

УДК 578.522 578.427

ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСА ОЗЕРА АББЕЙ ИЗ РОДА ОРТОБУНЬЯВИРУСОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Авдюшева Е.Ф., Негоденко А.О., Лучинин Д.Н., Бородай Н.В., Антонов А.С.,
Устинов Д.В., Молчанова Е.В., Шпак И.М.

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

*В результате применения метагеномного анализа впервые на территории Российской Федерации обнаружена РНК вируса озера Аббей в сыворотке крови больных и суспензии комаров рода *Culex*. Установлена принадлежность выявленного вируса к роду *Orthobunyavirus*, семейству *Peribunyaviridae*. Проведена аннотация и филогенетический анализ полученных сегментов генома.*

Ключевые слова: метагеномное секвенирование, арбовирусы, лихорадка неутонченной этиологии, вирусные патогены

Для цитирования: Авдюшева Е.Ф., Негоденко А.О., Лучинин Д.Н., Бородай Н.В., Антонов А.С., Устинов Д.В., Молчанова Е.В., Шпак И.М. Первый случай обнаружения вируса озера Аббей из рода Ортобуньявирусов в Российской Федерации. Медицина труда и экология человека. 2019: 4:8-14.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10041>

THE FIRST CASE OF DETECTION THE ABBEY LAKE VIRUS FROM THE GENUS OF ORTOBUNIAVIRUS IN THE RUSSIAN FEDERATION

Avdyusheva E.F., Negodenko A.O., Luchinin D.N., Borodai N.B., Antonov A.S., Ustinov D.V.,
Molchanova E.V., Shpak I.M.

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

*As a result of metagenomic analysis usage there was the first case of RNA detection of the Abbey lake orthobunyavirus in serum blood and *Culex spp.* mosquito suspension in the territory of the Russian Federation. Detected virus belongs to the genus *Orthobunyavirus*, the family *Peribunyaviridae*. Annotation and phylogenetic analysis of the obtained genome segments were performed.*

Key words: metagenomic sequencing, arboviruses, fever of unknown origin, viral pathogens

For quotation: Avdyusheva E.F.¹, Negodenko A.O.¹, Luchinin D.N.¹, Borodai N.B.¹, Antonov A.S.¹, Ustinov D.V.¹, Molchanova E.V.¹, Shpak I.M.¹ THE FIRST CASE OF DETECTION THE ABBEY LAKE VIRUS FROM THE GENUS OF ORTOBUNIAVIRUS IN THE RUSSIAN FEDERATION. Occupational health and human ecology. 2019; 4:8-14

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10041>

Ежегодно на территории Волгоградской области регистрируются случаи заболевания людей, вызванных арбовирусами. На данный момент установлена

циркуляция вируса лихорадки Западного Нила, вируса Конго-крымская геморрагическая лихорадка (ККГЛ), однако существуют свидетельства циркуляции других арбовирусов, на что указывают обнаружения антител в крови больных, а также множественные случаи сезонных вирусных лихорадок неуточненной этиологии [1].

Стандартные методы мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний, такие как иммуно-серологические методы и ПЦР, позволяют осуществлять идентификацию инфекционных агентов, основываясь на применении готовых тест-систем, содержащих строго специфические антитела к антигенам или праймеры к участкам геномов выявленных и охарактеризованных ранее патогенов. В то время как метагеномное секвенирование позволяет выявлять и получать полногеномные или практически полногеномные последовательности даже неохарактеризованных вирусных патогенов, в том числе из образцов нуклеиновых кислот, выделенных из клинического материала, суспензий членистоногих, а также супернатантов смешанных клеточных культур.

Целью данного исследования являлось установление видовой принадлежности арбовирусов, циркулирующих на территории Волгоградской области, при помощи анализа образцов РНК, выделенных из сыворотки крови лихорадящих больных и супернатанта клеточных культур при помощи метагеномного секвенирования.

План исследования включал в себя этапы выделения тотальной РНК образцов, подготовку библиотек фрагментов, осуществление секвенирования и биоинформатическую обработку данных.

Материалы и методы

Для исследования были отобраны 7 сывороток крови больных, поступивших в референс-центр по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора за период эпидсезона 2018 года, 14 образцов фильтрованного супернатанта культуры клеток Vero, полученных в результате слепого пассажа суспензии комаров рода *Culex*, отловленных на территории Волгоградской области в 2018 году, а также 1 образец фильтрованного супернатанта культуры клеток Vero, полученного в результате пассажа сыворотки крови больного, поступившей в референс-центр в 2018 году.

