

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.25.37

А.Б.Сейдалина¹, К.Д.Даулбаева¹, А.И.Кыдырманов¹,
К.О.Карамендин¹, С.Е.Асанова¹, М.Х.Саятов¹, К.Х.Жуматов¹,
Е.Я.Хан¹, Е.Т.Касымбеков¹

¹Институт микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

НОВЫЙ ШТАММ ПАРАМИКСОВИРУСА ПТИЦ СЕРОТИПА 8 ЛЕБЕДЬ-КЛИКУН/СЕВЕРНЫЙ КАЗАХСТАН/ 5767/2013 ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ*

Аннотация. Из клоакального смыва лебедя-кликун, отловленного в Северо-Казахстанской области, выделен гемагглютинирующий агент, идентификация которого в реакции торможения гемагглютинирующей активности с набором диагностических сывороток, секвенирования фрагмента L-гена продуктов полимеразной цепной реакции, а также секвенирования полного генома, что позволило отнести новый изолят к парамиксовирусу серотипа 8. Изучены биологические, антигенные и молекулярно-генетические свойства нового штамма, рекомендуемого в качестве диагностического препарата при индикации возбудителей ПМВ-8 инфекций у птиц. В результате молекулярно-генетического анализе штамма ПМВ-8/лебедь-кликун/СКО/5767/13 выявлены уникальные нуклеотидные замены в позициях 716 и 1610 F-гена, которые привели к аминокислотным заменам K239R и T537M, отличающим новый казахстанский штамм от эталонного и ранее известных вариантов этого серотипа. Показано, что функционально активные сайты расщепления белка слияния F штамма имеют в своем составе аминокислотную последовательность TYPQTR↓L, характерную для слабопатогенных вирусов. Штамм ПМВ-8лебедь-кликун/СКО/5767/2013 рекомендуется использовать для приготовления специфического антигена и иммунной сыворотки с целью индикации возбудителя инфекции и противовирусных антител к нему.

Ключевые слова: штамм, парамиксовирус, серотип 8, иммунная сыворотка, филогенетический анализ, диагностикум, дикая птица, диагностические препараты.

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

Түйіндеме. Қазанда ұсталған сұңқылдақ аққудың клоака шайындысынан гемагглютининдеуші агент бөлінді. Жаңа бөліндіні балаулық қан сарысуы жиынтығымен реакциялар тежеу гемагглютинирующей белсенділігі талдау, сонымен қатар L-гені фрагменті мен геномын толық секвендеу оны парамиксовирустың 8-серотипіне жататындығын анықтады. Мақсаты зерттеулер – зерттеу, биологиялық, антигендік және молекулалық-генетикалық қасиеттерінің жаңа штамм, ұсынылатын ретінде диагностикалық препаратты қоздырғыштарын индикациялау ПМВ-8 инфекциялардың құстардың. ПМВ-8/сұңқылдақ аққу/Солтүстік Қазақстан/5767/2013 штамын молекулалық-генетикалық талдауда F-генінің 716 және 1610 позицияларында бірегей нуклеотидтік орын ауысулар анықталған. Ол өз кезегінде қазақстандық жаңа штамның осы серотиптің эталондық және көне нұсқаларынан айрықшаландыратын K239R мен T537M аминқышқылды ауысымдарға алып келді. Штамның F қосылу ақуыздарының функционалды белсенді ажырау сайтының құрамы жұғымталдығы төмен вирустарға тән TYPQTR↓L аминқышқылды тізбектерден тұратыны көрсетілген. ПМВ-8/Сұңқылдақ аққу/Солтүстік Қазақстан/5767/2013 штамын инфекция қоздырушысын және аталған қоздырғышқа қарсы пайда болған антиденелерді анықтау мақсатында төнді антигенмен иммундық қан сарысуын дайындау үшін қолдануға ұсынылады.

