

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 578.833.1.083.2

А. С. Климентов<sup>1,2</sup>, А. П. Гмыль<sup>2</sup>, А. М. Бутенко<sup>1</sup>, Л. В. Гмыль<sup>2</sup>, О. В. Исаева<sup>2</sup>,  
В. Ф. Ларичев<sup>1</sup>, Н. В. Хуторецкая<sup>1</sup>, Г. Г. Карганова<sup>2</sup>

## ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ВИРУСОВ БХАНДЖА И КИСМАЙО (СЕМЕЙСТВО *BUNYAVIRIDAE*)

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16;

<sup>2</sup>ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, 142782, Московская обл., Ленинский район, поселок сельского типа Институт полиомиелита, 27 км Киевского шоссе

*Частично определены нуклеотидные последовательности сегментов М (1398 нуклеотидов) и L (6186 нуклеотидов) генома вируса Бханджа и L-сегмента (1297 нуклеотидов) вируса Кисмайю. Филогенетический анализ выведенной аминокислотной последовательности показал, что данные вирусы являются новыми представителями рода флебовирусов в составе семейства Bunyaviridae.*

Ключевые слова: вирус Бханджа, вирус Кисмайю, вирус BHAJ, KISJ, флебовирус, буньявирус

A. S. Klimentov<sup>1,2</sup>, A. N. Gmyl', A. M. Butenko<sup>1</sup>, L. V. Gmyl', O. V. Isaeva<sup>2</sup>, V. F. Larichev<sup>1</sup>, N. V. Khutoretskaya<sup>1</sup>, G. G. Karganova<sup>2</sup>.

TAXONOMIC STATUS OF BHANJA AND KISMAYO VIRUSES (FAMILY BUNYAVIRIDAE)

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution "D.I. Ivanovsky Institute of Virology" of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, 16, Gamaleya str., Moscow, 123098

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Institution "M. P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis" of the Russian Academy of Medical Sciences, 27th km. of Kiev Highway, Leninsky District, Moscow Region, 142782 Moscow region

*The nucleotide sequence of M= (1398 nucleotides and L= (6186 nucleotides) segments of the genome of Bhanja virus and L-segment (1297 nucleotides) of Kismayo virus has been partially determined. Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences showed that these viruses are novel members of the Flebovirus (Phlebovirus) genus in the family Bunyaviridae*

Key words: Bhanja virus, virus BHAJ, virus Kismayo, KISJ, Flebovirus, Bunyaviridae

Прототипный штамм вируса Бханджа IG-690 был впервые изолирован в 1954 г. из клещей *Haemaphysalis intermedia*, собранных с козы в Индии [13]. Впоследствии циркуляция вируса Бханджа была установлена во многих странах Африки, Азии и Европы [7,8]. Вирус Бханджа наряду с двумя африканскими переносимыми клещами арбовирусами Кисмайю и Форекария на основании перекрестных связей, выявленных в реакции связывания комплемента (РСК) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА), объединены в антигенную группу Бханджа [2, 3, 5]. На основании данных электронной микроскопии вирус Бханджа был включен в состав семейства *Bunyaviridae* в категорию Бунья-подобных вирусов [11]. Для вирусов Бханджа, Кисмайю и Форекария не установлено антигенных связей с другими представителями семейства *Bunyaviridae*, и их таксономическое положение до настоящего времени не определено.

Известно, что вирус Бханджа обладает патогенностью для человека, вызывая острые лихорадочные гриппоподобные заболевания [1, 4, 12]. Описан случай тяжелого менингоэнцефалита при естествен-

ном заражении через укус клеща [14]. Имеющаяся в литературе информация о вирусах Форекария и Кисмайю весьма ограничена. На настоящий момент какие-либо данные молекулярно-генетических исследований вирусов группы Бханджа отсутствуют.

Настоящая работа посвящена определению таксономического положения вирусов Бханджа и Кисмайю в пределах семейства *Bunyaviridae*.

### Материалы и методы

В работе были использованы вирусы из коллекции лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ, Москва.

