дельте Волги (Астраханская область, Россия). Вирус не удалось идентифицировать иммунологическими методами. В настоящей работе геном вируса KHURV был секвенирован *de novo* (на приборе MiSeq, Illumina). Показано, что геном KHURV представлен тремя сегментами РНК негативной полярности (L-сегмент, 6256 н.о.; М-сегмент, 3161 н.о.; S-сегмент, 950 н.о.). Концевые последовательности геномной РНК представлены каноническими для вирусов рода *Orthobunyavirus* (*Bunyaviridae*) повторами. Уровень идентичности белков KHURV с ортобуньявирусами составляет от 22% (N) до 30% (RdRp). S-сегмент KHURV не кодирует белок NSs. Характерной особенностью KHURV является укороченный М-сегмент, который в отличие от ортобуньявирусов не кодирует белок NSm. Также меньшим размером отличается поверхностный белок Gp (679 а.к. против 950 а.к.). Вместе с тем уровень идентичности оболочечных белков Gp и Gc вируса KHURV с ортобуньявирусами составляет 28 и 30% соответственно. На основе молекулярно-генетического и филогенетического анализа вирус KHURV был предварительно отнесен нами к роду *Orthobunyavirus* (*Bunyaviridae*). Вместе с тем, учитывая уникальную структуру М-сегмента, нельзя исключать возможность выделения KHURV в отдельный род "*Khurduvirus*" в составе сем. *Bunyaviridae*.

Ключевые слова: буньявирусы; ортобуньявирусы; вирус Хурдун; *Khurdun virus*; KHURV.

The Khurdun Virus (KHURV): a New Representative of the Orthobunyavirus (*Bunyaviridae*)

S. V. Alkhovskiy, A. M. Shchetinin, D. K. Lvov, M. Yu. Shchelkanov, P. G. Deryabin, D. N. Lvov, E. I. Samokhvalov, A. K. Gitelman, A. G. Botikov

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

Unidentified Khurdun virus (KHURV) was isolated in 2001 from coot (*Fulica atra*, Linnaeus, 1758) in the Volga River delta (Astrakhan Region, Russian Federation). Here we report that the KHURV genome was *de novo* sequenced (on Illumina platform) and the KHURV was classified as a novel prototypic bunyavirus. The KHURV genome comprises three negative-sense RNA segments (L, M, and S); its terminal nucleotide sequences are canonical for the *Orthobunyavirus* genus. Based on the results of the molecular-genetic and phylogenetic analysis we suggest that the KHURV belongs to the genus *Orthobunyavirus* (*Bunyaviridae*).

Key words: *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*, *Khurdun virus*, KHURV

Введение

Прототипный штамм вируса Хурдун (*Khurdun virus*, KHURV) LEIV-Ast01-5 (депонирован в Государственную коллекцию вирусов 04.11.04 №992) был изолирован из пула внутренних органов (мозг, селезенка) лысухи (*Fulica atra* Linnaeus, 1758; *Gruiformes*: *Rallidae*), добытой в природных биоценозах западной части средней дельты Волги (урочище Хурдун, Астраханская область) [1]. Полевой материал собран 3 августа 2001 г. и исследован путем заражения 2–3-дневных мышей и клеточной культуры Vero-E6. Инкубационный период составлял 5–12 дней после первого пассажа и 3–6 дней после второго и последующих. После инкубационного периода развивались симптомы поражения ЦНС (энцефалит) с летальным исходом. Титр вируса в тканях мозга достигал 10^6 LD₅₀/0,01 мл.

При заражении KHURV клеточной культуры Vero-E6 наблюдали ЦПД, титр вируса на 7–8-е сутки достигал 7 lg ЦПД₅₀/0,1 мл. Позднее, в 2001–2004 гг., 9 штаммов KHURV были изолированы при обследовании 117 лысух (зараженность 8,5%), и 1 штамм KHURV был изолирован от малого баклана (*Phalacrocorax rugmaeus*; *Pelecaniformes*: *Phalacrocoracidae*) при обследовании 289 птиц (0,3%).

