

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-48
УДК 574.24

**ЭВОЛЮЦИОННЫЕ СВЯЗИ ВИРУСА КРЕВЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ
(CRANGON CRANGON FLAVIVIRUS, CCFV) СРЕДИ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ FLAVIVIRIDAE,
ВЫЯВЛЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПОЛИБЕЛКА
МЕТОДОМ НАИБОЛЬШЕЙ ЭКОНОМИИ**

Зимин Андрей Антонович¹, канд. биол. наук
Никулина Александра Николаевна¹, аспирант
Никулин Никита Алексеевич¹, аспирант
Шорохова Анна Павловна¹, канд. биол. наук
Присяжная Наталья Викторовна¹
Назипова Нафиса Наиловна², канд. физ.-мат. наук
Дроздов Анатолий Леонидович³, д-р. биол. наук
Осепчук Денис Васильевич^{4,5}, д-р. с.-х. наук
Кощаев Андрей Георгиевич⁵, д-р. биол. наук, профессор

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, Российская Федерация

²Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, г. Пущино, Российская Федерация

³Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток, Российская Федерация

⁴ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Российская Федерация

⁵ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация

Полибелки вируса креветки обыкновенной и родственных флавириусов были исследованы с помощью метода Maximum Parsimony. Сравнительный анализ полибелков выявил наибольшую близость CCFV к ряду вирусов морских ракообразных и других гидробионтов. Для развития производства этой креветки в акватории Черного моря можно рекомендовать бассейновую аквакультуру с морской водой, стерилизованной УФ-облучением.

Ключевые слова: вирус CCFV; Crangon crangon; полибелок *Flaviviridae*

**EVOLUTIONARY CONNECTIONS OF CRANGON (CRANGON FLAVIVIRUS, CCFV) AMONG THE
CLOSELY RELATED FLAVIVIRIDAE, IDENTIFIED ON THE BASIS OF POLYPROTEIN PHYLOGENET-
IC ANALYSIS BY THE MAXIMUM PARSIMONY METHOD**

Zimin Andrei Antonovich¹, PhD Biol. Sci.
Nikulina Alexandra Nikolaevna¹, PhD student
Nikulin Nikita Alekseevich¹, PhD student
Shorochova Anna Pavlovna¹, PhD Biol. Sci.
Prisyazhnaya Nataliya Victorovna¹,
Nazipova Nafisa Nailovna², PhD Phys. Math. Sci.
Drozдов Anatoly Leonidovich³, Dr. Biol. Sci.
Osepchuk Denis Vasilyevich^{4,5}, Dr. Agr. Sci.
Koshchaev Andrei Georgievich⁵, Dr. Biol. Sci., Professor

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Scriabin RAS - a separate subdivision of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Russian Federation

²Institute of Mathematical Problems of Biology RAS – the Branch of Keldysh Institute of Applied

Mathematics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

³*National Scientific Center of Marine Biology named after A. V. Zhirmunsky FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation*

⁴*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation*

⁵*Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation*

Polyproteins of the Crangon crangon flavivirus and related flaviviruses were investigated using the Maximum Parsimony method. A comparative analysis of the polyproteins revealed the greatest proximity of CCFV to a number of marine crustacean viruses. To develop the production of this shrimp in the Black Sea, a basin aquaculture with sea water sterilized by UV can be recommended.

Key words: CCFV virus; Crangon crangon; *Flaviviridae* polyprotein

Обыкновенная креветка или Crangon crangon L. – коммерчески важный вид. Вирус креветки обыкновенной CCFV может наносить существенный ущерб в аквакультуре этого гидробионта [7, 9]. Эти креветки ловятся в основном в южной части Северного моря, хотя также встречаются в Ирландском, Балтийском и Черном морях, а также у большей части Скандинавии и некоторых частей Марокко Атлантического побережья. Его общие названия включают бурые креветки, обычные креветки, креветки заливов, креветки – кариды или песчаные креветки, а французское название "crevette grise" или его голландский эквивалент "grijze garnaal", а иногда используют и английскую версию названия, серые креветки. Днём они закапываются в песок, прячась от хищников – птиц и рыб, но оставляя на поверхности антенны. Промысловое значение обыкновенной креветки велико. Их добывают в северо-восточной части Атлантического океана и Средиземном море. В средние века отлов велся верхом на лошадях в мелководных заливах рядом с Дуврским проливом. Взрослые особи ранее вырастали в длину 30–50 мм, отдельные особи – до 90 мм. Сейчас ловят в основном более мелких креветок – в среднем около 26 мм. В популярнейшем бельгийском блюде "tomate-crevette" варёные креветки подаются с майонезом и украшаются свежими помидорами. Это блюдо часто используется как закуска к пиву Ламбик [9].