Тотальная РНК образцов была выделена с использованием наборов Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) и QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN, Германия). Для подготовки библиотек фрагментов использовали методику Moser с соавт., дополненную некоторыми авторскими модификациями [2, 3]. Секвенирование было осуществлено при помощи высокопроизводительного секвенатора MiSeq (Illumina, США). Демультимплексирование и триммирование полученных прочтений осуществляли при помощи Cutadapt v. 1.15 [4]. Фильтрацию данных против референсных последовательностей геномов различных представителей арбовирусов проводили с использованием BWA v. 0.7.17-r1188 [5, 6] и SAM Tools 1.7 [7]. Сборка вирусных геномов *de novo* проводилась ассемблером Spades v3.11.1 [8]. Программные продукты были объединены в конвейер для автоматизированной обработки данных

высокопроизводительного секвенирования при помощи авторских скриптов, реализованных на Python 3.6. Поиск и анализ гомологичных последовательностей геномов выполнен с использованием инструментов локального выравнивания blastn [9] и NCBI Magic-BLAST [10]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев производилось с помощью инструмента CLUSTAL 2.1 [11, 12] с параметрами выравнивания по умолчанию. Визуализация и форматирование готовых филогенетических деревьев осуществлялось при помощи онлайн-инструмента iTOL v.5.

Результаты и обсуждение

В результате анализа данных секвенирования в 18 (5 образцах РНК из сывороток крови и 13 образцах РНК из супернатантов культур клеток) из 22 исследованных проб были обнаружены нуклеотидные последовательности трех сегментов вирусного генома, обладающих высокой гомологией (более 99%) с последовательностями генома изолята вируса Abbey lake orthobunyavirus Cu20-XJ, представленных в международной базе данных GenBank NCBI. На основании высокой степени гомологии последовательностей сегментов геномов был сделан вывод о том, что обнаруженный в результате секвенирования вирус принадлежит к данному виду.

Вирусный изолят Abbey lake orthobunyavirus Cu20-XJ был выделен из пула комаров рода *Culex* в 2014 году на территории северных провинций КНР и принадлежит к роду *Orthobunyavirus*, семейству *Peribunyaviridae*. Нуклеотидные последовательности сегментов геномной РНК (KJ710425, KJ710423, KJ710424) были получены путем их сборки на референсы, в качестве которых были использованы S- и M-сегменты генома вируса Germiston и L-сегмент генома вируса Батаи [13, 14].

Высокая степень гомологии китайского и волгоградского изолятов вируса Abbey lake может указывать на мощное действие отрицательного отбора при слабом действии положительного. Подобная картина является одной из отличительных черт арбовирусов [15], а также косвенно свидетельствует о возможном существовании маршрута завоза данного вируса с перелетными птицами.

По аналогии с китайским изолятом, была проведена аннотация генома волгоградского штамма вируса озера Аббей, организация которого оказалась типичной для представителя рода *Orthobunyavirus*. Геном ортобуньявирусов представлен тремя сегментами: L, M, S, каждый из которых способен формировать псевдокольцевую структуру за счет взаимной комплементарности концевых фрагментов, напоминающую ручку сковороды (panhandle). L- и M-сегменты генома большинства ортобуньявирусов представлены некодирующей (-) оцРНК, в то время как S-сегмент может являться комбинацией смысловой и антисмысловой оцРНК, т.е. амбисмысловой. L-сегмент кодирует репликазу вируса, а также L-белок на N-конце полипептида. M-сегмент кодирует два внешних гликопротеина G1 и G2, а также неструктурный белок NSm. S-сегмент кодирует нуклеокапсидный протеин N на антисмысловом участке цепи и неструктурный белок NSs на фрагменте смысловой цепи [16].

Также был проведен индивидуальный филогенетический анализ последовательностей L-сегмента вирусного генома. В качестве сравнения были использованы последовательности геномов представителей семейства *Peribunyaviridae* из международной базы данных GenBank NCBI (рис.). Нами показано вхождение характеризованного изолята и описанного ранее Abbey lake orthobunyavirus Cu20-XJ совместно в отдельную филогенетическую группу. Более того, при анализе филогенетических данных на основе последовательностей M-сегментов геномов в наиболее близкую к сравниваемым изолятам филогенетическую группу входил вирус Батаи.