В дельте Волги показана циркуляция шести арбовирусов, в том числе связанных с птицами [2, 3]. Однако KHURV не удалось идентифицировать серологическими методами (иммуноферментный анализ) с использованием специфических сывороток к флавивирусам (*Flaviviridae*: *Flavivirus* (WNV), тогавирусам (*Togaviridae*: *Alfavirus* (SNV), буньявирусам (*Bunyaviridae*: *Orthobunyavirus* (BATV), *Phlebovirus*

Контактная информация:

Альховский Сергей Владимирович; e-mail: salkh@ya.ru

(BHAV), *Nairovirus* (CCHFV)), ортомиксовирусам (*Orthomyxoviridae: Thogotovirus* (DHOV)) [1].

В настоящей работе проведено секвенирование генома вируса KHURV и определено его таксономическое положение. На основании молекулярно-генетического и филогенетического анализа вирус KHURV был предварительно отнесен нами к роду *Orthobunyavirus* (*Bunyaviridae*).

Материалы и методы

Использованные вирусы и выделение РНК. Вирус KHURV (штамм LEIV-Ast01–5) был получен из Государственной коллекции вирусов РФ ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России в виде лиофилизированной мозговой суспензии. Вирус был накоплен на культуре клеток Vero-E6 в течение 7 сут. Вирус был сконцентрирован из 20 мл культуральной жидкости и очищен (через 20% сахарозу) методом ультрацентрифугирования (30 000 об/мин 1 ч, ротор Ti45). Сконцентрированный вирус лизирован в 500 мкл лизирующего буфера RTL (QIAGEN, Германия). Далее вирусную РНК выделили набором «RNeasy mini kit» (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAcube (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией. Концентрацию РНК измеряли с использованием флюориметра Qubit (Invitrogen, США).

Подготовка библиотек и секвенирование. 100 нг тотальной РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы (50 mM tris-HCl (pH 8,3; at 25°C), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT, dNTP (1 mM каждого) и гексапраймер (0,2 мкг)) при 85°C в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium (Thermo Scientific, США) и 20 ед. ингибитора РНаз RNasin (Promega, США). Инкубировали при 25°C 10 мин, далее при 42 °C 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70 °C 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с использованием набора NEBNext[®] mRNA Second Strand Synthesis Module (NEB, США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали с помощью набора MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAcube.

Для получения ДНК-библиотек из дцДНК использовали набор TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 (Illumina, США) в соответствии с инструкцией. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Германия). Измерение молярности полученных библиотек проводили методом ПЦР в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad, США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве «Sequencing Library qPCR Quantification Guide» (Illumina, США).

Сиквенс библиотек осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Kits V2 (300PE) в соответствии с инструкцией производителя.

Концевые области генома амплифицировали, используя набор «Mint RACE cDNA amplification set» («Евроген», Москва). Секвенирование пробелов и концевых областей проводили на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystem, США).