Түйінді сөздер: штамм, 8-серотип, парамиксовирус, иммундық қан сарысуы, филогенетикалық анализ, диагностикалық, түз құсы, диагностикалық препараттар.

• • •

Abstracts. In October 2013, a hemagglutinating agent was isolated from cloacal swab of whooper swan caught in the Northern Kazakhstan oblast, identification of which in the hemagglutination inhibition assay of response inhibition hemagglutinin activity (HI) with a set of diagnostic sera, sequencing of the L-gene fragment, and sequencing of the complete genome, allowed to attribute this isolate to avian paramyxovirus serotype 8. The purpose of the research is the study of the biological, antigenic and molecular properties of a new strain is recommended as a diagnostic drug for indication of pathogens PMA-8 infections in birds. Molecular-genetic analysis of the APMV-8/whooper swan/Northern Kazakhstan/5767/2013 strain revealed unique nucleotide substitutions at positions 716 and 1610 of the F gene, which led to the amino acid substitutions K239R and T537M, distinguishing the new Kazakhstan strain from the reference and previous variants of this serotype. It has been shown that the functionally active cleavage sites of fusion protein F of APMV-8/whooper swan/Northern Kazakhstan/5767/2013 have a TYPQTR↓L amino acid sequence that characterize low pathogenic viruses. The strain is recommended for the preparation of a specific antigen and immune serum for indication of an infectious agent and antiviral antibodies to it.

Key words: strain, serotype 8, paramyxovirus, immune serum, phylogenetic analysis, diagnosticum, wild bird, diagnostic preparations.

Введение. В последние годы установлена приоритетная роль диких птиц в сохранении парамиксовирусов (ПМВ) в биосфере, являющихся потенциальным природным источником генетического материала для возникновения новых опасных вариантов вирусов. Известные в настоящее время 15 серотипов ПМВ птиц (ПМВ-1 - ПМВ-15), образующие род *Avulavirus* семейства *Paramyxoviridae*, способны вызывать заболевания более чем у 200 видов диких и домашних птиц во всех регионах мира [1-7]. Среди них наиболее распространенным является вирус болезни Ньюкасла, относящийся к ПМВ-1 [1].

В Республике Казахстан в ходе эколого-вирусологического мониторинга ПМВ-1 выделены от домашних и полевых воробьёв, серых ворон, сорок, а также диких голубей во время их массовой гибели [8]. В 2006 г., 2009 г. и 2013 г. ПМВ серотипов 1, 4, 6 и 8 изолированы от 11 видов диких птиц, преимущественно от диких гусей и уток [9].

В связи с большой экономической значимостью для птицеводства наибольшее внимание уделяется изучению штаммов ПМВ-1, выделенных от домашних птиц. В то время как многие вопросы эволюции ПМВ, циркулирующих в популяциях дикой орнитофауны, остаются нерешенными и малоизученными. Поэтому проведение вирусологических и молекулярно-генетических исследований ПМВ, выделенных от диких птиц в РК, представляет большой научный и практический интерес.

Цель работы – изучение биологических, антигенных и молекулярно-генетических свойств нового штамма ПМВ-8/лебедь-кликун/СКО/5767/2013, рекомендуемого в качестве диагностического препарата при индикации возбудителей ПМВ-8 инфекций у птиц и специфических антител к ним.

Методы исследований. Для вирусологических исследований собрана пробы в виде клоакальных, трахеальных смывов от птиц водного и околородного экологических комплексов. Пробы до вирусологических исследований хранили в жидком азоте при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Изоляцию вирусов проводили путем инокуляции каждой пробы исследуемого материала в аллантоисную полость трех

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

Для очистки вирус-содержащую аллантоисную жидкость вначале осветляли центрифугированием при 4000 об./мин. в течение 30 мин. при 4 °С. Затем вирус концентрировали путем центрифугирования при 29 000 об./мин. в течение 180 мин. при 4 °С. Полученный осадок вируса ресуспендировали в минимальном объеме буфера, после чего определяли гемагглютинирующую активность.