Вирус креветки обыкновенной, CCFV [Crangon crangon flavivirus] относится к семейству *Flaviviridae*. Он, вероятно, является основным паразитом этого животного, снижающим его урожайность в океанических популяциях креветки и аквакультуре. Близкие вирусы человека и животных, флавивирусы, *Flaviviridae*, представляет собой семейство переносимых членистоногими вирусов (ранее классифицированных как арбовирусы группы

В), которые заражают хозяев-млекопитающих, включая человека, через инфицированных комаров или клещей-переносчиков [7]. К этому семейству относятся такие существенные вирусы человека как вирус желтой лихорадки (Yellow fever virus), вирус Денге (Denge virus), вирус лихорадки Западного Нила и ряд других. Геном этих РНК-вирусов семейства *Flaviviridae* содержит одну открытую рамку считывания (ORF), окруженную 5'- и 3'-нетранслируемой областью (NTR). Эта ORF транслируется в один полипротеин либо посредством кэп-зависимой трансляции (флавивирусы), либо посредством трансляции, опосредованной внутренним сайтом посадки рибосом (IRES) (гепаци-вирусы, пегивирусы и пестивирусы) [7].

Вирусный полипротеин процессируется протеазами хозяина и вируса ко- и посттрансляционно в 9–12 зрелых белков, состоящих из структурных белков, включая капсидные или коровые (С) и оболочечные (Е) гликопротеины, а также неструктурные (NS) белки [7]. В настоящее время GenBank содержит более 300 полных полипротеиновых последовательностей представителей серокомплексов ВКЭ, LIV, POWV, OHFV и KFDV. Такой объем выборки позволяет применять различные методы биоинформатической генетики для выявления закономерностей эволюции полибелков при сравнении не полностью обособленных в генетическом плане объектов исследования [9].

Методика исследований. Для анализа эволюционного положения вируса креветки обыкновенной, Crangon crangon flavivirus CCFV мы использовали ряд приемов, опробованных нами ранее при исследовании эволюции денсовирусов и коронавируса [1–5]. Мы решили провести анализ последовательности 51 белка флавивирусов, отобранных из GenBank программой BLASTp [6]. Филогенетический анализ мы проводили программными средствами па-

кета Mega X [10].

Объект исследования, полибелок (номер в ГенБанк QСН00713.1) вируса креветки обыкновенной или коричневой, ССFV [Crangon crangon flavivirus]. Систематика вируса: Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Kitrinoviricota; Flasuviricetes; Amarillovirales; Flaviviridae.

Объект исследования, обыкновенная креветка (лат. *Crangon crangon*) – вид настоящих креветок из семейства *Crangonidae*. Имеет высокое промысловое значение, отлавливается преимущественно в северо-восточной ча-

сти Атлантического океана и Средиземном море.

Результаты исследований. Было проведено сравнение аминокислотной последовательности данного полибелка с базой данных белковых последовательностей Genbank с помощью алгоритма BLASTp [6]. Для анализа аминокислотных последовательностей полибелков мы использовали подходы и методы, описанные нами ранее [1–5]. Было получено эволюционное дерево полибелка вируса креветки и его 50 гомологов. Дерево представлено на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема полибелка флавивирусов. Вертикальными линиями обозначена область структурных белков, горизонтальными – не структурных. Названия белков обозначены внутри прямоугольников и под ними

Один из ближайших на этом дереве полибелков вирусов к белку вируса *Crangon crangon flavivirus*, ССFV, это длинный полипептид из вируса, *Modoc virus* (MODV). Геном вируса *Modoc* имеет длину 10 600 нуклеотидов с одной открытой рамкой считывания, в координатах 110 до 10 234, кодирующий белок длиной 3374 аминокислоты. Выведенный порядок генов этой одиночной открытой рамки считывания С-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (рис.1.) точно такой же, как у других флавивирусов, переносимых комарами и клещами.

Рамка полибелка окружена 5'- и 3'-нетранслируемыми областями (UTR) из 109 и 366 нуклеотидов соответственно. Выравнивание аминокислотной последовательности MODV с последовательностями 20 других флавивирусов выявило несколько областей с высоким сходством последовательностей, соответствующих функционально важным доменам, таким как сериновая протеаза/хеликаза/НТФаза NS3 и метилтрансфераза/РНК-зависимая РНК-полимераза NS5. Разработана модель флавивирусной инфекции у мышей и хомяков с использованием вируса *Modoc*, *Modoc virus* (MODV).