Несмотря на то что существуют косвенные свидетельства циркуляции вируса Батаи на территории Волгоградской области [1], необходимо настороженно относиться к положительным результатам серологического мониторинга, поскольку проведенный филогенетический анализ показал высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей вируса Батаи и вируса озера Аббей. Это дает основания рассуждать о возможной кросс-реактивности иммунологических тест-систем для выявления антител к вирусу Батаи в сыворотке крови больных по причине вероятно высокой степени гомологии антигенных детерминант данных вирусных патогенов.

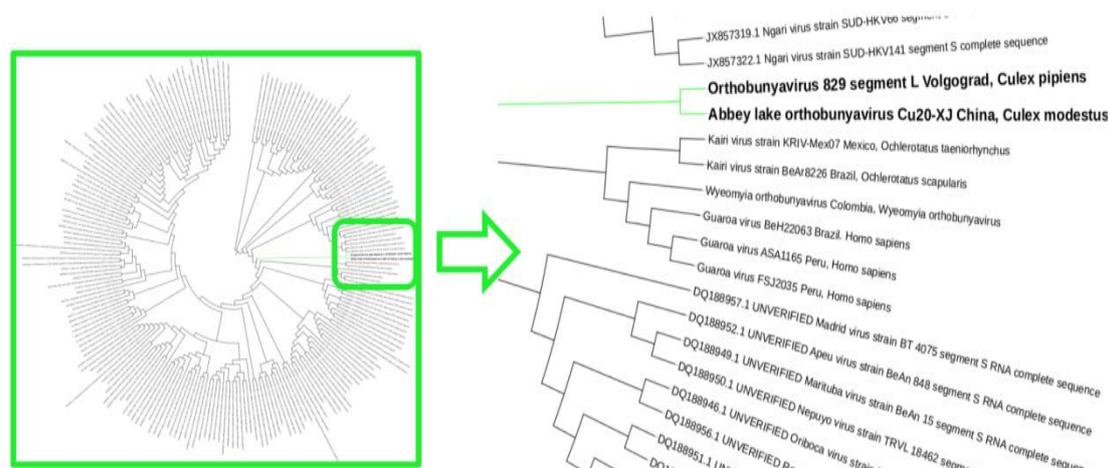


Рис. Филогенетическое дерево, построенное по результатам выравнивания L-сегментов геномов различных представителей семейства *Peribunyaviridae*

Отдельного внимания заслуживает факт совместного обнаружения РНК вируса озера Аббей с РНК вируса западного Нила (ВЗН) в 9 пробах супернатанта клеточной культуры, полученных в результате пассажа суспензии членистоногих, в 2 клинических пробах, тотальная РНК которых была выделена и секвенирована напрямую из сыворотки крови без этапа накопления вируса на клетках, а также в 1 клинической пробе, прошедшей этап выделения и накопления вирусных культур на клеточной линии. Совместное нахождение РНК вируса озера Аббей и ВЗН в клиническом материале и суспензиях комаров само по себе не дает оснований утверждать, что для данных вирусов характерны коциркуляция и коинфицирование. Однако следует отметить, что для некоторых арбовирусов, патогенных исключительно для членистоногих, показана

способность влиять на репликацию ВЗН в слюнных железах комара, используя механизм РНК-интерференции [17].

Таким образом, на территории Волгоградской области впервые выявлена РНК вируса озера Аббей из семейства ортобуньявирусов в комарах рода *Culex*, а также в образцах сыворотки крови больных.

Данные, полученные в ходе исследования, указывают на необходимость дальнейшей оценки циркуляции вируса озера Аббей на территории Российской Федерации и его эпидемиологической характеристики.

