

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

## Генетическая характеристика вируса Узун-Агач (UZAV – Uzun-Agach virus) (*Bunyaviridae*, *Nairovirus*), изолированного в Казахстане от остроухой ночницы *Myotis blythii oxygnathus* Monticelli, 1885 (*Chiroptera*; *Vespertilionidae*)

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

Проведено секвенирование генома вируса Узун-Агач (Uzun-Agach virus – UZAV), изолированного из печени летучих мышей *Myotis blythii oxygnathus* Monticelli, 1885 (*Chiroptera*; *Vespertilionidae*) в низкогорном районе Алма-Атинской области в Казахстане в 1977 г. Показано, что UZAV является новым вирусом рода *Nairovirus* (сем. *Bunyaviridae*). UZAV – реассортант, у которого S-сегмент получен от вируса Иссык-Куль (Issyk-Kul virus – ISKV), который так же, как и UZAV, изолировали от летучих мышей, а L- и M-сегменты получены от другого вируса, филогенетически близкого ISKV, но дивергентного от него. L- и M-сегменты UZAV обладают 69,3 и 64,1% гомологии с ISKV. Полученные данные о наличии реассортации между ISKV и UZAV в природе позволяют предположить, что они социркулируют в рамках одной экологической ниши (летучие мыши сем. *Vespertilionidae*) и ареал UZAV может совпадать с ареалом ISKV.

Ключевые слова: Узун-Агач (UZAV); *Bunyaviridae*; убежищные биоценозы; летучие мыши; *Chiroptera*; Казахстан; метагеномный анализ.

### Genetic characterization of the Uzun-Agach virus (UZAV, *Bunyaviridae*, *Nairovirus*), isolated from bat *Myotis blythii oxygnathus* Monticelli, 1885 (*Chiroptera*; *Vespertilionidae*) in Kazakhstan

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

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

The complete genome of Uzun-Agach virus (UZAV), isolated from the liver of *Myotis blythii oxygnathus* (Monticelli, 1885 (*Chiroptera*; *Vespertilionidae*)) bats in Alma-Ata district (Kazakhstan) in 1977 have been sequenced. Based on full-length genome comparison it is shown that UZAV is a new member of the *Nairovirus* genus (family *Bunyaviridae*). L-segment and M-segments of UZAV have 69,3% and 64,1% identity with Issyk-Kul virus (ISKV) that also was isolated from bats. S-segment of UZAV have 99,6% identity with the same of ISKV. This allow us to claim that UZAV is a reassortant virus that have S-segment derived from ISKV, and L- and M-segments from another virus that is phylogenetically related to ISKV, but divergent from it. The obtained data that the reassortment between ISKV and UZAV exists in nature suggest that they cocirculated in one ecological niche (bats of the *Vespertilionidae* family) and the areal of UZAV may coincide with the areal of ISKV.

Key words: Uzun-Agach virus – UZAV; *Nairovirus*; *Bunyaviridae*; asylum biosenosis; bats; *Chiroptera*; Kazakhstan; next-generation sequencing.

Прототипный штамм Kaz155 (депонент Государственной коллекции вирусов № 643, авторы Львов Д.К., Каримов С.К.) вируса Узун-Агач (Uzun-Agach virus – UZAV) изолирован в 1977 г. из печени летучих мышей *Myotis blythii oxygnathus* Monticelli, 1885 (*Chiroptera*; *Vespertilionidae*) в низкогорном районе Алма-Атинской области в Казахстане и Средней Азии. По данным электронной микроскопии вирус отнесен к семейству *Bunyaviridae* [1–4]. Семейство *Bunyaviridae* включает пять родов оболочечных, РНК-содержащих вирусов, геном которых представлен тремя сегментами РНК негативной полярности. Буньявирусы животных объединены в четыре рода (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* и *Hantavirus*), к которым относится множество опасных патогенов человека и животных. Большинство вирусов родов *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* являются арбовирусами, т.е. передаются восприимчивым позвоночным хозяевам посредством членистоногих, кровососущих членистоногих. Около 40 вирусов на основании морфологии вириона были отнесены к группе неклассифицированных буньяви-

русов, поскольку серологическими методами не удалось установить их антигенных связей с классифицированными вирусами. Таксономия буньявирусов основана на перекрестных антигенных связях в реакции связывания комплемента, в которой, как правило, основное значение играют антигенные детерминанты белка нуклеокапсида (N) [5]. В отсутствие антигенных связей наиболее релевантным современным методом для описания новых или неклассифицированных вирусов являются их секвенирование и анализ геномных данных [6].

В настоящей работе геном UZAV был секвенирован с использованием технологии полногеномного секвенирования. Показано, что UZAV принадлежит роду *Nairovirus* (сем. *Bunyaviridae*) и является реассортантом, у которого S-сегмент получен от вируса Иссык-Куль (Issyk-Kul virus – ISKV), а L- и M-сегменты имеют 64–69% гомологии с ISKV.

### Материалы и методы

*Вирусные штаммы.* Штамм LEIV-10899Az вируса Герань (Geran virus – GERV) получен из Государствен-

ной коллекции вирусов при ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России. Работы с инфекционным материалом, связанные с получением и накоплением вируса, проводили в боксовых помещениях, оборудованных и сертифицированных для работы с микроорганизмами II группы патогенности. Для восстановления вируса лиофилизированную суспензию восстановили в 1 мл культуральной среды ДМЕМ (с добавлением антибиотика) и использовали для интрацеребрального заражения новорожденных беспородных белых мышей. После развития симптомов поражения ЦНС (2–3 сут) мышей забивали в соответствии с правилами содержания и использования лабораторных животных.

**Выделение РНК.** Фрагменты мозга (около 30 мг) помещали в 1 мл реагента TRIzol (Life Technology, США) и гомогенизировали пластиковым пестиком. Далее выделяли РНК согласно прилагаемой инструкции производителя данного реагента. Конечный осадок суммарной РНК был растворен в 100 мкл DEPC-обработанной воды. Для дополнительной очистки, а также для удаления низкомолекулярных фракций рибосомальной (5 S) и транспортной РНК полученный препарат был очищен набором «RNeasy mini kit» (QIAGEN, Германия) в режиме clean-up на автоматической станции QIAcube (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией. Концентрацию РНК измеряли с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, США). Для удаления рибосомальной (18 и 28 S) РНК использовали набор «GenRead rRNA depletion Kit» (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией. Для этого брали не более 3 мкг суммарной РНК. Эффективность деплеции достигала 50–80%, и, таким образом, количество полученной РНК для дальнейшего анализа составило около 300 нг.

**Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование.** Для получения кДНК около 100 нг деплецированной РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером при 85 °С 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°С в течение 10 мин, далее при 42°С в течение 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70°С в течение 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. Для селекции ДНК по размеру использовали реагент «AMPure XP» (Beckman Coulter, США), с расчетом получения ДНК-библиотек длиной более 270 н.о., что соответствует размеру вставки около 150 н.о. Данные требования к размеру ДНК-библиотек связаны с использованием для секвенирования набора, позволяющего секвенировать не более 150 н.о. в одну сторону. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза «QIAxcel Advanced System» (QIAGEN, Германия). Молярность полученных библиотек измеряли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве «Sequencing Library qPCR Quantification Guide» (Illumina, США).

Секвенирование ДНК-библиотек осуществляли на

приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора «MiSeq Reagent Kits v2 (300PE)» в соответствии с инструкцией производителя.

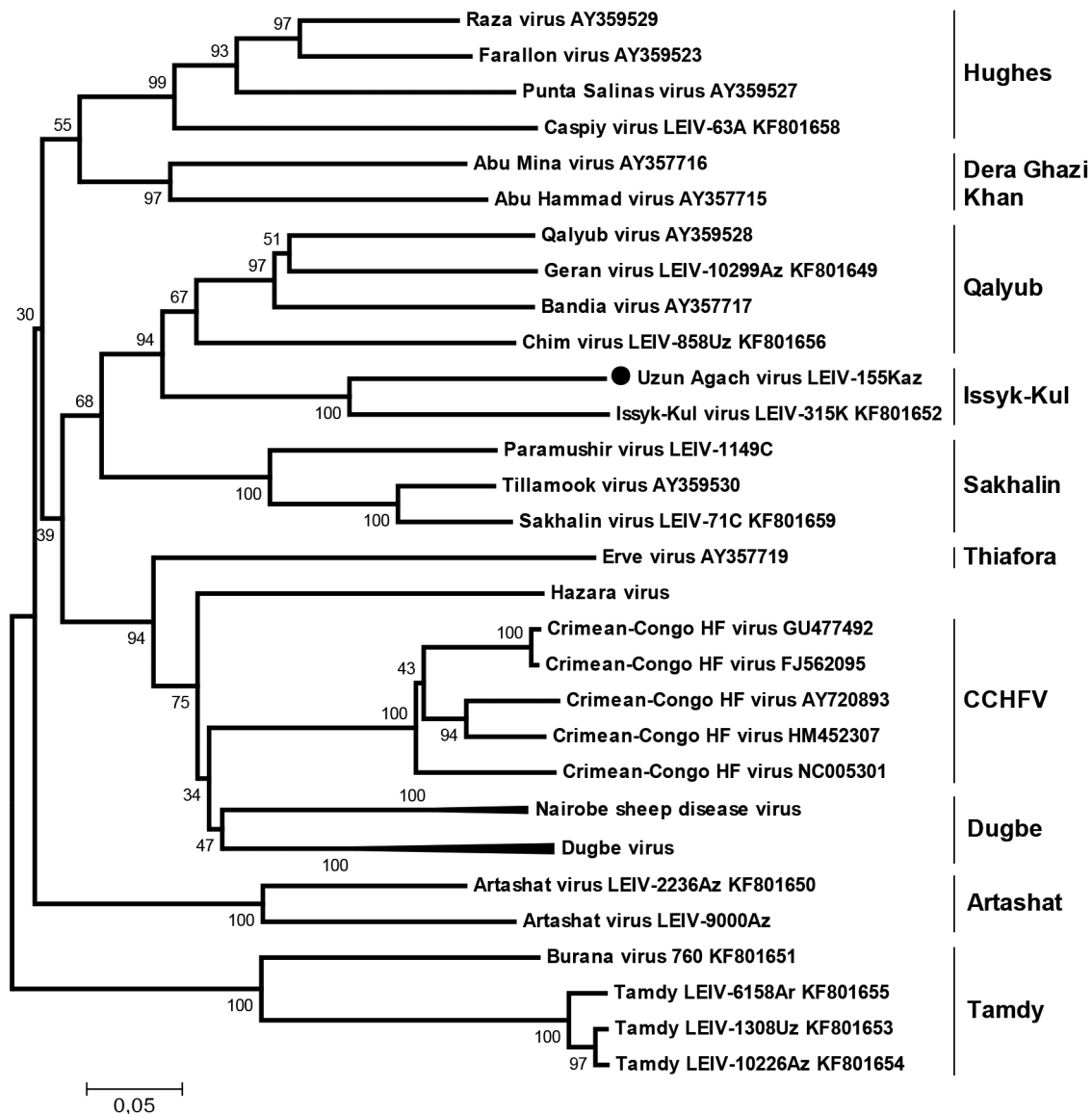
**Биоинформационный анализ.** Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили, используя программу «CLC Genomics Workbench 6.0» (CLC bio, США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей осуществляли с помощью сервиса BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ «Lasergene Core Suite» (DNASTar, США). Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму ClustalW. Филогенетический анализ и построение дендрограмм осуществляли с применением программы Mega5 по алгоритму ближайшего соседа (neighbor-joining) или максимального правдоподобия (maximum likelihood) с 1000-кратным бутстреп-тестированием.

## Результаты и обсуждение

При анализе данных полногеномного секвенирования РНК из мозга инфицированных UZAV мышью обнаружили последовательности, обладающие гомологией с вирусом рода *Nairovirus* (сем. *Bunyaviridae*). Результаты дальнейшего анализа показали, что мы определили практически полную нуклеотидную последовательность генома UZAV. Структура и размер генома UZAV соответствуют таковым вирусам рода *Nairovirus* и представлены тремя сегментами РНК, каждый из которых имеет одну протяженную рамку считывания [5]. L-сегмент UZAV кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), размер которой составляет 3,988 а.о. М-сегмент кодирует полипротеин–предшественник поверхностных гликопротеинов Gn и Gc (1,621 а.о.). S-сегмент кодирует белок N (485 а.о.).

При сравнении полных последовательностей генома UZAV с другими наиовирусами наибольший уровень гомологии выявили с ISKV. Так, гомология UZAV и ISKV по нуклеотидной последовательности L-сегмента составляет 69,3%. По аминокислотной последовательности RdRp гомология достигает 76,2%. Уровень гомологии М-сегмента UZAV и ISKV составляет 64,1 и 66,7% по нуклеотидной и аминокислотной последовательностям соответственно. При анализе S-сегмента UZAV установили, что он обладает 99,6% идентичности с ISKV как по нуклеотидной, так и по аминокислотной последовательностям. Таким образом, можно заключить, что UZAV является реассортантом, у которого S-сегмент получен от ISKV, а L- и М-сегменты получены от другого вируса, филогенетически близкого ISKV, но дивергентного от него (см. рисунок). Экология UZAV подробно не изучена, поскольку изолирован только один штамм из печени летучих мышей *Myotis blythii oxugnathus*. Полученные данные о наличии реассортации между ISKV и UZAV в природе позволяют предположить, что они социркулируют в рамках одной экологической ниши (летучие мыши сем. *Vespertilionidae*) и ареал UZAV может совпадать с ареалом ISKV.