Реакцию торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) выполняли микрометодом с помощью одно- и многоканальных полуавтоматических пипеток на одноразовых микротитровальных планшетах "Aptaca" (Италия).

Иммунную сыворотку получали двукратной иммунизацией кроликов массой 2,5-3 кг породы шиншилла [8].

Выделение РНК из аллантоисной жидкости 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.

Обратную транскрипцию – полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) осуществляли с помощью набора 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-минутная 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 фрагмента L-гена продуктов ПЦР проводили в автоматическом 8-капиллярном секвенаторе ABI-3500 DNA

Analyzer (Applied Biosystems, США).

Секвенирование полного генома вируса осуществляли на секвенаторе нового поколения MiSeq (Illumina, США). В качестве матрицы использовали синтезированную с применением набора Roche (Mannheim, Германия) 2-цепочечную кДНК. Для фрагментации кДНК до размеров около 300 пар оснований применяли прибор ультразвуковой дезинтеграции «Covaris M 220». При подготовке библиотеки фрагментированных ДНК использовали адаптеры Illumina (Biooscientific, США). Качество приготовленных библиотек проверяли на приборе "Bioanalyzer-2100" (Agilent Technologies, Германия). Подсчет библиотек осуществляли с помощью набора для количественной ПЦР (КАРА, Южная Африка). Полученные последовательности проанализированы и собраны с использованием программного обеспечения Genome Sequencer (v. 2.8, Roche, Германия).

Филогенетический анализ проведен с имеющимися в международной базе данных полными последовательностями генов ПМВ всех серотипов.

Результаты и обсуждение. Осенью 2013 г. в Северо-Казахстанской области (СКО) из клоакального смыва лебедя-кликун выделен гемгглютинирующий агент. Идентификация в ПЦР с праймерами к консервативным участкам L-гена позволила отнести его к семейству ПМВ. Дальнейшее секвенирование L-гена, кодирующего полимеразный белок, показало принадлежность этого вируса к ПМВ-8.

Идентификация вируса в РТГА с набором поликлональных сывороток к 9 серотипам ПМВ показала, что вирус в антигенном отношении близок к вирусу-эталону APMV-8/goose/Delaware/1053/1976 с иммунной сывороткой, с которым он взаимодействовал до 1/2 гомологичного титра (1:640). Со специфическими сыворотками 1-7 и 9 получены отрицательные результаты. Новый вирус получил обозначение ПМВ-8/белолобый гусь//СКО/5767/2013.

Биологические свойства

Новый казахстанский штамм ПМВ-8/лебедь-кликун/СКО/5767/2013 обладает высокой гемагглютинирующей (1:512) и ан-

тигенной активностью (титр иммунной сыворотки в РТГА 1:1280), репродуцируется в системе РКЭ при оптимальной температуре (37 °С) до инфекционного титра 7,66 lg ЭИД50/02 мл, агглютинирует эритроциты курицы, морской свинки, белой мыши, барана, крупного рогатого скота и не взаимодействует с таковыми лошади, характеризуется термолабильным гемагглютинином, поскольку теряет способность вызывать агглютинацию эритроцитов курицы после прогревания при 56 °С в течение 30 мин., в отличие от референсного вируса, обладающего термостабильным HN белком, сохраняющим гемагглютинирующую активность при этой температуре в течение 120 мин. прогревания. По скорости элюции новый изолят является медленно элюирующим вирусом.

Генетический анализ

В международной базе данных GenBank имеется 2 полных нуклеотидных последовательностей штаммов ПМВ-8, выделенных в конце 1970-х гг. в США и Японии. Длина генома референсного варианта APMV-8/goose/Delaware/1053/1976 составляет 15342 нуклеотида. Такого же размера оказался геном казахстанского изолята ПМВ-8/белолобый гусь/СКО/5765/2013, что соответствует общему для ПМВ "правилу шести". Казахстанский изолят, так же как и другие представители ПМВ-8, содержит 6 фрагментов, расположенных в следующем порядке: 3'-N-P/V/W-M-F-HN-L-5'. Каждый из них фланкируется с обеих сторон консервативными последовательностями и имеет межгенные участки размером 1-30 нуклеотидов.

Анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей генов казахстанского изолята с таковыми APMV-8/goose/Delaware/1053/1976 показал высокую степень их родства (99 %) по M, L и HN и F генам. Сходство по N гену достигало 98 %.

На основе последовательностей нуклеотидов гена F вычислены аминокислотные составы функционально активных сайтов расщепления белков слияния F штаммов ПМВ-8 из GenBank и казахстанского изолята (рис. 1). Показано, что все 3 вируса сходны между собой и имеют в составе сайта последовательность TYPQTR QL, характерную для слабопатогенных вирусов.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	*****
1. APMV-8/pintail/Wakuya/20/78	TYPQIRLI G
2. APMV-8 KZ	TYPQIRLI G
3. APMV-8/Goose/Delaware/1053/76	TYPQIRLI G

Рис. 1. Состав аминокислот функционально активных сайтов расщепления белков слияния F ПМВ-8/лебедь-кликун/СКО/5767/2013 и других вирусов из GenBank

Филогенетический анализ гена F белка казахстанского штамма ПМВ-8/лебедь-кликун/СКО/5767/13 и вирусов из GenBank показал наличие уникальных нуклеотидных замен в последовательности F-гена: G45A, A90G, A129G, T315C, A312G, T315C, A351G, C378T, A408G, A474G, T540C, G636A, A716G, C738T, C805T, A846C, C1050T, A1092G, A1095G, G1344A, G1413A, G1587A и C1610T. Все нуклеотидные изменения оказались несинонимическими, кроме замен в позициях 716 и 1610, которые привели к аминокислотным заменам K239R и T537M.

На основе сравнительного исследования изолята ПМВ-8/белолобый гусь/СКО/5765/2013, с имеющимися в международной базе данными, установлено наличие отдельного филогенетического кластера ПМВ-8. Показано, что казахстанский изолят ПМВ-8/белолобый гусь/СКО/5765/2013 отличается в эволюционном отношении от других вирусов этого серотипа и сформировал отдельную ветвь внутри данного кластера (рис. 2).

Выводы

При вирусологическом исследовании биологических образцов, собранных в октябре 2013 г. в Северо-Казахстанской области, из клоакального смыва лебедя-кликун выделен гемагглютинирующий агент, который в РТГА и молекулярно-генетическими методами идентифицирован как ПМВ-8. В результате молекулярно-генетического анализа штамма ПМВ-8/лебедь-кликун/СКО/5767/13 выявлены уникальные нуклеотидные замены в позициях 716 и 1610 F-гена, которые отличают новый казахстанский

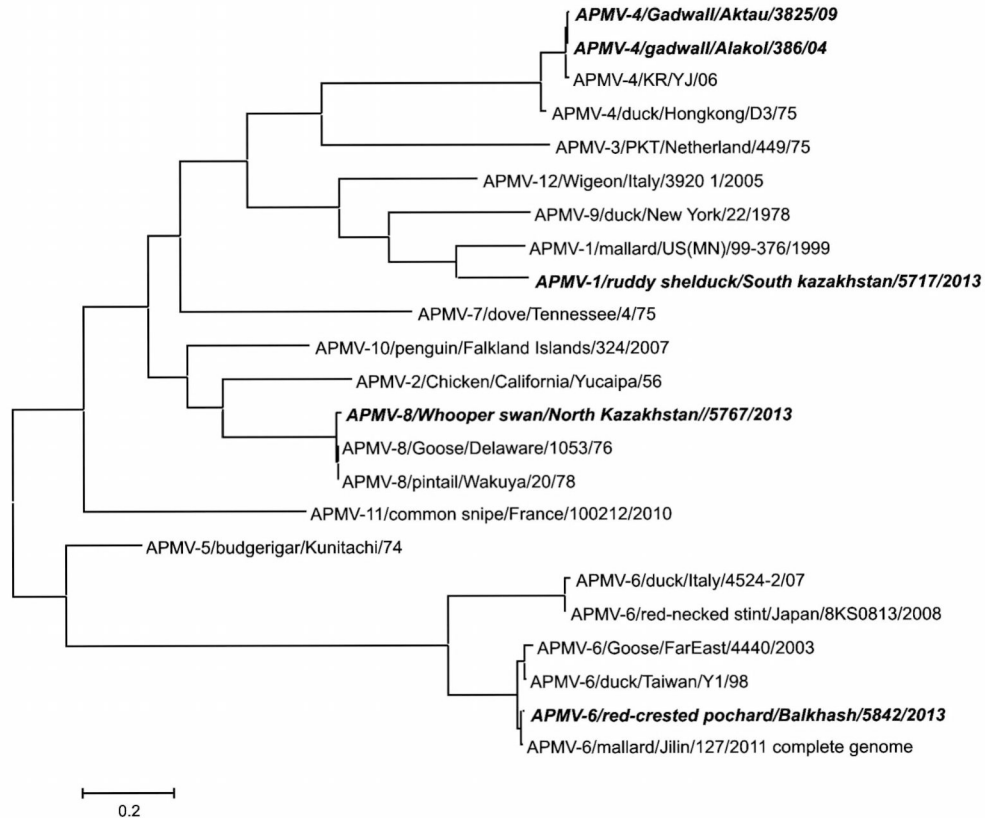


Рис. 2. Филогенетическое древо F-генов ПМВ-8/лебедь-кликун SKO/5767/2013 и других парамиксовирусов птиц из GenBank

штамм от эталонного и ранее известных вариантов этого серотипа.

Показано, что функционально активные сайты расщепления белка слияния F штамма ПМВ-8лебедь-кликун/СКО/5767/2013 имеют в своем составе аминокислотную последовательность TYPQTR \square L, характерную для слабопатогенных вирусов из GenBank.

Новый штамм ПМВ-8лебедь-кликун/СКО/5767/2013 рекомендуется для получения специфических диагностических препаратов, необходимых при индикации возбудителя инфекции и противовирусных антител к нему.

Штамм депонирован в коллекции микроорганизмов РГП на ПХВ "НИИ проблем биологической безопасности" КН МОН РК. Номер депозита М-2-15/Д.

Список литературы

1 *Alexander J., Senne A.* 2008. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections, p. 75-116. In Y. M. Saif. A. M. Fadly. J. R. Glisson, L R. McDougald. L. K. Nolan, and D. E. Swayne (eds.). Diseases of Poultry, 12th ed. Iowa State University Press, Ames. IA.

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 // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 11496-11504.

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.* et al. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). // *Arch of Virol.* – 2013. – № 158. – P. 2233-2243.

5 *Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A., Asanova S., Sayatov M., Kasymbekov E., Khan E., Daulbayeva K., Harrison S.M., Carr I.M., Goodman S.J., 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., Саятов М.Х., Богомолова Т.С., Кыдырманов А.И., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Шахворостова Л.И., Зародышева Ю.В.* Изоляция вируса болезни Ньюкасла от синантропных голубей в Алматы: Междунар.науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию акад. НАН РК Т.М. Масенова // Современные проблемы сохранения биоразнообразия, 2006. – С. 85-87.

9 *Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A., Asanova S., Daulbayeva K., Kasymbekov Y., Khan E., Fereidouni S., Starick E., Zhumatov K. Sayatov M.* Circulation of avian paramyxoviruses in wild birds of Kazakhstan in 2002-2013 // *Virology Journal* (2016) 13:23 DOI 10.1186/s12985-016-0476-8.

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

Даулбаева К.Д., e-mail: daulbaevak@mail.ru