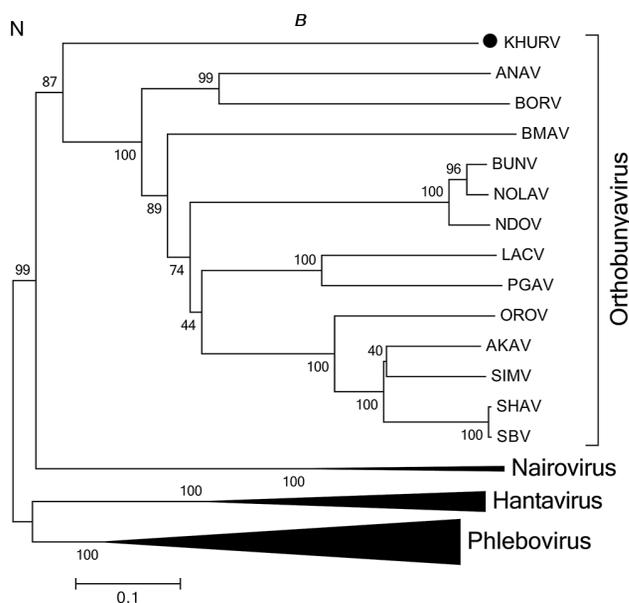
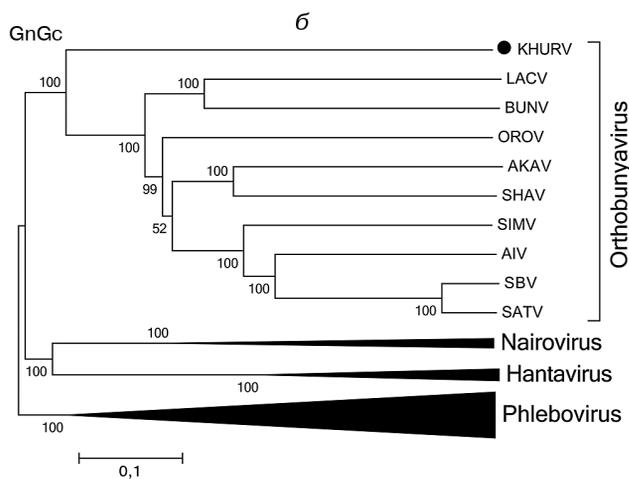
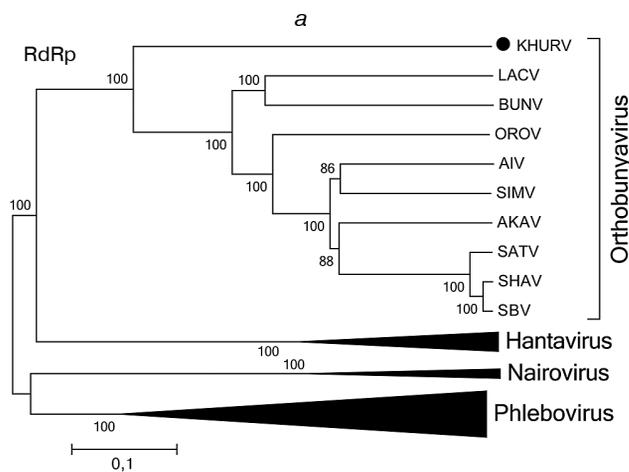
Биоинформационный анализ. Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов осуществляли с использованием программы «CLC Genomics Workbench 5.5» (CLC bio, США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью сервиса BALSTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для подбора праймеров, множественного выравнивания, анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ «Lasergene Core Suite» (DNASTAR, США). Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму ClustalW. Филогенетический анализ осуществляли, используя программу MEGA5. Поиск сайтов гликозилирования, сайтов нарезания сигнального пептида и трансмембранных доменов проводили с помощью on-line-ресурсов NetNGlyc1.0, SignalP и TMHMM2.0 соответственно (сайт CBS Prediction Servers <http://www.cbs.dtu.dk/services>).

Результаты и обсуждение

Полногеномное секвенирование вируса KHURV проводили в мультиплексном формате в составе 24-индексированных ДНК-библиотек. В результате *de novo* сборки ридов получили протяженные последовательности, практически полностью перекрывающие геном вируса. Результаты предварительного анализа с использованием сервиса BLASTX показали, что полученные последовательности принадлежат неизвестному вирусу, имеющему 25–32% идентичности с вирусами рода *Orthobunyavirus* (сем. *Bunyaviridae*). После подбора специфических праймеров концевые последовательности генома KHURV получали методом RACE и секвенировали. В результате определили, что геном KHURV состоит из трех сегментов РНК негативной полярности: L (длина 6604 н.о.), M (3201 н.о.) и S (950 н.о.). Концевые нуклеотидные последовательности генома KHURV являются каноническими для ортобуньявирусов 3'-UCAUCACAUG и CGTGTGATGA-5' [4]. Однако одна замена в 3'-концевой последовательности найдена в S-сегменте генома KHURV 3'-UCAUCACGUG.