Ближайшая ветвь содержит следующие полибелки. Это белок *Wenzhou shark flavivirus* (флавивирус акулы Вэньчжоу), который явля-

ется вторым флавивирусом морских позвоночных, идентифицированный в ходе метагеномного анализа тихоокеанской лопатоносной акулы *Scoliodon macrorhynchos*. Лопатоносные акулы относятся к группе хрящевых рыб.

Тихоокеанская Жёлтая Остроносая Акула (*Scoliodon macrorhynchos*) является видом из семейства *Carcharhinidae*. Это вид близкий к атлантической Жёлтой Остроносой Акуле (*S. laticaudus*). Эта ветвь содержит также полибелок *Waxsystemes virus*, который заражает термитов и относится к кладе flavi-подобных вирусов.

Также полибелок вируса Эмбий, насекомых с неполным превращением из клады *Polyneoptera*. Полибелок вируса летучих мышей Тамана (TABV, выделенный из летучей мыши *Pteronotus parnellii*) также обнаруживает сходство с вирусом данной креветки, как и белки *Cyclopterus lumpus virus*, вируса пинагора или рыбы-воробья (лат. *Cyclopterus lumpus*) и вируса *Nakiwogo* (NAKV), который был впервые обнаружен в Энтеббе, Уганда (2009 г.), у комаров *Mansonia africanamosquitoes*, а также полибелок *Aedes notoscriptus virus*.

Этот вирус был выделен от шести видов комаров; *Aedes aculeatus*, *Aedes alternans*, *Aedes notoscriptus*, *Aedes procax*, *Aedes vigilax* и *Anopheles annulipes*. Несмотря на явные различия во временной и пространственной актив-

ности STRV с пиками активности в 2006, 2010 и 2013 гг., между изолятами и прототипом STRV 1961 г. была обнаружена гомология последовательностей на уровне 95,9–98,4 %, при том, что внутривидовая гомология была 96,2–100 %. Австралийский садовый комар, *Aedes notoscriptus*, представляет собой сильно урбанизированный вид насекомых, который проник в Новую Зеландию и США [7].

Ae. notoscriptus считается переносчиком вируса реки Росс, распространенного артротогенного арбовируса Австралии, а также экспериментально отмечен как переносчик многих других патогенных вирусов, включая вирусы Западного Нила, желтой лихорадки и вируса Зика.

Наиболее сходным вне этой ветви является полибелок вируса оленьего хомячка, Modoc virus (MODV). Этот вирус впервые был выделен из хомячка *Peromyscus maniculatus* в Калифорнии (округ Модок) в 1958 г. (Джонсон, 1967) и позже также в Орегоне, Монтане, Колорадо и Альберте. Странно, но переносчиков из класса членистоногих пока для этого вируса не было обнаружено. Этот вирус является антигенно и генетически родственными таким вирусам, как вирус Jutiara, вирус Cowbone Ridge, вирус Sal Vieja и вирус San Perlita, выделенных у грызунов Нового Света.

Нейтрализация с использованием образцов крови, выделенных от млекопитающих, пойманных в Альберте и образцы крови людей, живущих в этих районах, указывают на наличие природного бессимптомного заражения [7].

В следующей ветви обнаружены полибелки Kadam virus, Gadgets Gully virus и Karshi virus. Вирус Карши (Karshi virus or KSIV) – представитель рода Флавивирус (Flavivirus), в который входят такие вирусы как Денге вирус (Denge virus), вирус Западного Нила (WNV). Переносчиками вируса являются клещи рода Орнитодорос (*Ornithodoros*), в частности *Ornithodoros papillipes* [7].

Ветвь вируса желтой лихорадки располагается отдельно и содержит в основном полибелки штаммов вирусов желтой лихорадки и вируса болезни Вессельсбронна.

Вирус желтой лихорадки один из наиболее значимых для здоровья человека

Flaviviridae. Считается, что недомогание Ч.Р. Дарвина, столь мешавшее ему работать, задержавшее выход первого издания книги «Происхождение видов путем естественного отбора», длившееся несколько десятилетий и возникшее после посещения им Южной Америки в ходе плавания на корабле «Бигль», было следствием хронического заболевания желтой лихорадкой [7]. Болезнь Вессельсбронна вызывается переносимым комарами вирусом, который может инфицировать ряд видов позвоночных животных, включая человека. Этот вирус широко распространен в Африке, где он вызывает репродуктивные потери и неонатальную смертность у мелких жвачных животных. Воздействие вируса Вессельсбронна на другие виды животных до сих пор неясно; однако у экспериментально инфицированного крупного рогатого скота были описаны случайные репродуктивных потерь [1=7].

Эволюционная история была выведена с использованием метода максимальной экономии (Maximum Parsimony). Индекс согласованности (0,691049), индекс удержания (0,840719) и составной индекс 0,581484 (0,580978) для всех сайтов и сайтов с экономической информацией (в скобках).

Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (500 повторов). MR-дерево было получено с использованием алгоритма Tree-Bisection-Regrafting (TBR) с уровнем поиска 1, в котором исходные деревья были получены путем случайного добавления последовательностей (10 повторов). В этом анализе участвовала 51 аминокислотная последовательность. Были исключены все позиции с охватом сайта менее 30 %, т. е. допускались пропуски выравнивания менее 70 %, отсутствующие данные и неоднозначные базы в любой позиции (опция частичного удаления). Всего в окончательном наборе данных было 3453 позиции.

Эволюционные анализы проводились в MEGA X [8]. Crangon crangon flavivirus обозначен черным треугольником, черными кружками обозначены вирусы патогенные для человека, остальные флавивирусы обозначены белыми кружками.

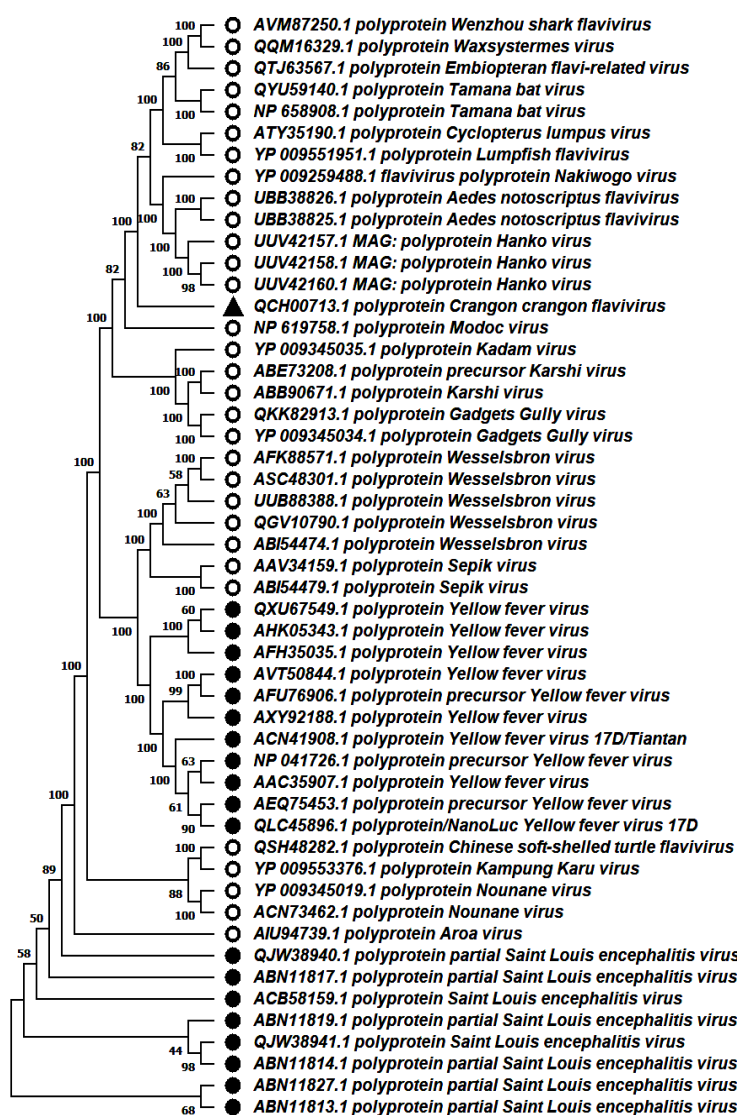


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево 51 полибелка флавивирусов

Заключение и практические рекомендации по производству креветки обыкновенной на черноморском побережье Краснодарского края. Креветка обыкновенная – важный промысловый вид Европы. Около 40000 тонн этого небольшого животного длиной примерно 26 мм ежегодно вылавливается в водах северной Атлантики. Этот вид придонных креветок характерен и для Черного моря. Основной трудностью в аквакультуре этих креветок является отсутствие продуктивного питания и вирусные заболевания [1]. Вирус креветки обыкновенной, SCFV, является представителем семейства Flaviviridae, для которого характерна трансляция одноцепочечного вирусного генома в один полибелок, содержащий как структурные, так и не структурные белки вируса. Сравнительные анализ родственных полибелков выявил наиболь-

