

А.Б. Сейдалина¹, А.И. Кыдырманов¹, К.О. Карамендин¹,
Е.Т. Касымбеков¹, Е.Я. Хан¹, К.Д. Даулбаева¹,
С.А. Сулейменова¹, М.О. Есентуреева¹, М.Х. Саятов¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

ПТИЧИЙ ОРТОАВУЛАВИРУС АPMV-13/БЕЛОЛОБОЫЙ ГУСЬ/ СЕВЕРНЫЙ КАЗАХСТАН/5751/2013, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Аннотация. В октябре 2013 г. из клоакального смыва белолобого гуся обитающего в системе озер Северо-Казахстанской области был выделен инфекционный агент с гемагглютинирующим титром 1:512 и инфекционностью 7,6 Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Идентификация гемагглютинирующего агента в ПЦР с праймерами к консервативным участкам L-гена, позволила отнести его к семейству Paramyxoviridae. Методом секвенирования фрагмента L-гена и последующего BLAST-анализа показана циркуляция в популяциях диких птиц Казахстана нового ранее неизвестного серотипа парамиксовируса птиц. Проведено полногеномное секвенирование казахстанского изолята APMV-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013. Определена последовательность генов: 3'-NP-P/V/W-M-F-HN-L-5', кодирующих восемь белков, характерных для парамиксовирусов птиц. Филогенетические исследования показали, что казахстанский изолят APMV-13 является новым природным вариантом, значительно отличающимся от других вирусов этого серотипа.

Ключевые слова: штамм, парамиксовирус, серотип, популяция, дикие птицы, ПЦР.

...

Түйіндеме. Солтүстік Қазақстан облысындағы көлдер жүйесіндегі ақмандайлы қаздың клоака шайындысынан 2013 жылдың қазан айында 1: 512 гемагглютиндік титрі бар және 7,6 Ig ЭИД₅₀/0,2 мл инфекциясымен жұқпалы агент бөлінген. Гемагглютиндеуші агенттерді ПЦР-да L-генінің консервативті учаскелеріне арналған праймерлермен анықтау, оның Paramyxoviridae тұқымдасына енетінін анықтауға мүмкіндік берді. L-гені фрагментін тізбектеу әдісімен және BLAST-талдау арқылы Қазақстанның жабайы құстар популяциясында, құс парамиксовирустарының белгісіз жаңа серотипінің айналымда болғандығын көрсетті. Қазақстандық APMV-13/ақмандайлы қаз/ Солтүстік Қазақстан/5751/2013 толық геномдық тізбектеу жүргізілді. Құс паримиксовирусына тән сегіз ақуызды кодтайтын гендердің реттілігі анықталды: 3'-NP-P V/W-M-F-HN-L-5'. Филогенетикалық зерттеулер көрсеткендей, қазақстандық құстардың APMV-13 осы серотиптің басқа вирустарынан айтарлықтай ерекшеленетін жаңа табиғи нұсқа болып табылады.

Түйінді сөздер: штамм, парамиксовирус, серотип, популяция, жабайы құстар, ПЦР.

Abstract. In October 2013, an infectious agent with a hemagglutinating titer of 1: 512 and an with infectiousness of 7,6 lg EID₅₀ / 0.2 ml was isolated from the cloacal swab of a white-fronted goose in the lake system of the North Kazakhstan region Kazakhstan. The identification of the hemagglutinating agent in PCR with primers for the conserved regions of the L gene allowed us to attribute it to the Paramyxoviridae family. The method of sequencing a fragment of the L-gene and subsequent BLAST analysis showed the circulation of a novel previously unknown Avian orthoavulavirus 13 (APMV-13) in populations of wild birds of Kazakhstan. We carried out genome sequencing of the Kazakh isolate APMV-13/ white-fronted goose / Northern Kazakhstan / 5751/2013. The sequence of genes was determined: 3'-NP-P/ V / W-M-F-HN-L-5', which encodes eight proteins distinctive to Avian orthoavulavirus. Phylogenetic studies have shown that the Kazakh Avian orthoavulavirus 13 (APMV-13) is a novel natural variant, significantly different from other species.