L-сегмент KHURV имеет одну протяженную открытую рамку считывания (ОРС) длиной 6526 н.о., которая кодирует белок длиной 2174 а.к. Стартовый кодон начинается с 29 н.о. В результате анализа последовательности выявили в полипротеине консервативный домен (pfam04196), соответствующий РНК-зависимой РНК-полимеразе (RdRp) буньявирусов. Наибольший уровень идентичности RdRp KHURV имеет с вирусами La Cross (33,4%) и Bunyamwera (BUNV) (33,1%). Однако в консервативном полимеразном домене III (сформированном мотивами А, В, С, D и E) [5] уровень идентичности KHURV с другим ортобуньявирусами достигает 62% (BUNV).

М-сегмент вируса KHURV значительно короче, чем у других ортобуньявирусов (3–161 н.о. против 4 451 н.о. у BUNV). В М-сегменте KHURV расположена одна протяженная ОРС длиной 2997 н.о., которая кодирует полипротеин длиной 998 а.к. Полипротеин G, кодируемый М-сегментом буньявирусов, является предшественником оболочечных гликопротеидов Gc и Gn, которые образуются после его нарезания клеточными пептидазами. У ортобуньявирусов и москитных флебовирусов при нарезании полипротеина также образуется неструктурный белок NSm, кото-



Дендрогаммы, построенные на основе сравнения последовательностей белков вируса KHURV с другими буньявирусами.

a – РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp, L-сегмент); *б* – полипротеин предшественник оболочечных белков Gn и Gc (M-сегмент); *в* – белок нуклеокапсида (N, S-сегмент). Представлены вирусы: Bunyamwera (BUNV), La Cross (LACV), Simbu (SIMV), Akabane (AKAV), Shamonda (SHAV), Pongola (PGAV), Nyando (NDOV), Oropuche (OROV), Anopheles A (ANAV), Boraceia (BORV), Nola (NOLAV), Batama (BMAV).

рый, вероятно, является одним из факторов вирулентности и способен блокировать апоптоз в зараженных клетках.

При анализе последовательности G-полипротеина KHURV в программе SignalP не выявили на N-конце сигнального пептида, который у буньявирусов обычно представлен первыми 15–17 а.к. Предполагаемый сайт нарезания Gc/Gn у KHURV имеет вид ASA/EN в позиции 319/320. Эта структура соответствует сайту нарезания NSm/Gn у ортобуньявирусов с консервативными аминокислотами A/E (VAA/EE у BUNV). Однако у KHURV не найдено второго сайта нарезания Gn/NSm, что позволило предположить, что белок NSm у KHURV отсутствует.

Результаты анализа аминокислотной последовательности G-протеина KHURV с использованием программ TMHMM2.0 позволили выявить два трансмембранных домена, которые соответствуют белкам Gc и Gn других ортобуньявирусов [6, 7]. Расположение трансмембранных доменов 192–318 и 958–998 а.к. соответствует предполагаемому сайту нарезания Gc/Gn KHURV в позиции 319/320. Расположение трансмембранных доменов в полипротеине также свидетельствует о том, что белок NSm у KHURV отсутствует. Таким образом, M-сегмент KHURV кодирует только два белка Gn и Gc длиной 319 и 679 а.к. соответственно. При анализе последовательностей GcGn KHURV выявили консервативные домены ортобуньявирусов G2 (pfam03563) и G1 (pfam03557). Размер белка Gc в целом соответствует другим ортобуньявирусам (около 320 а.к. BUNV), а уровень его идентичности составляет в среднем 23–29% (28,5% с BUNV). Белок Gn у KHURV короче, чем у других ортобуньявирусов (679 а.к. против 950 а.к. у BUNV). С-концевая часть (около 500 а.к.) белка Gn, в которой расположен консервативный домен G1, у KHURV имеет уровень идентичности с другими ортобуньявирусами около 30%, однако N-концевая последовательность 170 а.к. не имеет значимой гомологии ни с одним из известных вирусов. В белках Gn и Gc KHURV обнаружили по три потенциальных сайта N-гликозилирования.

