

К.О.КАРАМЕНДИН, С.Е.АСАНОВА, А.И.КЫДЫРМАНОВ, К.А.НУРШИН,
А.СЕЙДАЛИНА, М.ХОЖАМЖАРОВА, Е.Я.ХАН, К.Д.ДАУЛБАЕВА,
Е.Т.КАСЫМБЕКОВ, К.Х.ЖУМАТОВ, М.Х.САЯТОВ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

ИЗОЛЯЦИЯ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА МЕЗОГЕННОГО ПАТОТИПА ОТ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПТИЦ В ЮГО-ВОСТОЧНОМ КАЗАХСТАНЕ

Аннотация

В статье приведены результаты обнаружения вируса болезни Ньюкасла среди вакцинированного поголовья на одной из птицефабрик Юго-Восточного Казахстана, определения его патогенности и секвенирования F-гена. Показано, что по данным вычисления среднего времени гибели эмбрионов и наличию основных аминокислот RRGKR в сайте расщепления белка связывания, вирус отнесен к мезогенному патотипу.

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла, мезогенный патотип

Парамиксовирусы (ПМВ) птиц образуют род *Avulavirus* семейства *Paramyxoviridae*, характеризуются минус-нитевым РНК-геномом и циркулируют среди млекопитающих, птиц и рептилий. Их вирионная РНК представлена шестью генами, кодирующими гемагглютинин-нейраминидазу (HN), нуклеопротеин (NP), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), РНК-зависимую РНК-полимеразу (L) и белок слияния (F). На основе серологических различий поверхностных белков ПМВ разделяются на девять серотипов (ПМВ-1 - ПМВ-9), наиболее опасным из которых является ПМВ-1 (вирус болезни Ньюкасла, ВБН), вызывающий опустошительные вспышки среди поголовья птиц во всех регионах мира [1].

Болезнь Ньюкасла впервые описана F. Kraneveld в 1926 г. на о. Ява [2], а сам вирус выделен Doyle в 1927 г. [3]. В бывшем СССР от водоплавающих птиц ВБН впервые изолирован в 1974 г. [4]. На территории Казахстана ВБН обнаружен у синантропных (домовой и полевой воробей, серая ворона, сорока) и домашних птиц, а также диких голубей во время их массовой гибели [5, 6].

Цель настоящей работы заключалась в изоляции, идентификации и характеристике биологических свойств этиологического агента, вызвавшего заболевание среди домашних птиц в одном из птицеводческих хозяйств Юго-Восточного Казахстана.

Материалы и методы

Для вирусологического исследования использовали клоакальные смывы и кусочки органов от домашних птиц из птицеводческого хозяйства, расположенного в окрестности крупного населенного пункта в Республике Казахстан. До начала исследований пробы хранили в жидком азоте (-196°C).

Изоляцию вирусов и восстановительные пассажи проводили путем инокуляции каждой пробы в аллантоисную полость трех 10-11-дневных куриных эмбрионов (КЭ) и последующей их инкубации при температуре +36°C в течение 48 ч. по сертифицированным методикам, рекомендованным Международным Эпизоотическим Бюро [6].

Для определения среднего времени гибели КЭ, вызванного минимальной летальной дозой вируса (СВГ/МЛД), готовили серию 10-кратных разведений исследуемого вируса (от 10^{-1} до 10^{-10}), пять из которых (10^{-1} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) использовали для заражения 10-дневных КЭ в аллантоисную полость в объеме 0,1 мл. Каждым из этих разведений инфицировали по 10 эмбрионов: 5 из них заражали утром, 5 - вечером, и инкубировали их при +37°C. За инфицированными КЭ наблюдали 2 раза в день с интервалами 8 ч. в течение 120 ч. и регистрировали время их гибели. За минимальную летальную дозу принимали наибольшее

разведение вируса, вызывающее гибель всех эмбрионов. СВГ находили путем деления суммы часов гибели всех эмбрионов, вызванной МЛД, на число эмбрионов. Результаты подсчитывали по формуле:

$$\text{СВГ} = \frac{(\text{КПУ31}) \times (\text{ВГ1}) + (\text{КПВ31}) \times (\text{ВГ1}) + (\text{КПУ32}) \times (\text{ВГ2}) \text{ и т.д.}}{\text{Общее количество погибших эмбрионов}}$$

где: КПУЗ и КПВЗ – количество погибших эмбрионов утреннего и вечернего заражений; 1, 2, 3 – номера просмотров; ВГ – время гибели эмбрионов в ч.

К влогенным были отнесены штаммы с СВГ КЭ до 60 ч., к мезогенным- от 61 ч. до 90 ч., к лентогенным - от 90 ч. и более[6].

Очистку и концентрацию вирусов осуществляли дифференциальным центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при +4°С и при 29 000 об/мин в течение 180 мин при +4°С.