Keywords: strain, paramyxovirus, serotype, population, wild birds, PCR.

Введение. Парамиксовирусы (ПМВ) птиц – РНК-содержащие вирусы, образующие подсемейство Avulavirus относящееся к семейству Paramyxoviridae, способны вызывать заболевания с различными клиническими проявлениями у большинства видов диких и домашних птиц. Согласно новой классификации Авулавирuсы на основе филогенетических различий делятся на три рода - Orthoavulavirus, Metaavulavirus, Paraavulavirus. У рода Авулавирuсы к концу 2014 г. было известно двенадцать серотипов APMV-1-APMV-12 [1-4]. В 2015-2017 гг. появились сообщения об обнаружении семи новых авулавирuсов: у диких гусей в Японии [5], в Казахстане [6] и в Украине [7]; у уток в Японии [8], Корею [9] и у кулика в Бразилии [10]. Эти данные свидетельствуют о том, что ПМВ активно циркулируют в дикой орнитофауне и существует высокая вероятность возникновения других его серотипов. В Казахстане на протяжении многих лет эколого-вирусологические исследования ПМВ проводятся в Институте микробиологии и вирусологии КН МОН РК с 2019г. Большое количество штаммов вируса болезни Ньюкасла изолировано от домашних, синантропных (домовой и полевой воробей, серая ворона, сорока) и диких птиц (диких голубей) во время их массовой гибели [11, 12]. В целом в республике ПМВ серотипов 4, 6, 8 и 13 удалось изолировать от 11 видов диких птиц. В морфологическом отношении все ПМВ представляют собой плеоморфные, оболочечные вирионы с отрицательными, одноцепочечными РНК-геномами, размерами от 15 до 19 тыс. пар оснований. В их структуре последовательно связаны 6-10 генов, которые

кодируют синтез 7 - 12 белков [13]. Репликация РНК осуществляется в соответствии с «правилом шести», то есть длина генома у всех представителей подсемейства *Paratubulavirinae* кратна шести парам нуклеотидов, при таких соотношениях обеспечивается наиболее компактная и оптимальная в функциональном отношении упаковка полинуклеотидов [14,15]. Гены ПМВ птиц расположены в следующем порядке: 3'→N (нуклеокапсид)→Р (фосфопротеин)→М (матриксный белок)→F (белок слияния)→HN (гемагглютинин-нейраминидаза)→L (большой полимеразный протеин)-5'. Исключение составляет ПМВ-6, у которого имеется дополнительный ген небольшого гидрофобного белка (SH). Белки F и HN образуют шипообразные структуры вирусной оболочки, против которых образуются нейтрализующие и протективные антитела. Р-ген также кодирует синтез еще двух дополнительных белков (V и W) [16].

Цель работы заключается в вирусологической и молекулярно-генетической характеристике нового ПМВ (APMV-13), выделенного от дикой птицы в Казахстане, рекомендуемого в качестве диагностического препарата при индикации возбудителей APMV-13 инфекций у птиц и специфических антител к ним.

Методы исследований. Для вирусологических исследований собраны пробы в виде клоакальных, трахеальных смывов и помёт от птиц водного и околоводного комплексов. Пробы до вирусологических исследований хранили в жидком азоте (-196°C). Изоляцию вирусов проводили путем инокуляции каждой пробы исследуемого материала в аллантаоисную полость трех 9-10 -дневных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) и последующей инкубации при температуре 37°C в течение 72 ч. Аллантаоисную жидкость на наличие вируса проверяли в реакции гемагглютинации (РГА) микрометодом с использованием 0,75% суспензии куриных эритроцитов. Инфекционный титр вирусов вычисляли по методу L. Reed и H. Muench [17] и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Типовую принадлежность изолятов APMV птиц устанавливали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) [18] с набором поликлональных диагностических сывороток к вирусам серотипов 1-9: Иммунные сыворотки предоставлены Национальной референс-лабораторией по вирусу болезни Ньюкасла, института Фридриха-Лэффлера, Insel Riems, Германия. Изолят APMV птиц клонировали методом предельных разведений, путем заражения РКЭ в разведениях от 10⁻¹ до 10⁻⁷. Титры вирусосодержащей аллантаоисной жидкости в РГА при разведении 10⁻⁷ составили 1:128 – 1:512. Выделе-

ние РНК вирусов проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК экстрагировали из 140 мкл клинических образцов и элюировали в окончательном объеме 50 мкл.

