

Щетинин А.М., Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю., Аристова В.А., Морозова Т.Н.,
Гительман А.К., Дерябин П.Г., Ботиков А.Г.

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов вируса Батаи (BATV – Batai virus) и нового вируса Анадырь (ANADV – Anadyr virus) группы Буньямвера (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*), выделенных на территории России

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

Методом полногеномного секвенирования определены практически полные последовательности S-, M- и L-сегментов трех штаммов вируса Батаи (серогруппа Буньямвера, род *Orthobunyavirus*, семейство *Bunyaviridae*). В результате филогенетического анализа по последовательностям трех сегментов генома, показано, что штаммы LEIV-Ast507 и LEIV-Ast528, выделенные в Астраханской области, относятся к европейской группе вирусов Батаи и генетически наиболее близки к российскому штамму 42, выделенному в Волгоградской области в 2003 г. Напротив, штамм LEIV-13395, изолированный от комаров *Aedes sp.* в 1987 г. в Магаданской области, не является вирусом Батаи, а представляет собой самостоятельный вирус серогруппы Буньямвера. Максимальный уровень нуклеотидной идентичности сегментов вируса LEIV-13395 наблюдается по отношению к вирусу Батаи и составляет 86,9, 80,8 и 79,7% для S-, M- и L-сегментов соответственно.

Ключевые слова: *Bunyaviridae*; *Orthobunyavirus*; серогруппа Буньямвера; арбовирусы; антропогенные биоценозы; лысуха; *Fulica atra*; комары; *Anopheles*; вирус Батаи; BATV; Магаданская область; Астраханская область; *de novo* секвенирование; next generation sequencing.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(6): 16–22.

Complete genome analysis of the Batai virus (BATV) and the new Anadyr virus (ANADV) of the Bunyamwera group (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) isolated in Russia

Shchetinin A. M., Lvov D. K., Alkhovsky S. V., Shchelkanov M. Yu., Aristova V. A., Morozova T. N.,
Gitelman A. K., Deryabin P. G., Botikov A. G.

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

Almost complete nucleotide sequences for the S, M, and L segments were obtained for three strains of the Batai virus (Bunyamwera serogroup, genus *Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae* family). Based on the results of the phylogenetic analysis conducted for the three genomic segments LEIV Ast507 and LEIV-Ast528 strains were grouped with other European BATV isolates and were found to be almost identical to the strain 42 isolated from Volgograd Region, Russia, 2003. Surprisingly, LEIV-13395 strain isolated from the *Aedes sp. mosquitos* in Magadan Oblast, 1987, turned out to be a novel genotype inside Bunyamwera serogroup. The highest nucleotide identity levels of LEIV-13395 genomic segments (86.9%, 80.8%, 79.7% for S, M and L segments respectively) were observed with corresponding segments of the Batai virus.

Key words: *Batai virus (BATV)*; *Bunyaviridae*; *Orthobunyavirus*; *Bunyamwera serogroup*; *arboviruses*; *anthropogenic biocenosis*; *coot*; *Fulica atra*; *mosquitos*; *Anopheles*; *Magadan*; *Astrakhan*; *de novo sequencing*; *next generation sequencing*.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2014; 59(6) 16–22. (In Russ.)

Введение

Вирус Батаи (*Batai virus*, BATV), арбовирус серогруппы Буньямвера рода *Orthobunyavirus* семейства *Bunyaviridae*, был впервые изолирован от комаров *Culex gelidus* в 1955 г. в Малайзии [1]. Геном этого оболочечного вируса представлен тремя одноцепочечными молекулами РНК отрицательной полярности – S-, M- и L-сегментами. Основными членистоногими переносчиками BATV являются кровососущие комары родов *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, реже *Ochlerotatus* [2]. К позвоночным хозяевам BATV относятся люди, крупный рогатый скот, верблюды, лошади, свиньи, овцы, козы и птицы [3]. BATV широко распространен на территории Африки, Азии и Европы, тем не менее случаи заражения людей достаточно редки и обычно сводятся к гриппоподобным состояниям [2]. Повышенный интерес исследователей к вирусу Батаи в недавнее время связан с установлением его роли в

реассортационном процессе возникновения африканского вируса Нгари (*Ngari virus*, NRIV), ассоциированного со вспышкой геморрагических лихорадок в Кении и Сомали 1997–1998 гг. [4, 5]. Учитывая широкое распространение BATV, а также видов комаров, которые он способен заражать, существует вероятность его участия и в других, еще не идентифицированных, реассортационных процессах. Мониторинг и идентификация подобных вирусов сильно осложняются отсутствием полногеномных данных для многих представителей семейства *Bunyaviridae*. На настоящий момент нуклеотидные последовательности всех трех сегментов генома вируса Батаи доступны для штаммов, выделенных на территории Италии [6], Германии [7], бывшей Чехословакии [8], Уганды [9], Малайзии [9], Китая (KJ187038-40), Индии [9, 10] и Японии [11]. Нуклеотидные последовательности BATV, циркулирующего на территории РФ, впервые опубликованы в 2010

Для корреспонденции: Щетинин Алексей Михайлович, науч. сотр. лаб. биотехнологии, e-mail: salkh@yandex.ru
Correspondence to: Alexey Shchetinin, Researcher, Laboratory of Biotechnology, e-mail: salkh@yandex.ru

г. и ограничиваются частичными последовательностями для двух сегментов [12]. Настоящая работа посвящена получению первых полногеномных данных для штаммов вируса Батаи, выделенных на территории РФ.