Вирусную РНК выделяли с использованием набора QIAampViral RNA Minikit (QiagenGmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя. Для экстракции РНК из кусочков органов их предварительно измельчали и растирали в стерильной ступке с добавлением транспортировочной среды.

Комплементарную ДНК синтезировали с применением случайных гексамерных праймеров (randomhexamers) методом обратной транскрипции.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) ставили в амплификаторе Eppendorf Gradient с праймерами к участку М-гена ВБН.

В ОТ-ПЦР использовали праймеры в концентрации 0,5 микромоляр, положительным контролем служил РНК изолята ПМВ-1/цыпленок/Талдыкорган/1578/06. Реакцию проводили в термоциклере EppendorfGradient при следующих условиях: обратная транскрипция при 48°С 45 мин, начальная 2 мин денатурация при 95°С и амплификация в 30 циклов, включающая денатурацию (94°С, 30 сек), отжиг праймеров (55°С, 30 сек) и удлинение цепи (72°С, 30 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°С, 10 мин.

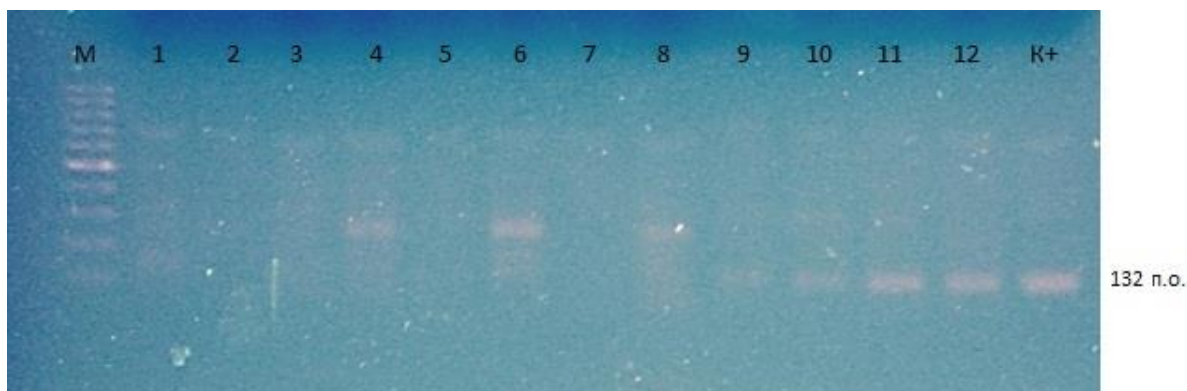
Секвенирование ДНК проводили в Национальной лаборатории биотехнологии коллективного пользования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов на автоматическом 96-капиллярном секвенаторе ABI 3730xl DNA analyzer (AppliedBiosystems).

Выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла с полными нуклеотидными последовательностями генов вирусов евразийских линий проводили с помощью компьютерной программы BioEdit.

Результаты и обсуждение

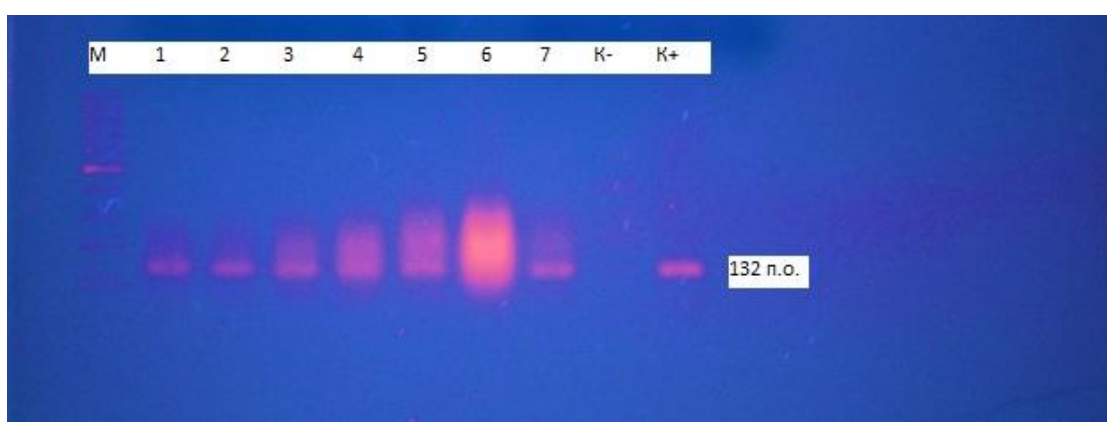
Весной 2013 г. в крупном птицеводческом хозяйстве на Юго-Востоке Казахстана среди домашних цыплят 30-дневного возраста возникла вспышка острого инфекционного заболевания. Клиническая картина характеризовалась угнетением, слабостью и расстройством функций органов дыхания. У большинства птиц отмечались признаки поражения пищеварительного тракта, сопровождавшиеся диареями и нарушениями нервной системы. Последние проявлялись в движении по кругу, частых подергиваниях головы, одно- и двусторонних парезах и параличах мышц ног и крыльев, перекручивании шеи.