Обратную транскрипцию – полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) проводили на основе одностадийного протокола с помощью набора AccessQuick One-Step RT-PCR Kit (Qiagen Германия) в соответствии с инструкциями производителя с применением праймеров Pan-PMV, к консервативному фрагменту L-гена [14]. Идентификацию вирусов проводили путём секвенирования фрагмента L-гена на автоматическом 8-капиллярном секвенаторе ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) и последующим BLAST-анализом последовательностей. Вирусный геном секвенировали на приборе HiSeq (Illumina, США). В качестве матрицы применяли синтезированную двухцепочечную кДНК с набором RiboClone (Promega, США). Выравнивание и филогенетический анализ секвенированных генов с нуклеотидными последовательностями из GenBank проводили с помощью компьютерной программы MEGA 6.0 методом присоединения соседей на основании 500 выборок, модель Tamura-Nei.

Основные результаты. Проведён вирусологический скрининг 43 образцов архивных материалов (клоакальные и трахеальные смывы), собранных в 2013 г. в системе озер Северо-Казахстанской области от диких птиц водного и околководного комплексов, относящихся к семействам Утиные (Anatidae). В результате первичного заражения пробами на РКЭ из клоакальных смывов выделено четыре ГАА, три от белолобого гуся и один от шилохвости с титрами в РГА 1:256 - 1:512, 7,6 Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Изоляты клонировали методом предельных разведений на РКЭ в разведениях от 10⁻¹ до 10⁻⁷. Титры вирусодержащей аллантаоисной жидкостей в РГА при разведении 10⁻⁶ составил 1:128-1:512. В таблице 1 представлены результаты РТГА новых изолятов АРМВ с гомологичными и референсными диагностическими сыворотками.

Как видно из таблицы все четыре казахстанских изолята ПМВ, в том числе АРМВ-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013 в титре 1:320 взаимодействовали с гомологичными иммунными сыворотками и не реагировали или же реагировали в низких титрах с референсными сыворотками к вирусам серотипов 1-9. Секвенирование продуктов амплификации L-гена и последующий BLAST-анализ в GenBank консервативного фрагмента L-гена этих изолятов указа-

ли на значительное генетическое расхождение с ранее известными в науке серотипами ПМВ (Рисунок 1), что позволило предположить о циркуляции на территории Казахстана нового ранее неизвестного геотипа ПМВ.

Таблица 1 - Результаты РТГА казахстанских изолятов АРМВ от диких птиц с кроличьими гипериммунными и референсными сыворотками

Изолят	Иммунная сыворотка к штамму:									APMV-13/ WFG / North KZ/5751/ 2013
	АРМВ-1	АРМВ-2	АРМВ-3	АРМВ-4	АРМВ-5	АРМВ-6	АРМВ-7	АРМВ-8	АРМВ-9	
APMV-13/WFG*/ North Kazakhstan /5750/2013	80	0	0	0	0	0	0	0	40	320
APMV-13/ WFG / North Kazakhstan /5751/2014	80	0	0	0	0	0	0	0	40	320
APMV-13/ WFG / North Kazakhstan /5753/2014	80	0	0	0	0	0	0	0	40	320
APMV-13/pintail/ North Kazakhstan /5759/2014	80	0	0	0	0	0	0	0	40	320

Примечание: * white-fronted goose

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Avian paramyxovirus 12 isolate Woonen/taiv2920_1/2005, complete genome	289	289	91%	3e-74	73%	KC333050.1
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus isolate chicken/BYP/Pakistan/2010, complete genome	143	143	91%	2e-30	67%	JN682210.1
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus isolate NDV/2K35/CH/TN/2003, complete genome	140	140	91%	3e-29	67%	KF740478.1
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus strain cormorant/US/WV/18719-03/USGS/2003, partial genome	140	140	91%	3e-29	67%	GQ288388.2
<input type="checkbox"/> Pigeon paramyxovirus 1 strain PPMV-1/Belgium/03-05343/2003, partial genome	138	138	66%	1e-28	70%	JX901118.1
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus isolate chicken/CP/Pakistan/2010, complete genome	134	134	91%	1e-27	67%	JN682211.1
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus isolate 2009_Mali_ML009, complete genome	132	132	83%	4e-27	67%	JF966387.1
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus strain chicken/Sukorejo/019/10, complete genome	131	131	91%	2e-26	66%	HQ697255.1
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus strain cormorant/US/CA/V92-23071/1997, partial genome	131	131	91%	2e-26	67%	GQ288388.2
<input type="checkbox"/> Newcastle disease virus strain cormorant/Canada/95DC2345/1995, partial genome	131	131	91%	2e-26	67%	GQ288384.2

Рисунок 1 – BLAST-анализ нуклеотидных последовательностей неидентифицированного казахстанского изолята АРМВ-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013

При анализе неидентифицированного изолята APMV-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013 выявлено наибольшее сходство (73%) его по L-гену с недавно выделенным ПМВ серотипа 12 [19,20], с остальными вирусами из GenBank индекс дивергенции составил более 33%, что позволило предположительно отнести этот штамм к новому серотипу. На рисунке 2 представлены нуклеотидные последовательности всех шести генов ПМВ-13 (3'-NP-P/V/W-M-F-HN-L-5'), кодирующих восемь белков: NP (493 аминокислотных остатка (ao), P (397 ao), V (241 ao), W(150 ao), M (366 ao), F (545 ao), HN (549 ao), и L (2,199 ao).

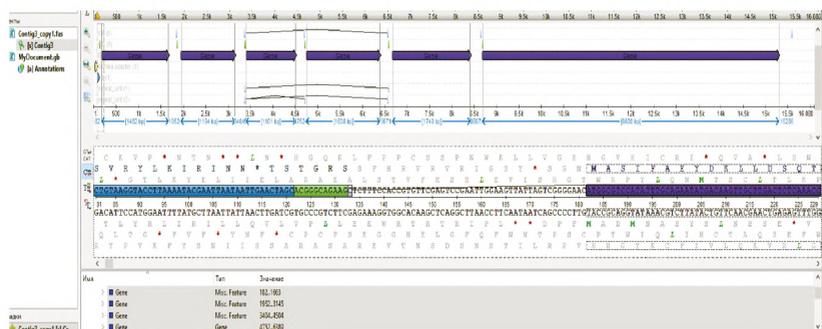


Рисунок 2 – Вид полного секвенированного генома APMV-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013 в программе UGENE.

В результате определения нуклеотидной последовательности с помощью секвенатора нового поколения HiSeq 3000 (Illumina) и последующего BLAST-анализа выявлена принадлежность изолята к ПМВ нового 13 серотипа. В соответствии с этим изолят получил обозначение APMV-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013. Филогенетический анализ генов нового казахстанского ПМВ в сравнении с другими из международной базы данных GenBank, представленные на рисунке 4 показал, что казахстанский изолят APMV-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013 вместе с ПМВ серотипов 1, 9, 12 и 16 образовал отдельную монофилетическую группу, состоящую из представителей рода Orthoavulavirus внутри которого наиболее филогенетически близким оказался ПМВ-12, выделенный в 2012 г. в Италии.