Материалы и методы

Вирусные штаммы. Штамм LEIV-13395 (депонент Государственной коллекции вирусов РФ № 810; авторы Громашевский В.Л., Львов С.Д.) выделен из комаров рода *Aedes sp.* в Магаданской области в 1987 г. Вирус получен в виде лиофилизованной мозговой суспензии, восстановлен в 1 мл культуральной среды DMEM (с добавлением антибиотика) и использован для интрацеребрального заражения новорожденных беспородных мышей. После развития симптомов поражения ЦНС (2–3 сут) мышей забивали в соответствии с правилами содержания и использования лабораторных животных. Штаммы LEIV-Ast507 и LEIV-Ast528 были изолированы от лысух *Fulica atra* в 2004 г. в дельте реки Волги, Астраханская область. Вирусы были использованы для заражения культуры клеток Vero, и через 3 сут вирусосодержащий супернатант был отобран для дальнейшей работ (табл. 1).

Выделение РНК проводили из гомогената мозговой суспензии реагентом TRI REAGENT (MRC, США) согласно инструкции производителя, для выделения РНК из вирусосодержащего клеточного супернатанта использовали TRI REAGENT LS (MRC, США). Полученную РНК дополнительно очищали набором для выделения РНК RNeasy MinElute CleanUp Kit (QIAGEN, Германия); для препарата тотальной РНК, выделенной из мозга, также провели рибодеплецию с помощью набора GeneRead rRNA Depletion Kit (QIAGEN, Германия).

Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование. Около 100 нг полученной РНК фрагментировали нагреванием до 94°C в течение 5 мин в буфере для обратной транскрипции (Thermo Fisher Scientific, США). Реакции обратной транскрипции полученных фрагментов проводили в присутствии гексануклеотидных праймеров (Promega), 20 ед. ингибитора РНКаз (RNasin, Promega) и 200 ед. обратной транскриптазы RevertAid Premium (Thermo Fisher Scientific, США) в следующем температурном режиме: 25°C (10 мин) – 42°C (60 мин) – 85°C (5 мин). Синтез двухцепочечной ДНК на основе полученных кДНК проводился с помощью набора NEBNext mRNA Second Strand Synthesis Module (NEB, США) согласно инструкции производителя. Полученные двухцепочечные ДНК-фрагменты очищали с использованием набора MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Германия) и использовали для приготовления библиотек набором TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 (Illumina, США). Условия приготовления библиотек были оптимизированы для получения вставки длиной от 150 до 300 нуклеотидов. Библиотеки визуализировали в 2% агарозном геле для подтверждения нужной величины вставки, их молярность измеряли методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени (SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США), прибор Bio-Rad CFX1000), согласно руководству Sequencing Library qPCR Quantification Guide (Illumina, США). Секвенирование библиотек проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Kits V2 (300PE) в формате индексированных библиотек.

Биоинформатический анализ. Обработку полученных нуклеотидных последовательностей проводили в программе CLC Genomic Workbench 7.0 (QIAGEN, Германия). Поиск и вычитание химерных прочтений осуществляли с помощью алгоритма UCHIME программы USEARCH 7.0 [13]. Выравнивания нуклеотидных

Вирусные штаммы, использованные в работе

Вирус	Место изоляции	Источник изоляции	Год изоляции
LEIV Ast507, LEIV Ast528	Дельта реки Волги, Астраханская область	Лысухи (<i>Fulica atra</i>)	2001–2004
LEIV-13395	Магаданская область	Комары (<i>Aedes sp.</i>)	1987

и аминокислотных последовательностей проводили с помощью алгоритма ClustalW как функции программы MEGA5 [14]. Филогенетический анализ нуклеотидных вирусных последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA5 методами максимального правдоподобия (maximum likelihood) по всем сайтам выравнивания (use all sites) и методом присоединения соседей (neighbor-joining) с полным удалением отсутствующей информации (complete deletion) в рамках двухпараметрической модели Кимуры с 1000-кратным бутстрэп-анализом. Для поиска потенциальных сайтов N-гликозилирования внутри аминокислотных последовательностей применяли сервис NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Возможные сайты нарезания полипротеина-предшественника были найдены с помощью программы SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; [15]).

Результаты и обсуждение

Результаты полногеномного секвенирования. В результате секвенирования библиотек, соответствующих штаммам LEIV-Ast04-2-315 и LEIV-Ast04-2-336 и LEIV-13395, получили 470.040, 370.904 и 2.225.022 прочтений соответственно. В результате сборки и анализа получили более протяженные последовательности для всех трех сегментов изучаемых вирусов.

По результатам проведенного филогенетического анализа (см. рисунок) все доступные нуклеотидные последовательности BATV можно разделить на три группы в соответствии с их географическим распространением: штаммы из Китая, Малайзии, Японии, Индии формируют азиатскую группу; штамм BATV из Уганды и NRIV (для которых BATV считается донором M-сегмента) относятся к африканской группе, штаммы, выделенные на территории Италии, Германии, бывшей Чехословакии, Западной Украины и России, входят в европейскую группу. Исследуемые в работе штаммы LEIV-Ast04-2-315 и LEIV-Ast04-2-336 по трем сегментам с высоким уровнем бутстрэп-поддержки попадают в кластер европейских штаммов BATV. Внутри данной группы они филогенетически наиболее близки к штамму 42, выделенному в Волгоградской области в 2003 г. от комаров *Anopheles maculipennis*, для которого известны частичные нуклеотидные последовательности L- и M-сегментов [12]. Между штаммами LEIV-Ast04-2-315 и LEIV-Ast04-2-336 наблюдали крайне высокий уровень нуклеотидной и аминокислотной идентичности по трем сегментам генома – 99,6/99% (L-сегмент / РНК-зависимая РНК-полимераза), 99,9/100% (M-сегмент/полипротеин-предшественник) и 99,7/100% (S-сегмент/нуклеокапсид). Уровень нуклеотидной идентичности штамма 42 с исследуемыми штаммами по частичной последовательности L- и M-сегментов составляет 98,6/98,8% и 100/100% соответственно, все имеющиеся нуклеотидные замены являются синонимичными. Минимальные наблюдаемые генетические различия, а также временная и географическая близость выделения