Для идентификации этиологического агента с РНК, объединенными в пулы из трех образцов, выделенными из клоакальных и трахеальных смывов, а также кусочков органов от погибших птиц проведена ПЦР. Результаты тестов отражены на рисунках 1 и 2.



Примечание: «М» – ДНК маркер; «К+» – положительный контроль – РНК изолята ПМВ-1/цыпленок/Талдыкорган/1578/06; №№ 1-12 пулы РНК из проб.

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР с материалами из клоакальных и трахеальных смывов от больных птиц



Примечание: «М» – ДНК маркер; «К-» – отрицательный контроль; «К+» – РНК изолята ПМВ-1/цыпленок/Талдыкорган/1578/06; №№ 1-7 пулы РНК из органов.

Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР с кусочками органов от погибших птиц

Как видно из рисунков 1 и 2, в результате ПЦР получены положительные результаты как с РНК, экстрагированными из клоакальных и трахеальных смывов от больных птиц, так и из кусочков органов погибших птиц. На электрофореграммах показаны положительные результаты в пробах с обнаружением специфических продуктов в 132 пары оснований, что свидетельствует о наличии РНК вируса в исследованных образцах.

При первичном заражении ПЦР-положительными образцами и первом пассаже КЭ изолировано восемь агентов с титрами в РГА 1:32-1:512.

Степень патогенности вновь выделенных штаммов ВБН определяли на примере вируса ПМВ-1/цыпленок/Алматы/100/13 путем вычисления СВГ/МЛД, которое составило 61,6 ч., что соответствует мезогенному патотипу.

Для подтверждения полученных результатов проведено секвенирование сайта расщепления F- гена, которое показало наличие основных аминокислот RRGKR в позициях 112-116, что также является признаком высокой патогенности вируса.

Таким образом, по результатам ПЦР и вирусологических исследований идентифицирован этиологический агент, вызвавший заболевание в птицеводческом хозяйстве в Юго-Восточном Казахстане среди цыплят 30-дневного возраста. Принадлежность возбудителя инфекции к мезогенному патотипу указывает на его

возможное экзогенное происхождение, т.к. поголовье птиц в этом хозяйстве было иммунизировано вакциной из лентогенного (авирулентного) штамма Ла Сота.

Полученные сведения важны для практической ветеринарии при расшифровке вспышек заболеваемости и контроле над возникающими чрезвычайными эпидемическими ситуациями в Казахстане, так как Республика расположена в центре Евразийского континента и через ее территорию проходят миграционные пути перелетных птиц, которые могут служить источником заноса новых патогенных вариантов вирусов.

Вышеизложенное определяет необходимость проведения комплексного эколого-вирусологического мониторинга возбудителей парамиксовирусных инфекций в популяциях диких и домашних птиц, являющихся их природным резервуаром и нишей, где могут произойти точечные мутации генов вирусов с появлением новых потенциально опасных вариантов.

Литература:

1 Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses Rev Sci Tech. -2000. - №19(2). - P. 443-62.

2 Kranveld F.E. About a poultry disease in the Netherlands Indies. -Ned. Indies, VI. Diergeneek, 1926. - №38. - P. 448-450.

3 Doyle T.M. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus // Journal of Comparative Pathology. - 1927. - № 40. - P.162-171.

4 Львов Д.К., Сюрин Л. К., Никифоров А. П., Портянко Н.В., Сазонов А.А., Андреев В.П., Чумаков В.М., Белоусова Р.В., Константинова Л.А., Забигаило Н.М., Львов Н.Д., Михтарьянц Э.А., Мыррин Н.И., Жезмер В.Ю. Обнаружение природных очагов вируса болезни Ньюкасла в СССР // Вопросы вирусологии. -1977. - №3. - С.11 – 315.

5 СаятовМ.Х., Бутакова И.Ш., Богомолова Т.С., Асанова С.Е., ШахворостоваЛ.И., Даулбаева К.Д., Ишмухаметова Н.Г.,Кыдырманов А.И., Жуматов К.Х. Межвидовая трансмиссия вируса болезни Ньюкасла // Поиск. – 2005. - №2. – С. 56-63.

6 Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Бутакова И.Ш. Структурная организация и антигенная вариабельность вируса болезни Ньюкасла// Вестник Казахского национального университета им. аль-Фараби. Серия биологическая. -2002. - №1 (16). - С.36-45.

7 Office International des Epizooties (OIE). Newcastle disease. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 3rd Ed. OIE, Paris. - 1996. - P.161-169

Түйін

К.Ө. ҚАРАМЕНДИН, С.Е. АСАНОВА, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ, Қ.А. НҮРШИН, А. СЕЙДАЛИНА, М.О. ХОЖАМЖАРОВА, Е.Я. ХАН, К.Д. ДАУЫЛБАЕВА, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ, Қ.Х. ