

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.25.29

С.Е.Асанова¹, А.И.Кыдырманов¹, К.О.Карамендин¹,
Е.Т.Касымбеков¹, К.Д.Даулбаева¹, К.Х.Жуматов¹, Е.Я.Хан¹,
М.Х.Саятов¹

¹ Институт микробиологии и вирусологии, г. Алматы, Казахстан

НОВЫЙ ШТАММ ПАРАМИКСОВИРУСА ПТИЦ СЕРОТИПА 6 КРАСНОНОСЫЙ НЫРОК/БАЛХАШ /5842/2013 ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ*

Аннотация. Приведены результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств нового штамма парамиксовируса птиц серотипа 6 красноносый нырок/Балхаш/5842/2013, отличающегося от эталонных и ранее выделенных вариантов этого серотипа. При вирусологическом исследовании выделен гемагглютинирующий агент, который идентифицирован как ПМВ-6. При молекулярном анализе нуклеотидной последовательности F-гена данного штамма выявлено генетическое расхождение выделенного изолята от эталонных и ранее выделенных штаммов ПМВ-6. Слабая патогенность, обеспечиваемая наличием аминокислотной последовательности PEPR↓L в составе сайта расщепления белка слияния F, позволяет рекомендовать его для использования в качестве диагностикума в практических вирусологических лабораториях при расшифровке этиологии энзоотических вспышек парамиксовирусов и оценке напряженности популяционного иммунитета у домашних и диких птиц. Выявленные отличия казахстанского штамма ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 от референсного (APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977) и других штаммов ПМВ-6 указывают на наличие нового природного варианта.

Ключевые слова: красноносый нырок, штамм парамиксовируса, парамиксовирус серотипа 6, сыворотка иммунная, анализ филогенетический, дикая птица.

**Источник финансирования исследований: РГП на ПХВ "Институт микробиологии и вирусологии" КН МОН РК, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103.*

Түйіндеме. Парамиксовирустар серотиптерінің ертеректе бөлінген нұсқаларынан және эталондық нұсқасынан ерекшеленетін парамиксовирус-6/қызылтұмсық сұңгуір/Балқаш//5842/2013 жаңа штамының биологиялық және молекулалы-генетикалық қасиеттері зерттелді. F бірігу ақуызының ыдырау сайтының құрамында PEPR↓L аминқышқылды тізбегінің болуын қамтамасыз ететін патогендігі төмен қасиеті, оны тәжірибелік вирусология зертханаларында парамиксовирустардың энзоотиялық этиологиясын анықтауда диагностика ретінде қолдануға, сонымен қатар түз және үй құстарының популяциялық иммунитетінің деңгейін бағалау үшін ұсынуға болады. Анықталған айырым қазақстандық штамм ПМВ-6/красноносый нырок/Балқаш/5842/2013 референсного (APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977) және басқа да штамдарының ПМВ-6 көрсетеді болуы жаңа табиғи нұсқасы.

Түйінді сөздер: красноносый нырок, парамиксовирус штамм, 6 серотипты парамиксовирус, иммундық қан сары суы, филогенетикалық анализ, диагностика, түз құсы.



Abstract. The results of studying the biological and molecular genetic properties of the new avian paramyxovirus of serotype 6 Red-crested pochard/Balkhash/5842/2013, differing from the reference and previously identified variants of this serotype are presented. The weak pathogenicity provided by the amino acid sequence PEPR↓L in the cleavage site of the F fusion protein allows to recommend it for use as a diagnosticum in practical virological laboratories when revealing the etiology of enzootic outbreaks of paramyxoviruses and assessing the intensity of population immunity in domestic and wild birds. Differences of the Kazakhstan strain of PMV-6/red-crested pochard/Balkhash/5842/2013; reference (APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977) and other strains of PMV-6 indicate the existence of a new natural option.

Key words: wild bird, strain of the paramyxovirus, serotype 6 paramyxovirus, immune serum, phylogenetic analysis, diagnosticum.

Введение. Парамиксовирусы (ПМВ) птиц образуют род Avulavirus семейства Paramyxoviridae и способны вызывать заболевания с различными клиническими проявлениями более чем у 200 видов диких и домашних птиц. До недавнего времени на основании серологических различий внутренних вирионных белков они разделялись на 9 серотипов (ПМВ-1 – ПМВ-9) [1].