Штамм IG-690 вируса Бханджа был выделен в 1954 г. в Вирусологическом центре, г. Пуна, штат Орисса, Индия. Источником выделения послужили клещи *Haemaphysalis intermedia* [13]. Вирус поддерживался в пассажах через мозг новорожденных белых мышей (н. б. м.), детальная пассажная история штамма недоступна.

Штамм Rh91 вируса Кисмайю был выделен в 1974 г. в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР из клещей *Rhipicephalus pulchellus*, собранных с домашних животных в Сомали [2]. Штамм прошел 17 пассажей через мозг н. б. м.

Для корреспонденции: Климентов Александр Сергеевич, аспирант ФГБУ НИИ вирусологии, мл. науч. сотр. ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, e-mail:aklimentov@mail.ru

Тотальную РНК из вирусодержащего материала выделяли реагентом "Тризол" ("Gibco BRL") и переводили в двуцепную ДНК с использованием рандомизированного олигонуклеотида с адаптором FR28-RT-N: 5'-GCCGGAGCTCTGCAGATATC-NNNNNNN-3' (Синтол), как для синтеза первой цепи при помощи обратной транскриптазы SuperScript-III ("Invitrogen"), так и для синтеза второй цепи при помощи фрагмента Klenow экзо-ДНК-полимеразы I E. coli ("Fermentas"). Амплификацию проводили с использованием олигонуклеотида, комплементарного адапторному участку. Продукты ПЦР разделяли в 1% агарозном геле, фрагменты длиной 300—1200 п. н. выделяли из геля с помощью коммерческого набора QIAquick Gel Extraction Kit ("Qiagen") и клонировали с использованием набора InstAclone PCR Cloning Kit ("Fermentas").

Секвенирование клонов проводили с использованием универсальных праймеров M13/pUC ("Fermentas"/"Promega") на автоматическом секвенаторе Beckman Coulter CEQ 8000.

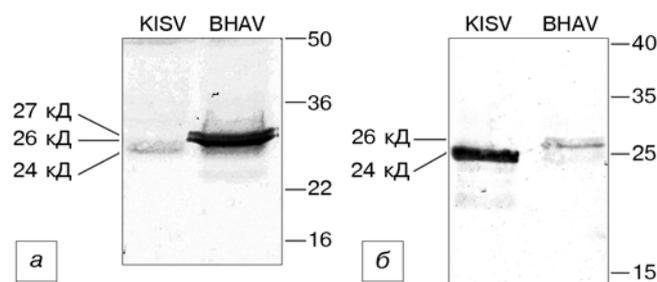


Рис. 1. Иммуноблоты фракций сахарозных градиентов, содержащие вирусы Бханджа (BHAV) и Кисмайо (KISV), окрашенные антителами к вирусам Бханджа (а) и Кисмайо (б).

Справа от блотов указано положение маркеров молекулярных масс в кД, слева — расчетные массы и положения окрашиваемых вирус-специфических белков.

Для обработки последовательностей использовали программы SeqMan и SeqBuilder (пакет программ LaserGene DNASTar v7.0). Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помо-

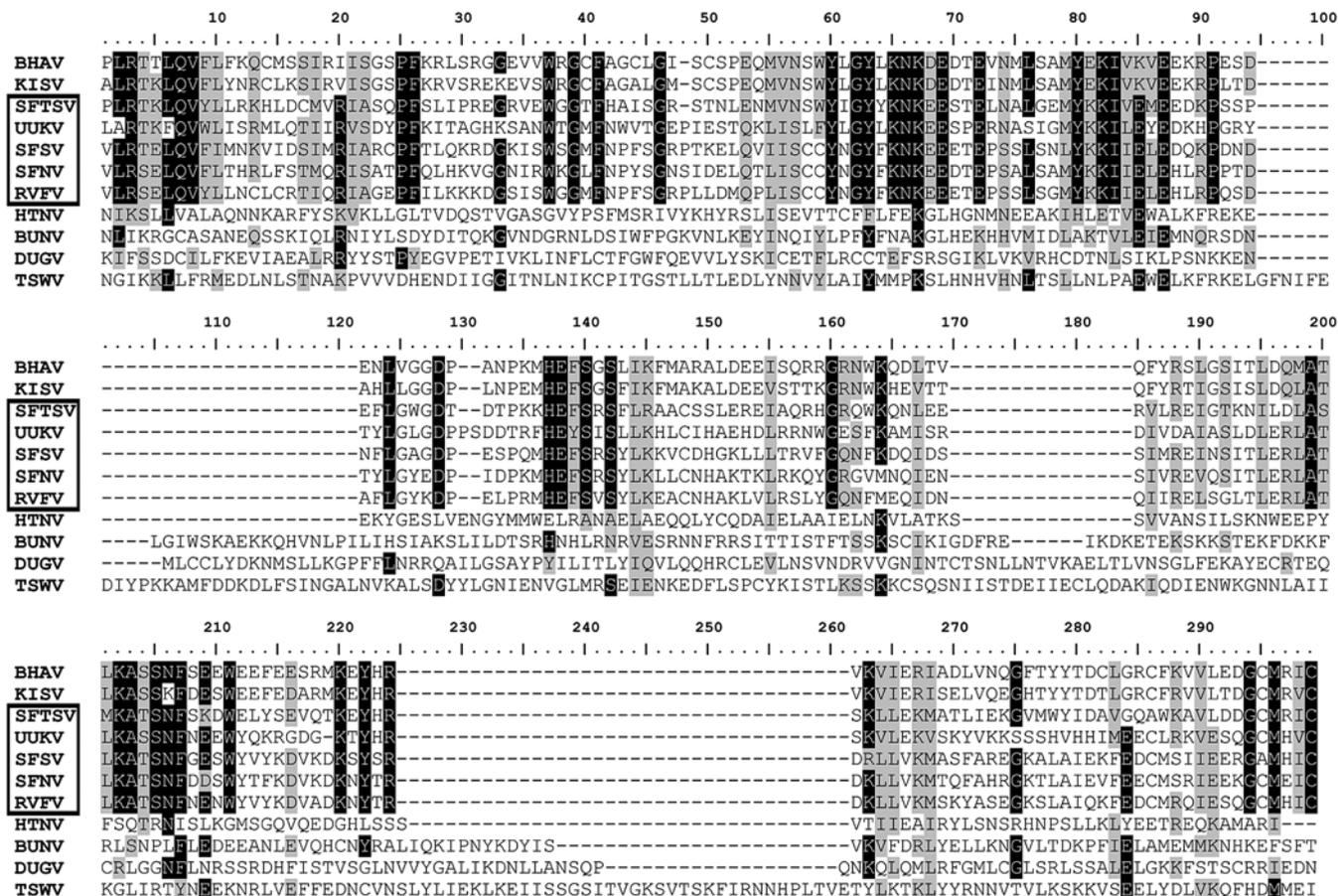


Рис. 2. Фрагмент множественного выравнивания выведенных аминокислотных последовательностей L-сегмента генома вирусов Бханджа и Кисмайо с 709-й по 925-ю аминокислоту (нумерация по выведенной аминокислотной последовательности полимеразы вируса Бханджа), флебовирусов (объединены в рамку) и прототипных представителей других родов семейства *Bunyaviridae*.

Белыми буквами на черном фоне обозначены аминокислоты, которые консервируются более чем в 60% аминокислотных последовательностей, использованных для построения выравнивания. Серым цветом выделены гомологичные аминокислоты. Тире обозначены пропуски в аминокислотных последовательностях, образовавшиеся при построении выравнивания. Для вирусов Бханджа и Кисмайо приведены общепринятые сокращения BHAV и KISV соответственно. SFTSV — Severe fever with thrombocytopenia syndrome (код доступа в NSBI: ADZ04509); UUKV — Uukuniemi virus (NP941973); SFSV — Sandfly Sicilian Turkey virus (YP004382743); SFNV — Sandfly fever Naples (YP089669); RVFV — Rift Valley fever virus (YP003848704); HTNV — Hantaan virus (NP941982); BUNV — Bunyamwera virus (NP047211); DUGV — Dugbe virus (NP690576); TSWV — Tomato spotted wilt virus (NP049362).

щью подпрограммы ClustalW в программе Mega5 [9]. Филогенетический анализ проводили методом ближайших соседей (neighbour-joining). При построении филогенетического дерева использовали р-дистанцию (p-distance). Статистическую значимость топологии полученных деревьев оценивали "bootstrap"-тестом (1000 реплик).

При постановке иммуноблота белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. Использовали стандарты молекулярных масс PageRuller Prestained Protein Ladder ("Fermentas") или SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard ("Invitrogen"). В качестве первичных антител использовали ИАЖ мышей, иммунизированных вирусами Бханджа или Кисмайю, а в качестве вторичных — кроличьи антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена ("Promega").

**Результаты и обсуждение**

Подход, использованный нами для определения нуклеотидной последовательности геномов виру-

сов Бханджа и Кисмайю, был основан на методе неспецифичной амплификации нуклеиновых кислот с одного рандомизированного праймера с адаптором (sequence independent single primer amplification (SISPA)) [6]. В качестве исходной матрицы для создания геномных библиотек была использована тотальная РНК, изолированная из частично очищенных в градиенте плотности сахарозы препаратов вирусов Бханджа и Кисмайю. Вирусосодержащие фракции определяли методом иммуноферментного анализа с использованием поликлональных антител к вирусам Бханджа и Кисмайю, а также иммуноблота. На рис. 1 приведены результаты анализа фракций сахарозных градиентов, использованных для выделения РНК, с помощью иммуноблота с использованием антител к вирусам Бханджа и Кисмайю (а и б соответственно). Как видно, антитела к вирусу Бханджа окрашивают во фракции, содержащей вирус Бханджа, два белка с мол. массами 26 и 27 кД (см. рис. 1, а). Антитела к вирусу Кисмайю в этой же фракции достоверно окрасили по крайней мере один белок массой 26 кД (см. рис. 1, б). Во фракции, содержащей вирус Кисмайю, антитела к этому виру-

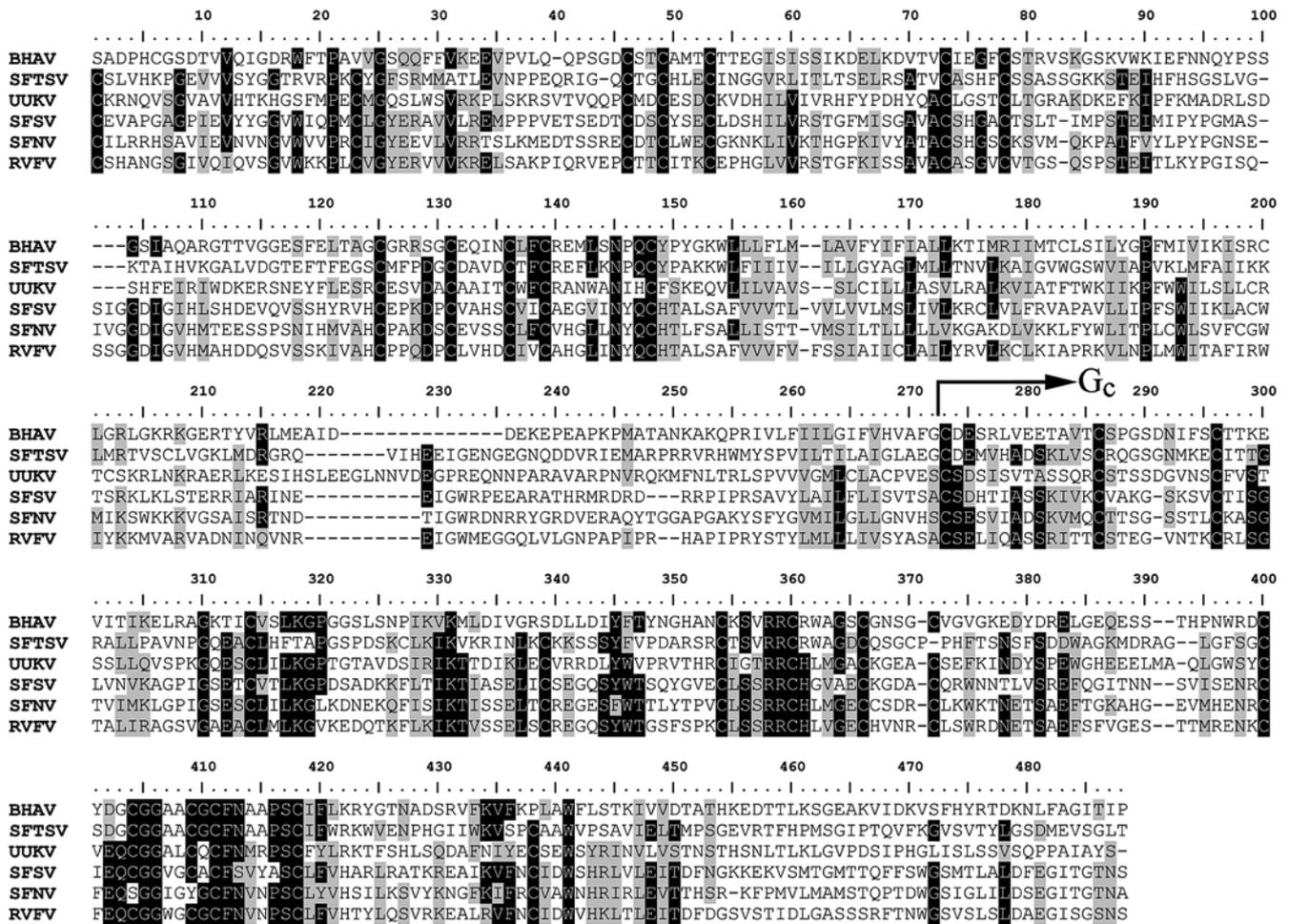


Рис. 3. Множественное выравнивание выведенной аминокислотной последовательности М-сегмента генома вируса Бханджа с 305-й по 778-ю аминокислоту (нумерация аминокислот согласно аминокислотной последовательности предшественника гликопротеинов SFTSV) и флебовирусов. Потенциальный сайт отщепления поверхностного гликопротеина Gc от белка предшественника указан стрелкой.

Использованы обозначения и сокращения, как и на рис. 2. Коды в базе NCBI: SFTSV — ADZ04471, UUKV — NP941979, SFSV — YP004382742, SFNV — YP089671 и RVFV — YP003848705.

су окрашивают полосу, соответствующую мол. массе ~24 кД, которая, вероятнее всего, представляет собой 2 белка с близкими молекулярными массами (см. рис. 1, б). Антитела к вирусу Бханджа также окрашивают в этой фракции по крайней мере один белок мол. массой 24 кД (см. рис. 1, а). Основным иммуногеном при буньявирусной инфекции является белок нуклеокапсида. Следовательно, можно предположить, что выявленные в иммуноблоте белки, вероятнее всего, являются белками нуклеокапсида. В пользу этого свидетельствует и наличие перекрестного окрашивания, поскольку именно белок нуклеокапсида распознается в реакции связывания комплемента, а исследуемые вирусы в этой реакции имеют перекрестную антигенную связь [5]. Соответствующую выявленным нами белкам вирусов Бханджа и Кисмайю молекулярную массу имеют белки нуклеокапсида, только представители родов *Phlebovirus* и *Orthobunyavirus*.

Нами было секвенировано более 200 клонов библиотеки вируса Бханджа и около 50 клонов — вируса Кисмайю. Большинство секвенированных клонов содержали вставки ДНК генома мыши (98% для библиотеки вируса Бханджа и 92% — вируса Кис-

майю), как правило, нуклеотидные последовательности 18S либо 28S рибосомальных РНК. Тем не менее в каждой из геномных библиотек было обнаружено по 4 клона, содержащих последовательности нуклеотидов, не имевших значимой гомологии ни с одной из нуклеотидных последовательностей баз данных NCBI. В связи с этим было проведено сравнение выведенных аминокислотных последовательностей с базами данных NCBI. В результате было обнаружено, что 5 из 8 выведенных аминокислотных последовательностей имеет родство с белками, кодируемыми геномами представителей рода *Phlebovirus*. В одном из клонов библиотеки вируса Бханджа содержалась нуклеотидная последовательность, которая на аминокислотном уровне имела сходство в 39% с участком, расположенным между 694-й и 750-й аминокислотами предшественника поверхностных гликопротеинов (кодируется средним (М) сегментом генома) вируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV), JQ684872). Выведенные аминокислотные последовательности еще двух клонов этой же библиотеки имели сходство в 38% с участком со 160-й по 216-ю аминокислоту и в 52% с

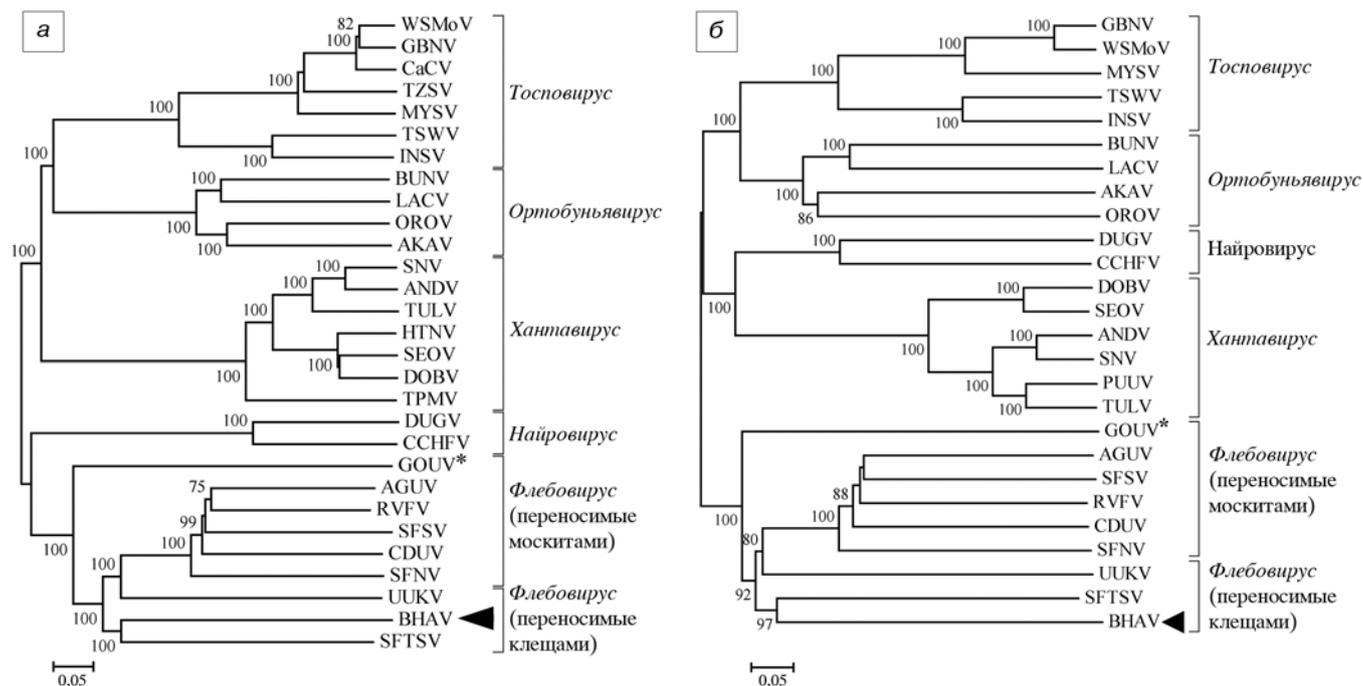


Рис. 4. Филогенетические деревья построены на основании выравнивания практически полной аминокислотной последовательности полимеразы (отсутствуют 23 С-концевые аминокислоты, согласно аминокислотной последовательности SFTSV) (а) и фрагмента предшественника поверхностных гликопротеинов (б) вируса Бханджа и представителей всех родов семейства *Bunyaviridae*.

Цифры в узлах деревьев соответствуют бутстреп-поддержке. Положение вируса Бханджа на деревьях указано стрелкой. Вирус Gouleako на деревьях отмечен звездочкой, поскольку предложено выделить его в отдельный от флебовирусов род [9]. Для вирусов, не приведенных на рис. 2 и 3, использованы следующие сокращения (в скобках приведены коды доступа в NCBI для L- и M-сегментов): AGUV — Aguacate virus (YP004414703, YP004414702); CDUV — Candiru virus (YP004347993, YP004347992); GOUV — Gouleako virus (ABP68557, AEJ38174); WSMoV — Watermelon silver mottle virus (NP620752, NP620767); GBNV — Groundnut bud necrosis virus (NP619688, NP619703); TZSV — Tomato zonate spot virus (YP001740047); TSWV — Tomato spotted wilt virus (NP049362, NP049359); CaCV — Capsicum chlorosis virus (YP717924); INSV — Impatiens necrotic spot virus (NP619710, NP619691); MYSV — Melon yellow spot virus (YP717933, YP717935); ANDV — Andes virus (NP604473, NP604472); DOBV — Dobrava-Belgrade virus (NP942555, NP942554); SEOV — Seoul virus (NP942558, NP942557); SNV — Sin Nombre virus (NP941976, NP941974); TPMV — Thottapalayam virus (YP001911124); TULV — Tula virus (NP942124, NP942586); BUNV — Bunyamwera virus (NP047212, NP047211); OROV — Oropouche virus (NP982304, NP982303); AKAV — Akabane virus (YP001497159, YP001497160); LACV — La Crosse virus (NP671968, NP671969); DUGV — Dugbe virus (NP690576, NP690575); CCHFV — Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (YP325663, NP950235).

участком с 825-й по 937-ю аминокислоту флебовирусной полимеразы (кодируется большим (L) сегментом генома) вирусов Армеро (Armero, HQ661805) и SFTS (JQ684871) соответственно. Аминокислотные последовательности двух клонов библиотеки вируса Кисмайю имели сходство в 48% с 549-й по 689-ю и с 865-й по 978-ю аминокислоту полимеразы вируса SFTS.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей были сконструированы специфические олигонуклеотиды, которые были использованы для праймерной "прогулки" и создания библиотек. В результате нам удалось определить 1398 (~40% длины сегмента) и 6186 (~96% длины сегмента) нуклеотидов последовательности М- и L-сегментов соответственно генома вируса Бханджа и 1297 (~20% длины сегмента) нуклеотидов последовательности L-сегмента генома вируса Кисмайю.

Для определения таксономического положения вирусов Бханджа и Кисмайю выведенные аминокислотные последовательности белков, кодируемых L- и М-сегментами генома, были проанализированы при помощи множественного выравнивания с белками других представителей семейства *Bunyaviridae* (рис. 2 и 3). Анализ показал, что наиболее высокое сходство белка, кодируемого L-сегментом исследуемых вирусов, наблюдается с L-белками представителей флебовирусов: 36% идентичности с SFTSV и 32% с другими представителями рода. Гомология между вирусами Бханджа и Кисмайю на этом участке составляет 77%. М-сегмент вируса Бханджа также кодирует белок, наиболее близкородственный поверхностным гликопротеинам флебовирусов (30% идентичности с SFTSV, 25% с UUKV и флебовирусами, переносимыми москитами).

Таким образом, можно сделать заключение, что исследуемые вирусы являются новыми представителями рода флебовирусов. Данный вывод был дополнительно подтвержден при помощи филогенетического анализа. На филогенетических деревьях, построенных для белков, кодируемых сегментами L (рис. 4, а) и М (рис. 4, б) представителей семейства *Bunyaviridae*, частично секвенированный нами вирус Бханджа с высокой степенью достоверности (100% для L-сегмента и 92% для М-сегмента) группируется с вирусами, входящими в род *Phlebovirus*. Следует отметить, что ближайшим родственником (хотя весьма дальним) является вирус, вызывающий тяжелую лихорадку с синдромом тромбоцитопении в Китае (SFTSV).

Вирус Форекария, имея серологическое родство с вирусом Бханджа, также, вероятно, является флебовирусом.