Потенциальные сайты N-гликозилирования полипротеина-предшественника вирусов Батаи и некоторых вирусов серогрупп Буньямвера и Калифорнийского энцефалита

LEIV-13395	LEIV-Ast507/528	BATV Italy	BATV Calovo	BATV Malaysia	BATV China	BATV Japan	BATV India	BATV Uganda	NRIV	ILEV	BUNV	CVV	TENV	LACV	WYOV
N 59 (NDTG)													N 61 (NETG)	N 57 (NATG)	N 60 (NNTI)
N 247 (NRSC)				N 247 (NKSC)	N 247 (NKSC)	N 247 (NKSC)	N 247 (NKSC)	N 247 (NKSC)	N 247 (NKSC)	N 247 (NKSC)	N 248 (NRSC)	N 247 (NKSC)	N 249 (NKSC)	N 245 (NKSC)	N 247 (NKSC)
										N 387 (NITY)					N 366 (NISI)
															N 429 (NYTT)
															N 490 (NCTG)
N 623 (NTTY)	N 623 (NSTY)	N 623 (NSTY)	N 623 (NSTY)		N 623 (NSTY)	N 623 (NSTY)	N 623 (NSTY)	N 623 (NSTY)	N 623 (NSTY)	N 623 (NSTY)		N 623 (NETY)	N 625 (NSTY)		N-615 (NDTY)
N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)	N 664 (NTTG)					N 656 (NKTE)
	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)	N-702 (NETS)			N 704 (NTTK)		
N 763 (NLTA)													N 763 (NLTA)	N 765 (NLTV)	
N 1170 (NLSV)										N 1170 (NLSV)				N 1177 (NGTI)	N 1153 (NKTI)

Примечание. Номера позиций сайтов потенциального N-гликозилирования приведены относительно первого метионина полипротеина-предшественника. Номера использованных последовательностей в GenBank: Batai virus (BATV) – Italy (AGM39999), Calovo (AGM34034), Malaysia (AFY52601), China (AHW40490), Japan (BAE97686), India (AFY52602), Uganda (AFY52603); Ngari virus (NRIV) (AGM34030); Plesha virus (ILEV) (AGU99596); Bunyamwera virus (BUNV) (NP_047212); Cache Valley virus (CVV) (AAD48896); Tensaw virus (TENV) (ACV95627); La Crosse virus (LACV) (NP_671969); Wyeomyia virus (WYOV) (AEZ35274).

вирусов позволяют предположить их общее происхождение в качестве различных изолятов одного и того же штамма BATV, циркулирующего в Южной части РФ.

На основании антигенных свойств LEIV-13395, выделенный в 1987 г. от комаров *Anopheles sp.* в Магаданской области, был первоначально отнесен к серокомплексу Буньямвера рода *Orthobunyavirus*. В результате проведенного нами филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей трех геномных сегментов данный вирус не попадает ни в один из трех кластеров (европейский, азиатский, африканский) известных штаммов BATV, оставаясь внешней группой по отношению к ним. Для установления таксономического положения исследуемого вируса провели детальный молекулярно-генетический анализ.

Молекулярно-генетический анализ. S-сегмент LEIV-13395 кодирует нуклеокапсидный белок N, состоящий из 233 а.о. (26,6 кД; pI = 9,33), а также неструктурный белок NSs длиной 101 а.о. (11,2 кД; pI = 10,38).

Для нуклеокапсидного белка ранее были найдены 46 аминокислот, абсолютно консервативных для 51 вируса серогрупп Буньямвера, Калифорнийского энцефалита, группы С и Симбу, а также 14 аминокислот, консервативных как минимум для 90% этих вирусов [16]. Данные аминокислотные остатки считаются крайне важными для функционирования нуклеокапсидного белка. Консервативность всех 60 аминокислотных остатков в нуклеокапсидном белке LEIV-13395 сохранена.

M-сегмент вируса кодирует полипротеин-предшественник длиной 1434 аминокислот (161,96 кД; pI = 8,02). Полипротеин предположительно котрансляционно нарезается на белки Gn из 286 аминокислот (позиции 16-301 по отношению к первому метионину полипротеина, 32,1 кД; pI = 8,86), NSm (174 а.о., позиции 302-475, 19,6 кД; pI = 7,67) и Gc, длиной 926 а.о. (позиции 508-1434,

105 кД; pI = 7,43). Предсказанный с помощью сервиса SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) сайт нарезания сигнального пептида располагается между аминокислотой 15 и 16 полипротеина. Сайт нарезания между белками Gn и NSm предположительно находится сразу после консервативного остатка аргинина в позиции 301 полипротеина. Согласно предсказанию SignalP, нарезание NSm-Gc сигнальной пептидазой происходит после остатка аланина в позиции 476. В положении -3 по отношению к предсказанному сайту находится остаток валина, который в сочетании с позицией -1 аланина является одной из наиболее часто встречающихся комбинаций аминокислот в сайтах нарезания полипротеинов клеточными сигналами. Таким образом, полипротеин-предшественник LEIV-13395 обладает типичной для ортобуньявирусов структурой, обладая полноразмерными белками Gn, NSm и Gc, в отличие от новых представителей рода - вирусов Хурдун [17], Herbert virus, Taï virus и Kibale virus (KIBV) [18].