В 2010 г. P.J.Miller et al. [2] от пингвинов на Фолклендских островах выделили ПМВ, который по аминокислотной последовательности 6 структурных белков был близок к ПМВ-6 и ПМВ-8, но филогенетически оказался достаточно дивергентным и поэтому отнесен к самостоятельному 10 серотипу. Позднее во

Франции от обыкновенного бекаса изолирован ПМВ-11, характерной особенностью которого явился наибольший среди вирусов данного рода геном [3].

В последние годы семейство Paramyxoviridae пополнилось новыми серотипами вируса (ПМВ-12- ПМВ-15), выделенными от различных видов диких птиц [4-7].

В Казахстане на протяжении многих лет эколого-вирусологические исследования ПМВ проводятся в Институте микробиологии и вирусологии КН МОН РК. Большое количество штаммов вируса болезни Ньюкасла, относящихся к ПМВ-1, изолированы от домашних, синантропных (домовой и полевой воробей, серая ворона, сорока) и диких птиц, а в феврале 2005 г. – от диких голубей во время их массовой гибели [8,9]. В целом в республике ПМВ серотипов 4, 6 и 8 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 тысяч пар оснований. В их структуре последовательно связаны 6-10 генов, кодирующих синтез 7-12 белков [10]. Репликация РНК осуществляется в соответствии с "правилом 6", т. е. длина генома у всех представителей подсемейства Paramyxovirinae кратна 6 парам нуклеотидов. При таких соотношениях обеспечивается наиболее компактная и оптимальная в функциональном отношении упаковка полинуклеотидов [11,12].

Гены ПМВ птиц расположены в следующем порядке: 3'→N (нуклеопротеин)→P (фосфопротеин)→M (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 шипоподобные структуры вирусной оболочки, против которых образуются нейтрализующие антитела. P-ген также кодирует синтез еще двух дополнительных белков (V и W) [13].

В международной базе данных GenBank имеется 6 полных нуклеотидных последовательностей ПМВ серотипа 6 из разных

стран. Длина генома референсного APMV-6/duck/HongKong/18/199/1977 и трех других штаммов (APMV-6/duck/Taiwan/Y1/1998, APMV-6/goose/FarEast/4440/2003, APMV-6/mallard/Jilin/127/2011) составляет 16236 нуклеотидов. В то время как у штаммов APMV-6/red-necked stint/Japan/8KS0813/2008 и APMV-6/duck/Italy/IT4524-2/2007 она равнялась 16230 нуклеотидам. Различие в 6 нуклеотидов связано с их делецией у 2-х штаммов на концевом участке нетранслируемой области F гена. Все эти вирусы соответствуют "правилу 6", установленному для ПМВ.

В 2013 г. в Балхашском районе (устье р. Или) Алматинской области РК из клоакального смыва красноносого нырка изолирован гемагглютинирующий агент. Идентификация в ПЦР с праймерами к консервативным участкам L-гена, общими для всех ПМВ, позволила отнести его к этому семейству.

Дальнейшее секвенирование полученных ПЦР-продуктов амплификации L-гена и BLAST-анализ в GenBank указали на принадлежность этого вируса к ПМВ-6. В соответствии с этим изолят получил обозначение ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения биологических, антигенных и молекулярно-генетических свойств нового штамма ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 с целью использования его при диагностике возбудителей ПМВ-6 инфекций у птиц и специфических антител к ним.

Методы исследования. Для вирусологических исследований собраны пробы в виде клоакальных, трахеальных смывов от птиц водного и околоводного комплексов. Смывы собирали стерильным ватным тампоном, помещали во флаконы со средой 199, содержащей комплекс антибиотиков (пенициллин 2000 ед./мл, стрептомицин 2 мг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, нистатин 50 ед./мл) и бычий сывороточный альбумин (0,5 %/л). Для помета и клоакальных смывов концентрацию антибиотиков увеличивали в 5 раз. Пробы до вирусологических исследований хранили в жидком азоте (-196 °С).

Изоляцию и восстановительные пассажи проводили путем инокуляции каждой пробы исследуемого материала в алланта-

исную полость трех 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионов с последующей инкубацией при температуре 37 °С в течение 72 ч. Аллантаоисную жидкость на наличие вируса проверяли в реакции гемагглютинации (РГА) микрометодом с использованием 0,75 %-ной суспензии куриных эритроцитов. Инфекционный титр вирусов вычисляли по методу L. Reed и H. Muench [14] и выражали в Ig ЭИД₅₀ /0,2 мл.

Вирус-содержащую аллантаоисную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 об./мин. в течение 10 мин. при 4 °С. Затем вирус концентрировали путем центрифугирования при 29000 об./мин. в течение 180 мин. при 4 °С. Полученный осадок вируса ресуспендировали в минимальном объеме буфера, после чего определяли гемагглютинирующую активность.

Получение гипериммунных сывороток

Иммунные сыворотки к казахстанскому штамму ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 получали путем двукратной иммунизации кроликов массой 2,5-3 кг очищенным и концентрированным вирусным материалом. Первую иммунизацию проводили подкожно в область шейных и подколенных лимфатических узлов путем 15-20-точечных инъекций очищенного и концентрированного антигена (100 мкг) в смеси с полным адъювантом Фрейнда (Sigma, Co. St. Louis, USA). Повторную иммунизацию проводили через 3 недели, вводя животным подкожно (с адъювантом) и внутривенно (без адъюванта) равное количество антигена. Кровь у животных забирали из краевой вены уха через 14 дней после повторной иммунизации. Сыворотку распределяли по ампулам и хранили при – 20 °С.

Выделение РНК из биологических образцов

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

Получение кДНК из РНК парамиксовирусов

кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием универсального праймера random hexamer.

Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция
ОТ-ПЦР проводили с использованием праймеров к консервативному фрагменту L-гена, общему для всех ПМВ.

Реакцию проводили в термоциклере Eppendorf Gradient при следующих параметрах: обратная транскрипция при 48 °С 45 мин., начальная – 2 мин., денатурация при 95 °С и амплификация в 30 циклов, включающая денатурацию (94 °С, 30 с), отжиг праймеров (55 °С, 30 с) и удлинение цепи (72 °С, 30 с) с последующей окончательной элонгацией при 72 °С, 10 мин.

Секвенирование продуктов ПЦР по Сенгеру

Секвенирование ДНК проводили с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов на автоматическом 8-капиллярном секвенаторе ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Секвенирование нового поколения

Для секвенирования вирусной РНК на приборе MiSeq (Illumina, США) в качестве матрицы использовали синтезированную с применением набора RiboClone (Promega, США) двухцепочечную кДНК. Для фрагментации кДНК до размеров около 250 п.о. использовали ферментативный метод с применением транспозазы из набора Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, США). При подготовке библиотеки фрагментированных ДНК использовали адаптеры Illumina. Качество приготовленных библиотек проверяли на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Германия). Секвенирование проводили с использованием комплекта MiSeq Reagent v.2 (Illumina, США). Полученные последовательности были собраны и проанализированы с использованием программного обеспечения UGENE 1.20 (Россия).

Филогенетический анализ и построение древ выполнены с помощью программ BioEdit и MEGA версии 4 [14] методом "присоединение соседей" с использованием последовательностей из GenBank.

Результаты и обсуждение. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных осенью 2013 г. на территории Балхашского района Алматинской области от красного нырка, выделен гемагглютинирующий агент.

Предварительная идентификация изолята в ПЦР с прайме-

рами к консервативным участкам L-гена, общими для всех ПМВ, позволила отнести его к семейству Paramyxoviridae. После проведения клонирования предельными разведениями в системе развивающихся куриных эмбрионов проведена идентификация вируса в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием набора иммунных сывороток к ПМВ серотипов 1-9 (таблица).

Результаты идентификации в РТГА представлены в таблице. Как видно, вирус ПМВ/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 в РТГА в титрах 1:320 - 1:640 взаимодействовал только с сыворотками к АPMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977, с диагностическими сыворотками к ПМВ птиц серотипов 1-5, 7-9 получены отрицательные результаты.

Эти данные позволили отнести казахстанский изолят к ПМВ-6 и обозначить его как ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013.

Результаты реакции торможения гемагглютинации ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 с иммунными сыворотками

Вирус	Титр антигемагглютининов с иммунными сыворотками к вирусам	
	ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013	APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977,
ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013	1280	320
APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977,	640	640

Примечание: даны обратные величины титров специфических антигемагглютининов.

Биологические свойства.

Изолят ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/13 репродуцируется в системе развивающихся куриных эмбрионов при

температуре 37 °С до инфекционного титра 5,5 Ig ЭИД₅₀/02 мл. Титр гемагглютинации вируса колеблется в пределах 1:128-1:512.

Вирус обладает умеренно-термостабильным HN-белком. В РГА казахстанский изолят агглютинирует эритроциты курицы, морской свинки, белой мыши, барана, крупного рогатого скота и не взаимодействует с эритроцитами лошади. По скорости элюции с нативных куриных эритроцитов исследуемый штамм ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 относится к быстро элюирующему варианту, тогда как эталонный вариант APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977 является медленно элюирующим.

К выделенному штамму ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/13 получена кроличья иммунная сыворотка с титром в РТГА 1:1280.

Генетическая характеристика вируса.

Секвенирование полученных ПЦР-продуктов амплификации L-гена и BLAST-анализ в GenBank также указали на принадлежность вируса к ПМВ-6. Отмечено, что геном казахстанского изолята ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 сходен с таковым референсного варианта APMV-6/duck/HongKong/18/199/1977 и несет 16236 нуклеотидов. Так же как и у других представителей данного серотипа, он состоит из 7 генов, расположенных в следующем порядке: 3'-N-P-M-F-SH-HN-L-5', и отличается от других серотипов содержанием дополнительного гена, кодирующего гидрофобный малый (SH) белок.

На основе последовательностей нуклеотидов гена F вычислены аминокислотные составы функционально активных сайтов расщепления белков слияния F штаммов из GenBank и казахстанского изолята. Показано, что все они сходны между собой и имеют в данной области последовательность PEPR↓L, характерную для слабопатогенных вирусов (рис. 1).

Сравнительное филогенетическое исследование изолята ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 проведено с 6, имеющимися в международной базе данных, полными нуклеотидными последовательностями геномов штаммов ПМВ-6.

В результате анализа последовательностей нуклеотидов этих вирусов выявлены 3 кластера: отдельную корневую эволю-

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	*****
1. APMV-6/mallard/Jilin/127/2011	DNQNPAPPEPRLIGI
2. APMV-6_F_gene_KZ	DNQNPAPPEPRLIGI
3. APMV-6/Goose/FarEast/4440/2003	DNQNPAPPEPRLIGI
4. APMV-6/mallard/Belgium/12245/07	DNQNPAPPEPRLIGI
5. APMV-6/duck/Italy/4526/07	DNQNPAPPEPRLIGI
6. APMV-6/duck/HongKong/18/199/77	HNQNPAPPEPRLIGI

Филогенетический анализ казахстанского штамма ПМВ-6

Рис. 1. Состав аминокислот функционально активных сайтов белка расщепления F ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 и других вирусов из GenBank

ционную ветвь формирует референсный вариант APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977, от которого впоследствии получили дальнейшее развитие штаммы 2000-х гг. ПМВ из российского Дальнего Востока вместе с европейскими штаммами сформировали отдельный второй кластер. Вместе с тем казахстанский изолят и географически близкий к нему APMV-6/mallard/Jilin/127/2011 из Китая образовали третий самостоятельный филогенетический кластер (рис. 2).

Молекулярный анализ нуклеотидной последовательности F-гена казахстанского штамма ПМВ-6/красноносый нырок/Бал-

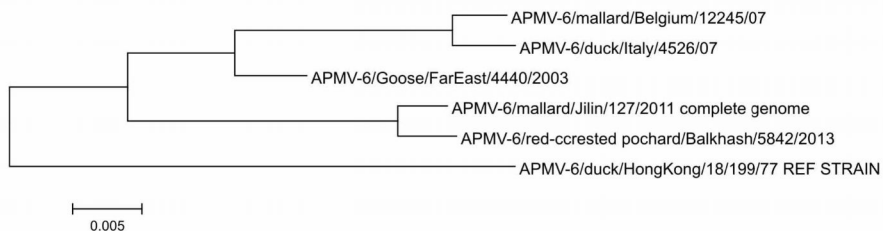


Рис. 2. Филогенетическое древо F-гена ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 и ПМВ-6 из GenBank

хаш/5842/2013 показал наличие уникальных замен в позициях С651Т, А726G, Т1155С, А1377G и Т1431С, что свидетельствует о генетическом расхождении выделенного изолята с циркулирующими в мире вирусами данного серотипа.