### Заключение

Результаты проведенного нами молекулярно-генетического анализа частично секвенированных сегментов генома, кодирующих поверхностные гликопротеины и вирусную полимеразу вируса Бханджа, и геномного сегмента, кодирующего полимеразу вируса Кисмайю, позволяют сделать заключение, что исследованные вирусы являются новыми пред-

ставителями рода *Phlebovirus* в составе семейства *Bunyaviridae*.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Азарян А. Р., Гришианова А. П., Бутенко А. М. и др. Серологическая диагностика арбовирусных инфекций в Астраханской области // Материалы расширенного пленума Проблемной комиссии "Арбовирусы" и Научно-практической конф. "Арбовирусы и арбовирусные инфекции", Астрахань, 17—20 окт. 2006 г. — М., 2007. — С. 115—119.
2. Бутенко А. М., Громашевский В. Л., Львов Д. К. и др. Вирус Кисмайю — представитель антигенной группы Бханджа // Вопр. вирусол. — 1979. — Т. 24, № 6. — С. 661—665.
3. Boiro I., Lomonossov L. N., Malenko G. V. et al. Forécariah virus, a new representative of the Bhanja antigenic group, isolated in the Republic of Guinea. // Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales. — 1986. — Vol. 79, N 2. — P. 183—186.
4. Calisher C. H., Goodpasture H. C. Human Infection with Bhanja Virus // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 1975. — Vol. 24, N 6. — P. 1040—1042.
5. Digoutte J. P., Heme G. // Institut Pasteur. International Catalogue of arboviruses. Supplement. Dakar. Senegal. — 1985. — P. 111.
6. Djikeng A., Halpin R., Kuzmickas R. et al. Viral genome sequencing by random priming methods // BMC Genom. — 2008. — Vol. 9, N 5.
7. Hubalek Z. Geographic distribution of Bhanja virus // Folia Parasitol. (Praha). — 1987. — Vol. 34, N 1. — P. 77—86.
8. Hubalek Z. Biogeography of Tick-Borne Bhanja virus (*Bunyaviridae*) in Europe // Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 2009, doi:10.1155/2009/372691.
9. Kimar S., Tamura K., Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers // Comput. Applicat. Biosci. — 1994. — Vol. 10, N 2. — P. 189—191.
10. Marklewitzl M., Handrick S., Grasse W. et al. Gouléako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family Bunyaviridae // J. Virol. — 2011. — Vol. 85, N 17. — P. 9227—9234.
11. Murphy F. A., Harrison A. K., Whitfield S. G. Bunyaviridae: morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses // Intervirology. — 1973. — Vol. 1. — P. 297—316.
12. Punda V., Beus I., Calisher C. H. et al. Laboratory infections with Bhanja virus // Zbl. Bakteriол. — 1980. — Suppl. 9: Arboviruses in the Mediterranean Countries. — P. 273—275.
13. Shah K. V., Work T. H. Bhanja virus is a new arbovirus from ticks *Haemaphysalis intermedia* // Indian J. Med. Res. — 1969. — Vol. 57, N 5. — P. 793—798.
14. Vesenjak-Hirjan J., Calisher C. H., Beus I. et al. First natural clinical human Bhanja virus infection // Zbl. Bakteriол. — 1980. — Suppl. 9: Arboviruses in the Mediterranean Countries. — P. 297—301.

Поступила 07.06.12

### Сведения об авторах:

**Гмыль Анатолий Петрович**, канд. биол. наук, доцент, зав. лаб. биохимии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов, e-mail: apgmyl@mail.ru; **Бутенко Александр Михайлович**, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. биологии и индикации арбовирусов, НИИ вирусологии, e-mail: arboelisa@mail.ru; **Гмыль Лариса Вениаминовна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Института полиомиелита и вирусных энцефалитов, e-mail: lvgmyl@mail.ru; **Исаева Ольга Владиславовна**, канд. биол. наук, зав. отд. секвенирования (центр коллективного пользования) Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов; **Ларичев Виктор Филиппович**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ вирусологии, e-mail: vlaritchev@mail.ru; **Хуторецкая Наталья Владимировна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. НИИ вирусологии, e-mail: arboelisa@mail.ru; **Карганова Галина Григорьевна**, доктор биол. наук, доцент, зав. лаб. биологии арбовирусов, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, e-mail: karganova@bk.ru