S-сегмент вируса KHURV имеет длину 950 н.о., что соответствует другим ортобуньявирусам. В S-сегменте KHURV расположена одна протяженная ОРС, кодирующая белок длиной 227 а.к., в котором выявили консервативный домен нуклеокапсидного (N) белка буньявирусов (pfam00952). В среднем белок N KHURV имеет 22–26% идентичности с ортобуньявирусами (24% с BUNV). У большинства ортобуньявирусов S-сегмент кодирует дополнительный неструктурный белок NSs, который связывают с патогенностью вирусов для позвоночных, поскольку он способен блокировать защитное действие интерферона при развитии противовирусного ответа. Вместе с тем показано, что у ряда ортобуньявирусов (группы Анофелес А, Анофелес В, Тете) белок NSs отсутствует [8]. Эти вирусы рассматриваются как вирусы непатогенные для позвоночных. Отсутствие белка NSs у KHURV, возможно, объясняет тот факт, что все штаммы KHURV были выделены от птиц без каких-либо признаков заболевания.

Результаты филогенетического анализа показали, что вирус KHURV формирует обособленную группу, наиболее близкую к роду *Orthobunyavirus*. На рисунке представлены дендрогаммы, построенные на основе сравнения всех трех сегментов генома вируса KHURV с другими буньявирусами. Международный комитет по таксономии вирусов основным критери-

Уровень (в %) идентичности аминокислотных последовательностей белков KHURV с другими ортобуньявирусами

Вирус	RdRp (L-сегмент)	Gn (M-сегмент)	Gc* (M-сегмент)	N (S-сегмент)
Bunyamwera (BUNV)	33,3	28,5	30,8	24,5
La Cross (LACV)	33,1	26,3	30,2	25,3
Simbu (SIMV)	33,5	28,3	30,4	23,7
Akabane (AKAV)	29,6	23,7	30,4	22,4
Shamonda (SHAV)	32,8	28,4	31,7	23,1
Aino (AIV)	32,3	26,8	31,2	26,2
Batai (BATV)	32,1	29,2	28,3	24,8

Примечание. * – приведены данные по консервативному домену G1 (pfam03557).

ем классификации вирусов рассматривает структуру генома, морфологию вириона и антигенные взаимоотношения [9]. С накоплением геномных данных и открытием новых вирусов [10–12], не имеющих антигенных связей, требуется разработка критериев классификации вирусов на основе филогенетического и молекулярно-генетического анализа.

Вирус KHURV обладает характерной для ортобуньявирусов структурой генома, включая канонические концевые последовательности и высокий уровень идентичности полимеразного домена RdRp. Хотя уровень идентичности белков KHURV не превышает в среднем 30% (см. таблицу), филогенетически KHURV по всем трем сегментам генома наиболее близко группируется к ортобуньявирусам. Несмотря на то что KHURV имеет укороченный M-сегмент и не кодирует белок NSm, оболочечные гликопротеиды Gn и Gc имеют консервативные для ортобуньявирусов домены. На основании вышеказанного KHURV был предварительно отнесен нами к роду *Orthobunyavirus*. Вместе с тем, учитывая структуру M-сегмента и наличие в оболочечном белке Gn-участков, не имеющих гомологии с ортобуньявирусами, нельзя исключить возможности выделения KHURV в отдельный род "Khurdunivirus" в составе сем. Bunyaviridae.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 13-04-01749 «а».

ЛИТЕРАТУРА

1. Галкина И.В., Львов Д.Н., Громашевский В.Л., Москвина Т.М. Вирус Хурдун (Khurdun), предположительно новый РНК-содержащий вирус, связанный с лысухами (*Fulica atra*), изолированный в дельте Волги. Вопросы вирусологии. 2004; 50 (4): 29–31.
2. Альховский С.В., Львов Д.Н., Самохвалов Е.И., Прилипов А.Г., Львов Д.К., Аристов В.А. и др. Обследование птиц дельты Волги (Астраханская область, 2001 г.) на наличие вируса лихорадки Западного Нила методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции. Вопросы вирусологии. 2003; 48 (1): 14–7.
3. Lvov D.K., Butenko A.M., Gromashevsky V.L., Kovtunov A.I., Prilipov A.G., Kinney R. et al. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. Arch. Virol. Suppl. 2004; 18 (Suppl.): 85–96.
4. Plyusnin A., Beaty B.J., Elliot R.M., Goldbach R., Kormelink R., Lundkvist A. et al. Family Bunyaviridae. In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. 1st ed. London: Elsevier; 2012: 725–41.
5. Muller R., Poch O., Delarue M., Bishop D.H., Bouloy M. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible

functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. J. Gen. Virol. 1994; 75 (6): 1345–52.