шую близость SCFV к вирусам оленьего хомячка и ряду вирусов морских и пресноводных ракообразных семейства Decapoda. Это говорит о возможности достаточно далекого переноса подобных флавивирусов и возможности расширения их круга хозяев, включая представителей самых разнообразных групп членистоногих и млекопитающих. В водах Черного моря обитает достаточно большое число двустворчатых моллюсков и других фильтрующих гидробионтов, которые могут накапливать вирусы. Биоаккумуляция вирусов фильтрующими гидробионтами может оказаться существенной для трансмиссии и расширения круга хозяев у данной группы флавивирусов. С точки зрения развития аквакультуры обыкновенной креветки, Crangon crangon, можно ожидать появления заражения этой культуры другими флавивирусами,

имеющими в качестве хозяев практически любых десятиногих ракообразных. В этом случае можно рекомендовать для производства этой креветки бассейновую аквакультуру с морской водой, стерилизованной УФ-облучением.

Выводы.

1. В ходе исследования мы с помощью метода максимальной экономии (Maximum Parsimony) построили филогенетическое дерево 51 полибелка вирусов близких к гомологу из Crangon crangon flavivirus, CCFV.

2. Наиболее близкими оказались полибелки следующих флавивирусов, Wenzhou shark flavivirus, Waxsystemes virus, Cyclopterus lumpus virus, Modoc virus, а также полибелок вируса летучих мышей Тамана и вируса Эмбий, эволюция которых может привести к появлению новых флавивирусных инфекций обыкновенной креветки.

3. По расположению на дереве можно предположить, что Crangon crangon flavivirus, CCFV не может вызвать зоонозную инфекцию человека, так как многочисленные известные полибелки всех штаммов вирусов желтой лихорадки, Saint Louis encephalitis virus и вируса болезни Вессельсбронна располагаются на достаточно удаленной ветви этого филогенетического дерева.

4. При развитии аквакультуры креветки обыкновенной, Crangon crangon, на морском побережье Краснодарского края можно ожидать появления заражения этой культуры как Crangon crangon flavivirus, так и другими флавивирусами, имеющими в качестве хозяев десятиногих ракообразных. В этом случае желательно использовать бассейновую аквакультуру с морской водой, стерилизованной УФ-облучением, для производства данного объекта.

Список литературы

1. Зимин А. А. Коронавирусы и животноводство / А. А. Зимин, Д. В. Осепчук // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2020. – Том – 9. – № 1. – С. 8 – 14.

2. Зимин А. А. Филогенетика денсовирусов насекомых / А. А. Зимин, Н. Э. Скобликов, Ян Цунги, А. Н. Карманова, Д. В. Осепчук, А. Л. Дроздов, Н. Н. Назипова // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2020. – Том 9. – №

2. – С. 56 – 61.

3. Зимин А. А. Поиск гомологов S2-белка шипиков бычьего коронавируса в метагеномах океана и силоса, и анализ их филогении методом UPGMA / А. А. Зимин, А. Н. Карманова, Д. В. Осепчук // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2020. – Т. 9. – № 1. – С. 14–21.

4. Зимин А. А. Сравнение структурного белка денсовируса BmDENV-1 тутового шелкопряда с белками вирусов бактерий и архей для изучения возможности ложноположительных ответов при ИФА-тестировании гусениц / А. А. Зимин, Н. Э. Скобликов, Н. Н. Назипова, Д. В. Осепчук, А. Г. Кощачев // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. – Краснодар: КубГАУ. – 2020. – № 161. – С. 150-160

5. Зимин А. А. Филогенетический анализ денсовирусов близкородственных clinch вирусу двустворчатых моллюсков отряда Unionida / А. А. Зимин, А. Н. Карманова, Д. В. Осепчук, И. Лу, Н. А. Никулин // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2022. – Т. 11. – № 2. – С. 61–67.

6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

7. Barrows N. J., Campos R. K., Liao K. C., Prasanth K. R., Soto-Acosta R., Yeh S. C., Schott-Lerner G., Pompon J., Sessions O. M., Bradrick S. S., et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. Chem. Rev. 2018, vol. – 118. – P. 4448–4482. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00719.

8. Bondaryuk A.N., Kulakova N.V., Potapova U.V., Belykh O.I., Yudincheva A.V., Bukin Y.S. Genomic Determinants Potentially Associated with Clinical Manifestations of Human-Pathogenic Tick-Borne Flaviviruses. Int J Mol Sci. 2022 Nov 2;23(21):13404. doi: 10.3390/ijms232113404.

9. ICES. 2016 Interim Report of the Working Group on Crangon Fisheries and Life History (WGCRAN), 23–25 May 2016, Oostende, Belgium. ICES CM 2016/SSGEPD:07. 33 pp.

10. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547–1549.