Летучие мыши являются важнейшим резервуаром зоонозных вирусов, многие из которых могут представлять серьезную потенциальную угрозу для человека [7–9]. В последние годы множество патогенных для человека вирусов интродуцировалось, как предполагают, из популяций летучих мышей. Это новые эболавирус Заир (*Zair ebolavirus*) и марбургвирус озера Виктория (*Lake Victoria marburgvirus*); новые лиссавирусы; коронавирусы SARS и MERS; парамиксовирусы Nipah и Hendra и др. [7, 10–12]. Ранее показано, что



Результаты филогенетического анализа, проведенного на основе сравнения консервативного каталитического центра НУР-зависимой РНК-полимеразы (RdRd) вирусов рода *Nairovirus*.

Положение UZAV указано черным кружком.

ISKV, ассоциированный с летучими мышами и вызывающий лихорадочное заболевание в Средней Азии, является новым представителем рода *Nairovirus* (*Bunyaviridae*), формирующим самостоятельную филогенетическую ветвь [13]. UZAV является реассортантом ISKV и филогенетически близок к ISKV, что позволяет классифицировать его как новый вирус группы ISKV. Учитывая способность ISKV инфицировать людей [14, 15], полагаем, что UZAV должен рассматриваться как потенциально патогенный для человека вирус и быть включен в мониторинг новых и вновь возникающих инфекций.

Остроухая ночница *M. blithii oxynathus*, от которой изолирован UZAV, относится к многочисленным летучим мышам, распространенным на юге Русской равнины и Западной Сибири в РФ, на Кавказе, в Средней Азии, Казахстане, Южной Европе, Северной Африке, Малой Азии, Центральной Азии, Иране, Индии, населяя пещеры, чердаки жилых зданий и образуя большие колонии. Часть популяции отлетает на зимовки в Северную Африку, Иран, Индию, Малую Азию.

Зондирование территории Казахстана проводили в рамках программы по биобезопасности и изучению биоразнообразия в различных экосистемах Северной Евразии [16–19].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lvov D.K. Natural foci of arboviruses in the USSR. In: *Sov. Med. Rev. E. Virology Reviews*. UK: Harwood Ac. publishers GmbH; 1987: 153–96.
2. Lvov D.K. Arboviral zoonoses of Northern Eurasia (Eastern Europe and the commonwealth of independent states). In: *Beran G.W., ed. Handbook of zoonoses. Sec. ed. Section B: Viral*. London, Tokyo: CRC Press; Boca Raton: AMArbar; 1994: 237–60.
3. Каримов С.К. Арбовирусы Казахстанского региона: дисс. ... д-ра мед. наук. Алма-Ата; 1983.
4. Львов Д.К. Изоляция вирусов из природных источников в СССР. В кн.: *Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я., ред. Арбовирусы и арбовирусные инфекции*. М.: Медицина; 1989: 220–35.
5. 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: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier; 2012: 725–41.