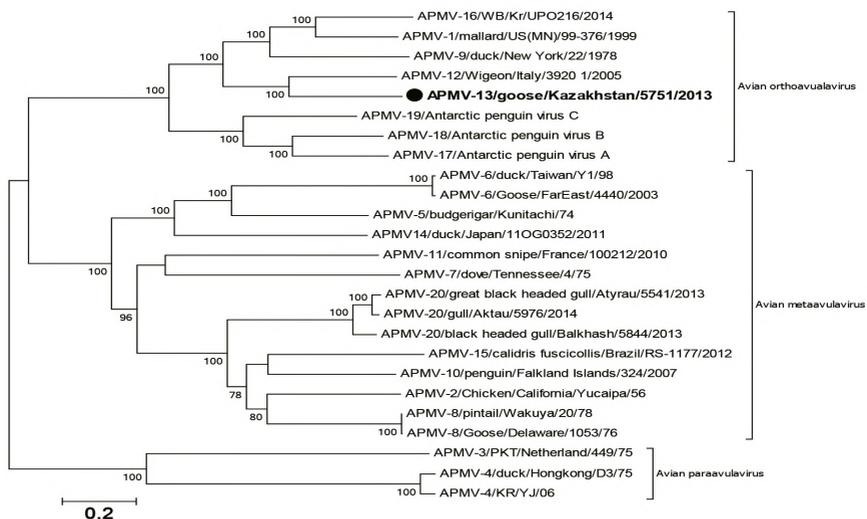


Рисунок 4 – Филогенетические взаимоотношения нового парамиксовируса APMV-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013 с другими парамиксовирусами птиц

Заключение. Таким образом, в результате проведенных молекулярно-генетических исследований, подтверждены данные о циркуляции в Казахстане нового для мировой науки ПМВ серотипа 13 (по новой таксономической классификации от 2017 г.). Полученный штамм APMV-13/white-fronted goose/North Kazakhstan/5751/2013 обладает специфической иммуногенностью, позволяющей использовать его в качестве диагностического препарата для выявления антител к ПМВ в сыворотках крови птиц при естественной инфекции. Новый штамм депонирован и хранится в коллекции микроорганизмов РГП на ПХВ «НИИПБ» КН МОН РК (регистрационный номер М-9-16/D от 21.12.2016).

Список литературы

- 1 Alexander D. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections // In.: Diseases of Poultry. – Ames, IA: Iowa State Press, 2003. – 1248 p. PMID: 10935273 (in Eng)
- 2 Miller P., Afonso C., Spackman E. et al. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the

Falkland Islands // *Journal of Virology*. - 2010. - № 84. - P. 11496-11504. DOI: 10.1128/JVI.00822-10 (in Eng)

3 Briand F., Henry A., Massin P., Jestin V. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus // *Journal of Virology*. - 2012. - № 86. - P. 7710. DOI: 10.1007/s00705-017-3588-6 (in Eng)

4 Terregino C., Aldous E., Heidari A. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). // *Archives of Virology*. - 2013. - № 158. - P. 2233-2243. DOI: 10.1007/s00705-013-1735-2 (in Eng)

5 Yamamoto E, Ito H, Tomioka Y, Ito T Characterization of novel avian paramyxovirus strain APMV/Shimane67 isolated from migratory wild geese in Japan. *J Vet Med Sci*. 2015; 77:1079-1085. DOI: 10.1292/jvms.14-0529 (in Eng)

6 Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A. Asanova S, Sayatov M, Kasymbekov E, Khan E, Daulbayeva K, Harrison SM, Carr IM, Goodman SJ, Zhumatov K. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus (APMV-13) Isolated from a Wild Bird in Kazakhstan // *Genome Announc*. May/June 2016 vol. 4 no. 3 e00167-16 DOI: 10.1128/genomeA.00167-16. DOI: 10.1128/genomeA.00167-16 (in Eng)

7 Goraichuk I, Sharma P, Stegnyy B, Muzyka D, Pantin-Jackwood MJ, Gerilovych A, Solodiankin O, Bolotin V, Miller PJ, Dimitrov KM, Afonso CL. Complete genome sequence of an avian paramyxovirus representative of putative new serotype 13. *Genome Announc*. 2016; 4(4): e00729-16. DOI: 10.1128/genomeA.00729-16 (in Eng)