Для полипротеина LEIV-13395 с помощью сервиса NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, [15]) мы обнаружили шесть потенциальных сайтов N-гликозилирования (табл. 2) – два в части, кодирующей Gn (остатки аспарагина N-59 и N-247), и четыре в области, кодирующей Gc (N-623, N-664, N-763 и N-1170). В отличие от этого для полипротеинов различных штаммов BATV обнаружили от трех до четырех подобных сайтов, причем позиция N-247 оказалась характерна исключительно для штаммов, выделенных на территории Азии и Африки (включая NRIV), но не Европы. Три из шести сайтов гликозилирования вируса LEIV-13395 не встречаются у BATV, однако обнаруживаются у других ортобуньявирусов. Так, сайт N-1170 характерен африканскому вирусу Илеша группы Буньямвера и вирусу Ла Кросс (LACV-La Crosse Virus) группы Калифорнийского

Уровень нуклеотидной и аминокислотной идентичности сегментов генома и соответствующих белков LEIV-13395 и некоторых представителей групп Буньямвера и Калифорнийского энцефалита

L-сегмент и РНК-зависимая РНК-полимераза							
Нуклеотидная идентичность (%)	Аминокислотная идентичность (%)						
	LEIV-13395	BATV	BUNV	CVV	TENV	WYOV	LACV
LEIV-13395		90,6	81,4	83,1	83,0	67,8	55,3
BATV	79,5		81,6	83,1	83,2	68,1	56,1
BUNV	73,5	73,5		82,1	81,6	67,3	56,6
CVV	74,1	74,7	73,0		87,9	67,3	56,1
TENV	73,9	74,2	72,9	77,0		67,0	55,7
WYOV	67,5	67,3	66,9	66,7	66,4		56,1
LACV	60,9	59,3	59,3	58,7	59,1	60,3	

Номера последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы в GenBank: Batai virus (BATV) (AGM40000); Bunyamwera virus (BUNV) (P20470); Cache Valley virus (CCV) (KC436106); Tensaw virus (TENV) (FJ943510); Wyeomyia virus (WYOV) (JN801038); La Crosse virus (LACV) (NC_004108). Номера последовательностей L сегментов в GenBank: Batai virus (BATV) (KC168048); Bunyamwera virus (BUNV) (X14383); Cache Valley virus (CCV) (AGI03946); Tensaw virus (TENV) (ACV95629); Wyeomyia virus (WYOV) (AEZ35278); La Crosse virus (LACV) (NP_671968).

М-сегмент и полипротеин-предшественник

М-сегмент и полипротеин-предшественник							
Нуклеотидная идентичность (%)	Аминокислотная идентичность (%)						
	LEIV-13395	BATV	BUNV	CVV	TENV	WYOV	LACV
LEIV-13395		84,2	64,0	75,2	74,0	51,2	41,3
BATV	77,5		64,3	75,5	74,5	51,4	42,0
BUNV	65,8	64,4		64,2	64,0	51,2	41,6
CVV	70,5	70,8	63,9		80,6	51,9	41,3
TENV	71,2	69,9	64,4	74,0		52,0	41,6
WYOV	58,8	58,0	58,0	57,3	58,7		40,7
LACV	52,9	53,0	52,1	53,0	53,4	52,9	

Номера последовательностей полипротеина-предшественника в GenBank: Batai virus (BATV) (AGM39999); Bunyamwera virus (BUNV) (AAA42777); Cache Valley virus (CCV) (AAF33115); Tensaw virus (TENV) (ACV95627); Wyeomyia virus (WYOV) (AEZ35274); La Crosse virus (LACV) (NP_671969). Номера последовательностей М сегмента в GenBank: Batai virus (BATV) (KC168047); Bunyamwera virus (BUNV) (M11852); Cache Valley virus (CCV) (KC436107); Tensaw virus (TENV) (FJ943508); Wyeomyia virus (WYOV) (JN572081); La Crosse virus (LACV) (NC_004109).

S-сегмент и нуклеокапсидный белок

S-сегмент и нуклеокапсидный белок							
Нуклеотидная идентичность (%)	Аминокислотная идентичность (%)						
	LEIV-13395	BATV	BUNV	CVV	TENV	WYOV	LACV
LEIV-13395		97,8	93,1	94,0	95,3	62,7	42,9
BATV	86,3		92,6	93,9	94,3	62,6	43,5
BUNV	80,3	81,3		90,6	93,1	63,5	42,9
CVV	82,6	83,9	81,2		95,3	63,9	44,2
TENV	82,5	83,2	80,9	84,7		63,5	44,6
WYOV	56,8	57,2	58,5	58,4	58,3		48,5
LACV	51,3	51,2	49,0	50,3	49,9	51,8	

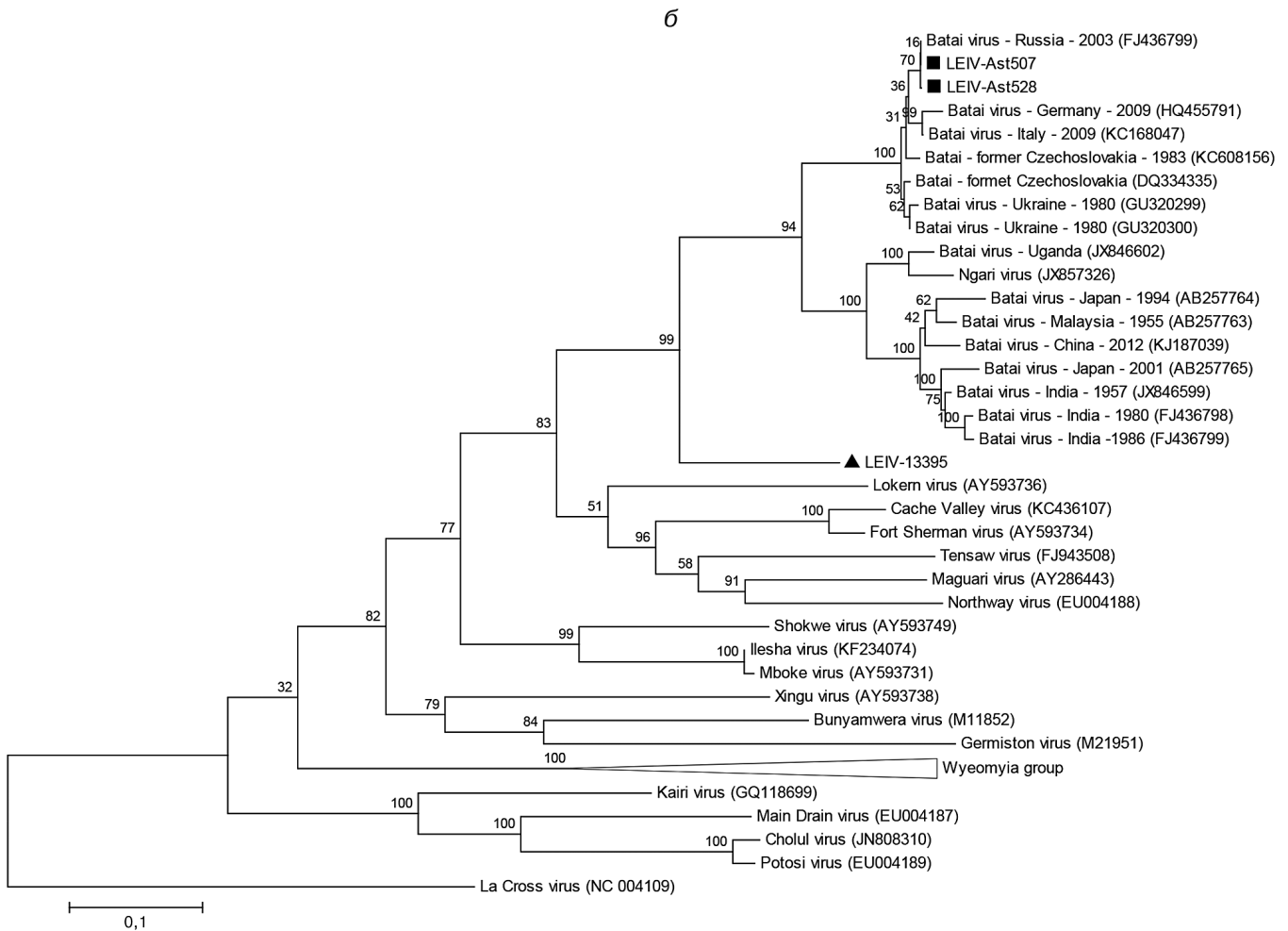
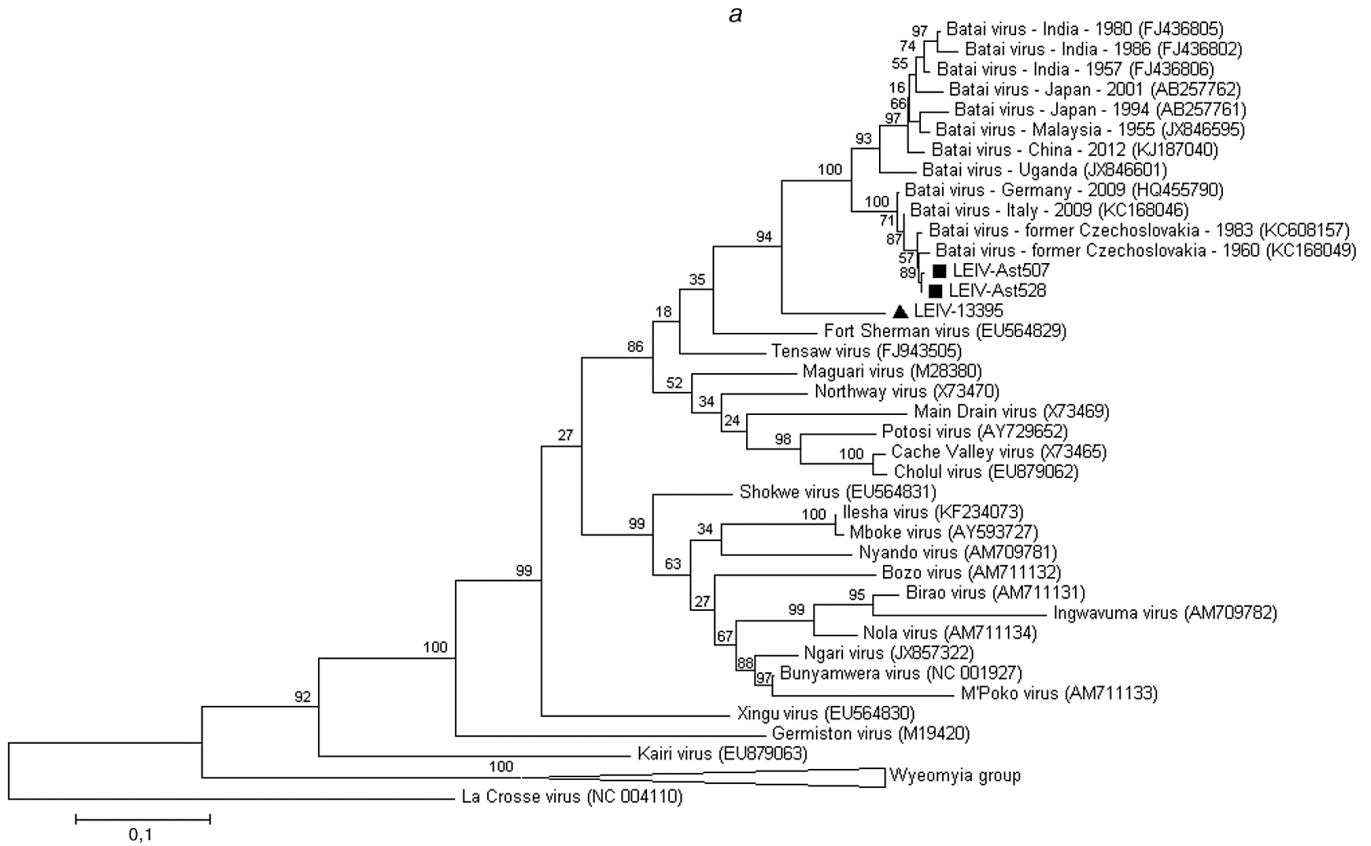
Номера последовательностей нуклеокапсидного белка в GenBank: Batai virus (BATV) (ADX97411); Bunyamwera virus (BUNV) (NP_047213); Cache Valley virus (CCV) (ADG62277); Tensaw virus (TENV) (ACV95624); Wyeomyia virus (WYOV) (AEZ35279); La Crosse virus (LACV) (NP_671970). Номера последовательностей S сегментов в GenBank: Batai virus (BATV) (KC168046); Bunyamwera virus (BUNV) (NC_001927); Cache Valley virus (CCV) (X73465); Tensaw virus (TENV) (FJ943505); Wyeomyia virus (WYOV) (FJ235921); La Crosse virus (LACV) (NC_004110).

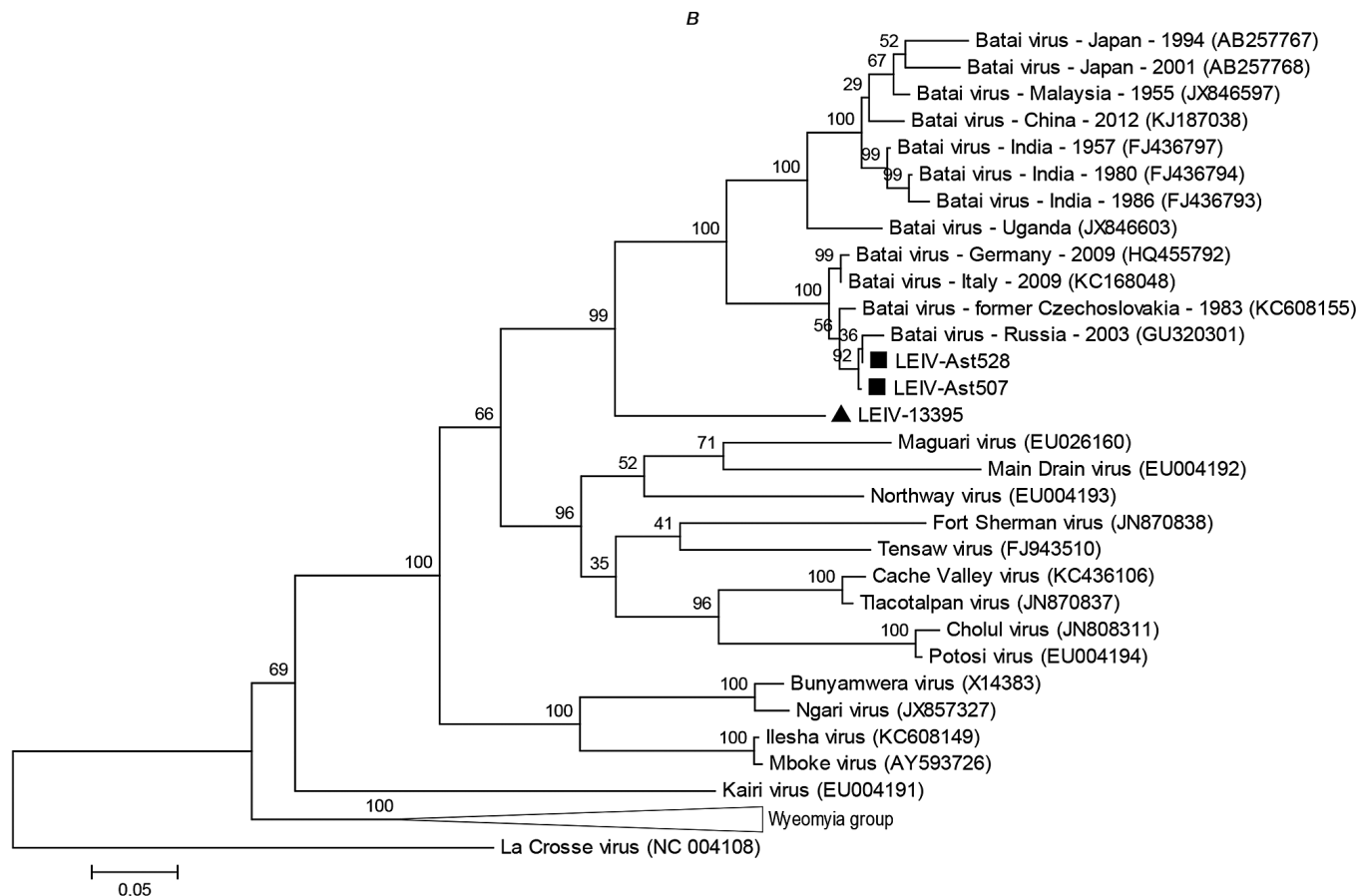
энцефалита. Сайты N-59 и N-763 среди представителей группы Буньямвера также найдены у циркулирующих на территории Северной Америки вирусов Tensaw и Cache Valley, что, возможно, коррелирует с местом изоляции LEIV-13395.