Выявленные отличия указывают на то, что казахстанский штамм ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 отличается от референсного (APMV-6/duck/Hong Kong/18/199/1977) и других штаммов ПМВ-6 и является новым природным вариантом. Приготовленные на его основе тест-системы могут быть использованы в вирусологических лабораториях при индикации возбудителей ПМВ-6 инфекций и противовирусных антител к ним.

Выводы

1. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных осенью 2013 г. на территории Балхашского района Алматинской области от красноногого нырка, выделен геммагглютинирующий агент, который в РТГА, секвенировании ПЦР-продуктов амплификации L-гена и BLAST-анализе в GenBank идентифицирован как ПМВ-6.

2. Вирус обладает умеренно-термостабильным НН-белком, относится к быстроэлюирующему варианту, агглютинирует эритроциты курицы, морской свинки, белой мыши, барана, крупного рогатого скота и не взаимодействует с эритроцитами лошади.

3. При молекулярном анализе нуклеотидной последовательности F-гена штамма ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/2013 выявлено наличие уникальных замен в позициях С651Т, А726G, Т1155С, А1377G и Т1431С, что свидетельствует о генетическом расхождении выделенного изолята от эталонных и ранее выделенных штаммов ПМВ-6.

4. Наличие аминокислотной последовательности PEPR↓L в составе сайта расщепления белка слияния F казахстанского изолята, характерной для слаботоогенных вирусов, позволяет рекомендовать его как безопасный антиген в практических вирусологических лабораториях при диагностике возбудителей ПМВ-6 инфекций у птиц.

Новый штамм депонирован в коллекции микроорганизмов "РГП НИИ проблем биологической безопасности" КН МОН РК (депозит М-1-15/Д от 28.07.2015).

Список литературы

1 Miller P., Afonso C., Spackman E. et al. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland islands // J Virol. – 2010. – Vol. 84. – P. 11496-11504.

2 Alexander D. Avian Paramyxoviruses // Vet. bullet. – 1980. – Vol. 50. – P. 737-752.

3 Briand F-X., Aurelie H., Massin P., Veronique J. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus // J Virol. – 2012. – Vol. 86. – P. 7710.

4 Terregino C., Aldous E.W., Heidari A., Fuller C.M., De Nardi R., Manvell R.J., Beato M.S., Shell W.M., Monne I., Brown I.H., Alexander D. J. and Capua I. 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.

5 Karamendin K, Kydyrmanov A, Seidalina A, Asanova S, Sayatov M, Kasymbekov E, Khan E, Daulbayeva K, Harrison SM, Carr IM, Goodman SJ, Zhumatov K. 2016. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus (APMV-13) isolated from a wild bird in Kazakhstan. Genome Announc 4(3):e00167-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00167-16> PMID: 27198008

6 Thampaisarn R., Bui V. N., Trinh D.Q. Nagai M., Mizutani T., Omatsu T. et al. (2017). Characterization of avian paramyxovirus serotype 14, a novel serotype, isolated from a duck fecal sample in Japan. Virus Res. 228, 46-57. doi: 10.1016/j.virusres. 2016.11.018.

7 Lee H-J, Kim J-Y, Lee Y-J, Lee E-K, Song B-M, Lee H-S and Choi K-S (2017) A Novel Avian Paramyxovirus (Putative Serotype 15) Isolated from Wild Birds. Front. Microbiol. 8:786. doi: 10.3389/fmicb.2017.00786

8 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.

9 Бейсембаева Р.У., Саятов М.Х., Даулбаева К.Д. и др. Вирусологическое и серологическое обследование диких птиц в г. Алма-Ате и ее окрестностях // Экология вирусов. – М., 1982. – С. 147-151.

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

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

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

13 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 ONE. – 2012. – Vol. 7(4): e34927. doi:10.1371/journal.pone.0034927.

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

Асанова С. Е., кандидат биологических наук, e-mail: medeubaeva@mail.ru

Кадырманов А.И., доктор ветеринарных наук,

Карамендин К.О., кандидат биологических наук,

Касымбеков Е.Т., кандидат биологических наук,

Дулбаева К.Д., кандидат биологических наук,

Жуматов К.Х., доктор биологических наук,

Саятов М.Х., доктор биологических наук