6. Hepojoki J., Strandin T., Wang H., Vapalahti O., Vaeheri A., Lankinen H. Cytoplasmic tails of hantavirus glycoproteins interact with the nucleocapsid protein. J. Gen. Virol. 2010; 91 (9): 2341–50.
7. Strandin T., Hepojoki J., Vaeheri A. Cytoplasmic tails of bunyavirus Gn glycoproteins—Could they act as matrix protein surrogates? Virology. 2013; 437 (2): 73–80.
8. Mohamed M., McLees A., Elliott R.M. Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete serogroups in the Orthobunyavirus genus (family Bunyaviridae) do not encode an NSs protein. J. Virol. 2009; 83 (15): 7612–8.
9. King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier; 2012.
10. Marklewitz M., Handrick S., Grasse W., Kurth A., Lukashev A., Drosten C. et al. Gouleako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family Bunyaviridae. J. Virol. 2011; 85 (17): 9227–34.
11. Wu Z., Ren X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G. et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. J. Virol. 2012; 86 (20): 10 999–1012.
12. Beer M., Conraths F.J., van der Poel W.H. ‘Schmallenberg virus’ – a novel orthobunyavirus emerging in Europe. Epidemiol. Infect. 2013; 141 (1): 1–8.

REFERENCES

1. Galkina I.V., Lvov D.N., Gromashevskii V.L., Moskvina T.M. Khurdun virus, a presumably new RNA-containing virus associated with coots (*Fulica atra*), isolated in the Volga river delta. Voprosy Virusologii. 2004; 50 (4): 29–31 (in Russian).
2. Al'khovskii S.V., Lvov D.N., Samokhvalov E.I., Prilipov A.G., Lvov D.K., Aristova V.A. et al. Screening of birds in the Volga delta (Astrakhan region, 2001) for the West Nile virus by reverse transcription- polymerase chain reaction. Voprosy Virusologii. 2003; 48 (1): 14–7 (in Russian).
3. Lvov D.K., Butenko A.M., Gromashevsky V.L., Kovtunov A.I., Prilipov A.G., Kinney R. et al. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. Arch. Virol. Suppl. 2004; 18 (Suppl.): 85–96.
4. Plyusnin A., Beaty B.J., Elliot R.M., Goldbach R., Kormelink R., Lundkvist A. et al. Family Bunyaviridae. In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. 1st ed. London: Elsevier; 2012: 725–41.
5. Muller R., Poch O., Delarue M., Bishop D.H., Bouloy M. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. J. Gen. Virol. 1994; 75 (6): 1345–52.
6. Hepojoki J., Strandin T., Wang H., Vapalahti O., Vaeheri A., Lankinen H. Cytoplasmic tails of hantavirus glycoproteins interact with the nucleocapsid protein. J. Gen. Virol. 2010; 91 (9): 2341–50.
7. Strandin T., Hepojoki J., Vaeheri A. Cytoplasmic tails of bunyavirus Gn glycoproteins—Could they act as matrix protein surrogates? Virology. 2013; 437 (2): 73–80.
8. Mohamed M., McLees A., Elliott R.M. Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete serogroups in the Orthobunyavirus genus (family Bunyaviridae) do not encode an NSs protein. J. Virol. 2009; 83 (15): 7612–8.
9. King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier; 2012.
10. Marklewitz M., Handrick S., Grasse W., Kurth A., Lukashev A., Drosten C. et al. Gouleako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family Bunyaviridae. J. Virol. 2011; 85 (17): 9227–34.
11. Wu Z., Ren X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G. et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. J. Virol. 2012; 86 (20): 10 999–1012.
12. Beer M., Conraths F.J., van der Poel W.H. ‘Schmallenberg virus’ – a novel orthobunyavirus emerging in Europe. Epidemiol. Infect. 2013; 141 (1): 1–8.

Поступила 21.03.13