6. Lipkin W.I., Firth C. Viral surveillance and discovery. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(2): 199–204.
7. Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45.
8. Calisher C.H., Ellison J.A. The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel Med. Infect. Dis.* 2012; 10(2): 69–79.
9. Drexler J.F., Corman V.M., Muller M.A., Maganga G.D., Vallo P., Binger T. et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat. Commun.* 2012; 3: 796.
10. Memish Z.A., Mishra N., Olival K.J., Fagbo S.F., Kapoor V., Epstein J.H. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11): 1819–23.
11. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P. et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* 2005; 438(7068): 575–6.
12. Field H.E., Mackenzie J.S., Daszak P. Henipaviruses: emerging paramyxoviruses associated with fruit bats. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007; 315: 133–59.
13. Альховский С.В., Львов Д.К., Шелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Самохвалов Е.И. и др. Таксономия вируса Иссyk-Куль (Issyk-Kul virus, ISKV; Bunyaviridae, Nairovirus), возбудителя Иссyk-Кульской лихорадки, изолированного от летучих мышей (Vespertilionidae) и клещей Argas (Carios) vespertilionis (Latreille, 1796). *Вопросы вирусологии.* 2013; 58(5): 11–5.
14. Lvov D.K. Issyk-Kul virus disease. In: Monath T.P., ed. The Arboviruses: ecology and epidemiology. Boca Raton, FL: CRS Press; 1988; ch. 27: 53–62.
15. Львов Д.К. Лихорадка Иссyk-Куль. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных.* М.: МИА; 2013: 781–3.
16. Львов Д.К. Экология вирусов. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных.* М.: МИА; 2013: 66–86.
17. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В., Громашевский В.Л. и др. *Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации.* М.: Издательство ННЦ ТМГ МЗ РФ; 2001.
18. Львов Д.К., ред. *Организация эколого-эпидемиологического мониторинга территорий Российской Федерации с целью противозидемической защиты населения и войск. Методические рекомендации.* М.: МЗ РФ, Федеральное управление медико-биологических и экстремальных проблем, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН; 1993.
19. Lvov D.K. Ecological soundings of the former USSR territory for natural foci of arboviruses. In: *Sov. Med. Rev. E. Virology Reviews.* USA: Harwood Ac. Publ. GmbH; 1993: 1–47.
- Handbook of zoonoses. Sec. ed. Section B: Viral. London, Tokyo: CRC Press; Boca Raton: AMArbar; 1994: 237–60.
3. Karimov C.K. *Arboviruses in Kazakhstan region.* Diss. Alma-Ata; 1983. (in Russian)
4. Lvov D.K. Virus isolation from natural foci in the USSR. In: Lvov D.K., Klimenko S.M., Gaidamovich S.Ya., eds. Arboviruses and arboviral infections. Moscow: Meditsina; 1989; 220–35. (in Russian)
5. 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: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Elsevier; 2012: 725–41.
6. Lipkin W.I., Firth C. Viral surveillance and discovery. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(2): 199–204.
7. Calisher C.H., Childs J.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45.
8. Calisher C.H., Ellison J.A. The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel Med. Infect. Dis.* 2012; 10(2): 69–79.
9. Drexler J.F., Corman V.M., Muller M.A., Maganga G.D., Vallo P., Binger T. et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat. Commun.* 2012; 3: 796.
10. Memish Z.A., Mishra N., Olival K.J., Fagbo S.F., Kapoor V., Epstein J.H. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11): 1819–23.
11. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P. et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* 2005; 438(7068): 575–6.
12. Field H.E., Mackenzie J.S., Daszak P. Henipaviruses: emerging paramyxoviruses associated with fruit bats. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007; 315: 133–59.
13. Alkhovsky S.V., Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Samokhvalov E.I., Gitelman A.K., Botikov A.G. Taxonomy of Issyk-Kul virus (ISKV, Bunyaviridae, Nairovirus), the etiologic agent of Issyk-Kul fever, isolated from bats (Vespertilionidae) and ticks Argas (Carios) vespertilionis (Latreille, 1796). *Voprosy virusologii.* 2013; 58(5): 11–5. (in Russian)
14. Lvov D.K. Issyk-Kul virus disease. In: Monath T.P., ed. The Arboviruses: ecology and epidemiology. Boca Raton, FL: CRS Press; 1988; ch. 27: 53–62.
15. Lvov D.K. Issyk-Kul fever. In: Lvov D.K., ed. *Viruses and viral infection.* Moscow: MIA; 2013: 781–3. (in Russian)
16. Lvov D.K. Ecology of viruses. In: Lvov D.K., ed. *Viruses and viral infection.* Moscow: MIA; 2013: 66–86. (in Russian)
17. Lvov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., Butenko A.M., Galkina I.V., Gromashevsky V.L. et al. *Atlas of distribution of natural-focal viruses infection on the territory of Russian Federation.* Moscow: Minzdrav RF; 2001. (in Russian)
18. Lvov D.K., ed. *Organization of ecological-epidemiological monitoring in Russian Federation for anti-epidemic defense of the civilians and army.* Moscow: Minzdrav RF, The Federal Office of Biomedical and Extreme Problems, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology; 1993. (in Russian)
19. Lvov D.K. Ecological soundings of the former USSR territory for natural foci of arboviruses. In: *Sov. Med. Rev. E. Virology Reviews.* USA: Harwood Ac. Publ. GmbH; 1993: 1–47.

Поступила 29.05.14

## REFERENCES

1. Lvov D.K. Natural foci of arboviruses in the USSR. In: *Sov. Med. Rev. E. Virology Reviews.* UK: Harwood Ac. publishers GmbH; 1987: 153–96.
2. Lvov D.K. Arboviral zoonoses of Northern Eurasia (Eastern Europe and the commonwealth of independent states). In: Beran G.W., ed.

Received 29.05.14