Список литературы:

1. Молчанова Е.В., Лучинин Д.Н., Негоденко А.О., Прилепская Д.Р., Бородай Н.В., Коновалов П.Ш. и соавт. Мониторинговые исследования арбовирусных инфекций, передающихся комарами, на территории Волгоградской области. Здоровье населения и среда обитания. 2019;6(315):60-66.
2. Wright M, Stockwell T, Beck E, Busam D, Bajaksouzian S, Jacobs M et al. SISPA-Seq for rapid whole genome surveys of bacterial isolates. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015;32:191-198.
3. Moser L, Ramirez-Carvajal L, Puri V, Pauszek S, Matthews K, Dilley K et al. A Universal Next-Generation Sequencing Protocol To Generate Noninfectious Barcoded cDNA Libraries from High-Containment RNA Viruses. *mSystems*. 2016;1(3).
4. Cutadapt — cutadapt 2.6 documentation [Internet]. Cutadapt.readthedocs.io. 2019 [cited 31 October 2019]. Available from: <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/index.html>
5. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760.
6. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589-595.
7. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079.
8. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov A et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19(5):455-477.
9. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403-410.
10. Boratyn G, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Busby B, Madden T. Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1).
11. Higgins D, Bleasby A, Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Bioinformatics*. 1992;8(2):189-191.
12. Dineen D. Clustal Omega, ClustalW and ClustalX Multiple Sequence Alignment [Internet]. Clustal.org. 2019 [cited 31 October 2019]. Available from: <http://www.clustal.org>
13. Liu R, Zhang G, Yang Y, Dang R, Zhao T. Genome Sequence of Abbey Lake Virus, a Novel Orthobunyavirus Isolated from China. *Genome Announcements*. 2014;2(3)

14. Liu R, Zhang G, Sun X, Zheng Z, Liu X, Zhao Y et al. Isolation and molecular characterization on Abbey Lake Orthobunyavirus (Bunyaviridae) in Xinjiang, China. *Zhonghua liu Xing Bing xue za zhi*. 2014;35(8):939-942.
15. Velazquez-Salinas L, Zarate S, Eschbaumer M, Pereira Lobo F, Gladue D, Arzt J et al. Selective Factors Associated with the Evolution of Codon Usage in Natural Populations of Arboviruses. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0159943.
16. Elliott R. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(10):673-685.
17. Hobson-Peters J, Yam A, Lu J, Setoh Y, May F, Kurucz N et al. A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56534.

References:

1. Molchanova E, Luchinin D, Negodenko A, Prilepskaya D, Boroday N, Konovalov P et al. Monitoring studies of arbovirus infections transmitted by mosquitoes on the territory of the Volgograd Region. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2019;6(315):60-66.
2. Wright M, Stockwell T, Beck E, Busam D, Bajaksouzian S, Jacobs M et al. SISPA-Seq for rapid whole genome surveys of bacterial isolates. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015;32:191-198.
3. Moser L, Ramirez-Carvajal L, Puri V, Pauszek S, Matthews K, Dilley K et al. A Universal Next-Generation Sequencing Protocol To Generate Noninfectious Barcoded cDNA Libraries from High-Containment RNA Viruses. *mSystems*. 2016;1(3).
4. Cutadapt — cutadapt 2.6 documentation [Internet]. [Cutadapt.readthedocs.io](https://cutadapt.readthedocs.io). 2019 [cited 31 October 2019]. Available from: <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/index.html>
5. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760.
6. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589-595.
7. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079.
8. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov A et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19(5):455-477.
9. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403-410.
10. Boratyn G, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Busby B, Madden T. Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1).
11. Higgins D, Bleasby A, Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Bioinformatics*. 1992;8(2):189-191.
12. Dineen D. Clustal Omega, ClustalW and ClustalX Multiple Sequence Alignment [Internet]. [Clustal.org](http://www.clustal.org). 2019 [cited 31 October 2019]. Available from: <http://www.clustal.org>

13. Liu R, Zhang G, Yang Y, Dang R, Zhao T. Genome Sequence of Abbey Lake Virus, a Novel Orthobunyavirus Isolated from China. *Genome Announcements*. 2014;2(3)
14. Liu R, Zhang G, Sun X, Zheng Z, Liu X, Zhao Y et al. Isolation and molecular characterization on Abbey Lake Orthobunyavirus (Bunyaviridae) in Xinjiang, China. *Zhonghua liu Xing Bing xue za zhi*. 2014;35(8):939-942.
15. Velazquez-Salinas L, Zarate S, Eschbaumer M, Pereira Lobo F, Gladue D, Arzt J et al. Selective Factors Associated with the Evolution of Codon Usage in Natural Populations of Arboviruses. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0159943.
16. Elliott R. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(10):673-685.
17. Hobson-Peters J, Yam A, Lu J, Setoh Y, May F, Kurucz N et al. A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56534.

Поступила/Received: 01.11.2019

Принята в печать/Accepted: 05.11.2019