Полипротеин-предшественник содержит 70 остатков цистеина, 19 в области Gn, 8 в белке NSm и 43 в белке Gc. Высокий уровень содержания цистеиновых остатков (в данном случае 4,9%), по-видимому, является общей чертой буньявирусов [19].

Идентифицированный M. Plassmeyer и соавт. [20] пептид-слияния для LACV, состоящий из 22 аминокислотных остатков, также консервативен и для LEIV-13395 и располагается в позициях 1059-1080 а.о. полипротеина-предшественника. В позиции 11 данного пептида находится остаток изолейцина, характерный для TENV, CCV и BATV, выделенного в Китае, в то время как у всех остальных штаммов BATV в данной позиции расположен остаток валина.

L-сегмент LEIV-13395 кодирует вирусную РНК-зави-





Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей S-, M- и L-сегментов (a–в) вирусов серогруппы Буньямвера, рода *Orthobunyavirus*.

Филогенетические деревья построены методом максимального правдоподобия (maximum likelihood) по всем сайтам выравниваний (use all sites) в рамках двухпараметрической модели Кимуры с 1000-кратной статистической оценкой методом бутстрэп-анализа и укоренены относительно соответствующих последовательностей вируса Ла Кросс (LACV).

симую РНК-полимеразу длиной 2237 а.о. (258,7 кД; pI = 7,13), содержащую все консервативные для вирусных РНК-полимераз домены [21].

Филогенетический анализ

Наибольшей нуклеотидной идентичностью L-сегмент LEIV-13395 обладает с таковым у различных штаммов BATAV (от 76,5 до 79,7%), меньшее значение этого показателя наблюдается с последовательностями BUNV (73,5%), CVV (74,1%) и TENV (73,9%). Аминокислотная последовательность РНК-зависимой РНК-полимеразы более консервативна и достигает 91% идентичности с соответствующей последовательностью BATAV (табл. 3).

Последовательности M-сегмента и полипротеина-предшественника LEIV-13395 также обладают наибольшей нуклеотидной и аминокислотной схожестью (76,9–80,8% и 83,1–84,4% соответственно) с последовательностями различных штаммов BATAV. M-сегменты ортобуньявирусов обычно менее консервативны по сравнению с S- и L-сегментами, так как кодируют вирусные поверхностные гликопротеины, определяющие рецепторную специфичность вируса для позвоночного и членистоногого хозяев.

Нуклеотидная идентичность последовательности S-сегмента LEIV-13395 с последовательностями различных вирусов Батаи находится в диапазоне от 85,8 до 86,9 и составляет порядка 82,5% с TENV и CVV. На аминокислотном уровне для нуклеокапсидного белка наблюдается более выраженная консервативность, достигающая 98,7% (отличие в 3 аминокислотных остатках) по

отношению к штамму BATAV из Уганды.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей S-, M- и L-сегментов вирусов серогруппы Буньямвера рода *Orthobunyavirus*, проведенный с использованием методов максимального правдоподобия (maximum likelihood, см. рисунок) и присоединения соседей (neighbor-joining), определяет LEIV-13395 как внешнюю группу по отношению к BATAV. Учитывая максимальный уровень нуклеотидных идентичностей S-(86,9%), M-(80,8%) и L-(79,7%) сегментов по отношению к известным ортобуньявирусам, а также особый паттерн сайтов N-гликозилирования полипротеина-предшественника, мы предлагаем считать LEIV-13395 новым представителем серогруппы Буньямвера.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Batai – BATAV. In: Karabatsos N., Ed. International catalogue of arboviruses and certain other viruses of vertebrates. San Antonio, Texas: Am. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1985.
2. Hubalek Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.* 2008; 103 (Suppl 1): S29–43.
3. Колобухина Л.В., Львов Д.Н. Лихорадка Батаи. В кн.: Львов Д.К., ред. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 736–9.
4. Briese T., Bird B., Kapoor V., Nichol S.T., Lipkin W.I. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J. Virol.* 2006; 80 (11): 5627–30.
5. Bowen M.D., Trappier S.G., Sanchez A.J., Meyer R.F., Goldsmith C.S., Zaki S.R. et al. A reassortant bunyavirus isolated from acute

- hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology*. 2001; 291 (2): 185–90.
6. Huhtamo E., Lambert A.J., Costantino S., Servino L., Krizmancic L., Boldorini R. et al. Isolation and full genomic characterization of Batai virus from mosquitoes, Italy 2009. *J. Gen. Virol.* 2013; 94 (6): 1242–8.
 7. Jost H., Bialonski A., Schmetz C., Gunther S., Becker N., Schmidt-Chanasit J. Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84 (2): 241–3.
 8. Dilcher M., Sall A.A., Hufert F.T., Weidmann M. Clarifying Bunyamwera virus riddles of the past. *Virus Genes*. 2013; 47 (1): 160–3.
 9. Groseth A., Matsuno K., Dahlstrom E., Anzick S.L., Porcella S.F., Ebihara H. Complete genome sequencing of four geographically diverse strains of Batai virus. *J. Virol.* 2012; 86 (24): 13844–5.
 10. Yadav P.D., Sudeep A.B., Mishra A.C., Mourya D.T. Molecular characterization of Chittoor (Batai) virus isolates from India. *Indian J. Med. Res.* 2012; 136 (5): 792–8.
 11. Yanase T., Kato T., Yamakawa M., Takayoshi K., Nakamura K., Kokuba T. et al. Genetic characterization of Batai virus indicates a genomic reassortment between orthobunyaviruses in nature. *Arch. Virol.* 2006; 151 (11): 2253–60.
 12. Терехин С.А., Гребенникова Т.В., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Филогенетический анализ штаммов вируса Батаи, выделенных из комаров в Волгоградской области, Западной Украине и Чешской Республике. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; (1): 27–9.
 13. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011; 27 (16): 2194–200.
 14. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28 (10): 2731–9.
 15. Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. *Signal P 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. *Nat. Methods*. 2011; 8 (10): 785–6.
 16. Eifan S.A., Elliott R.M. Mutational analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus nucleocapsid protein gene. *J. Virol.* 2009; 83 (21): 11307–17.
 17. Альховский С.В., Щетинин А.М., Львов Д.К., Шелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Львов Д.Н. и др. Вирус Хурдун (KHURV): новый вирус рода Orthobunyavirus (Bunyaviridae). *Вопросы вирусологии*. 2013. 58(4): 10–3.
 18. Marklewitz M., Zirkel F., Rwego I.B., Heidemann H., Trippner P., Kurth A. et al. Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. *J. Virol.* 2013; 87 (23): 12850–65.
 19. Grady L.J., Sanders M.L., Campbell W.P. The sequence of the M RNA of an isolate of La Crosse virus. *J. Gen. Virol.* 1987; 68 (Pt 12): 3057–71.
 20. Plassmeyer M.L., Soldan S.S., Stachelek K.M., Roth S.M., Martin-Garcia J., Gonzalez-Scarano F. Mutagenesis of the La Crosse Virus glycoprotein supports a role for Gc (1066–1087) as the fusion peptide. *Virology*. 2007; 358 (2): 273–82.
 21. 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.
 4. Briese T., Bird B., Kapoor V., Nichol S.T., Lipkin W.I. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J. Virol.* 2006; 80 (11): 5627–30.
 5. Bowen M.D., Trappier S.G., Sanchez A.J., Meyer R.F., Goldsmith C.S., Zaki S.R. et al. A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology*. 2001; 291 (2): 185–90.
 6. Huhtamo E., Lambert A.J., Costantino S., Servino L., Krizmancic L., Boldorini R. et al. Isolation and full genomic characterization of Batai virus from mosquitoes, Italy 2009. *J. Gen. Virol.* 2013; 94 (6): 1242–8.
 7. Jost H., Bialonski A., Schmetz C., Gunther S., Becker N., Schmidt-Chanasit J. Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84 (2): 241–3.
 8. Dilcher M., Sall A.A., Hufert F.T., Weidmann M. Clarifying Bunyamwera virus riddles of the past. *Virus Genes*. 2013; 47 (1): 160–3.
 9. Groseth A., Matsuno K., Dahlstrom E., Anzick S.L., Porcella S.F., Ebihara H. Complete genome sequencing of four geographically diverse strains of Batai virus. *J. Virol.* 2012; 86 (24): 13844–5.
 10. Yadav P.D., Sudeep A.B., Mishra A.C., Mourya D.T. Molecular characterization of Chittoor (Batai) virus isolates from India. *Indian J. Med. Res.* 2012; 136 (5): 792–8.
 11. Yanase T., Kato T., Yamakawa M., Takayoshi K., Nakamura K., Kokuba T. et al. Genetic characterization of Batai virus indicates a genomic reassortment between orthobunyaviruses in nature. *Arch. Virol.* 2006; 151 (11): 2253–60.
 12. Терехин С.А., Гребенникова Т.В., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Молекулярно-генетический анализ штаммов вируса Батаи, выделенных из комаров в Волгоградской области, Западной Украине и Чешской Республике. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; (1): 27–9.
 13. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011; 27 (16): 2194–200.
 14. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28 (10): 2731–9.
 15. Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. *Signal P 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. *Nat. Methods*. 2011; 8 (10): 785–6.
 16. Eifan S.A., Elliott R.M. Mutational analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus nucleocapsid protein gene. *J. Virol.* 2009; 83 (21): 11307–17.
 17. Al'kovskhovskiy S.V., Shchetinina A.M., Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Lvov D.N. et al. The Khurdun virus (KHURV): a new representative of the orthobunyavirus (Bunyaviridae). *Voprosy Virusologii*. 2013; 58 (4): 10–3. (in Russian)
 18. Marklewitz M., Zirkel F., Rwego I.B., Heidemann H., Trippner P., Kurth A. et al. Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. *J. Virol.* 2013; 87 (23): 12850–65.
 19. Grady L.J., Sanders M.L., Campbell W.P. The sequence of the M RNA of an isolate of La Crosse virus. *J. Gen. Virol.* 1987; 68 (12): 3057–71.
 20. Plassmeyer M.L., Soldan S.S., Stachelek K.M., Roth S.M., Martin-Garcia J., Gonzalez-Scarano F. Mutagenesis of the La Crosse Virus glycoprotein supports a role for Gc (1066–1087) as the fusion peptide. *Virology*. 2007; 358 (2): 273–82.
 21. 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.

Поступила 03.07.14

REFERENCES

1. Batai – BATV. In: Karabatsos N., Ed. International catalogue of arboviruses and certain other viruses of vertebrates. San Antonio, Texas: *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 1985.
2. Hubalek Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.* 2008; 103 (Suppl 1): S29–43.
3. Kolobukhina L.V., Lvov D.N. Batai fever. In: Lvov D.K., ed. *Viruses*

- and viral infections of man and animals [*Virussy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh.*] Moscow: MIA; 2013: 736–9. (in Russian)

Received 03.07.14