8 Thampaisarn R, Bui VN, Trinh DQ, Nagai M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Gronsang D, Le DH, Ogawa H, Imai K. Characterization of avian paramyxovirus serotype 14, a novel serotype, isolated from a duck fecal sample in Japan // *Virus Res*. 2017 Jan 15; 228:46-57. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.11.018 (in Eng)

9 Thomazelli LM de Araujo J, Fabrizio T, Walker D, Reischak D, Omotto T, et al. Novel avian paramyxovirus (APMV-15) isolated from a migratory bird in South America. *PLoS ONE*. 2017; 12(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0177214 (in Eng)

10 Neira V, Tapia R, Verdugo C, Barriga G, Mor S, Ng TFF, García V, Del Río J, Rodrigues P, Briceño C, Medina RA, González-Acuña D. Novel Avulaviruses in Penguins Antarctica. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(7): 1212-1214. DOI: 10.3201/eid2307.170054 (in Eng)

1 Бутакова И.Ш., Жуматов К.Х., Даулбаева К.Д., Саятов М.Х. Характеристика казахстанских изолятов парамиксовирусов птиц серотипа 1 // *Вестник МН-АН РК*. - 1997. - № 4. - С. 15-19.

12 Бейсембаева Р.У., Саятов М.Х., Даулбаева К.Д. и др. Вирусологическое и серологическое обследование диких птиц в г. Алма-Ате и ее окрестностях // В кн.: *Экология вирусов*. - Москва, 1982. - С. 147-151. Alexander D. Avian Paramyxoviruses // *Vet. bullet*. - 1980. - Vol. 50. - P. 737-752.

13 Lamb R., Paterson R., Jardetzky T. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures // Virology. - 2006. - Vol. 344. P. 30–37.

14 Calain P., Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. J Virol. - 1993. Vol. 67. - P. 4822–4830.

15 Kolakofsky D., Pelet T., Garcin D. et al. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited // J Virol. - 1998. - Vol. 72. - P. 891–899.

16 Kim S-H., Xiao S., Shive H., Collins P. et al. Replication, Neurotropism, and Pathogenicity of Avian Paramyxovirus Serotypes 1–9 in Chickens and Ducks // PLoS

17 Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints// J. Amer. Hyg. - 1938. - Vol.27. - P. 493–497.

18 Shengqing Y., Kishida N., Ito H. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens // Virology. - 2002. - № 301. - P. 206–211. PMID: 12359423 (in Eng).

19 Tong S, Chern Shur-Wern Wang, Li Y, Pallansch M, Anderson LJ. Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses. J Clin Microb. 2008; 46(8):2652–2658. DOI: 10.1128/JCM.00192-08 (in Eng)

20 Shengqing Y., Kishida N., Ito H. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens // Virology. - 2002. - № 301. - P. 206–211. PMID: 12359423 (in Eng).

Сейдалина А.Б. - научный сотрудник, магистр биологии, e-mail: luckyai@list.ru

Кыдырманов А.И. - заведующий лаборатории, доктор ветеринарных наук, e-mail: kydyrmanov@yandex.kz

Карамендин К.О. - главный научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: kobey.karamendin@gmail.com

Касымбеков Е.Т. - научный сотрудник, магистр ветеринарии, e-mail: kasymbek.ermuxan@mail.ru

Хан Е.Я. - научный сотрудник, магистр ветеринарии, e-mail: lizaveta4ka@list.ru

Даулбаева К.Д. - старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: daulbaeva47@mail.ru

Сулейменова С.А. - младший научный сотрудник, бакалавр ветеринарной медицины, e-mail: suleymenova.87@inbox.ru

Есентуреева М.О. - лаборант, магистр ветеринарии, e-mail: meruert-e@mail.ru

Саятов М.Х. - доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК, e-mail: ecovir@nursat.kz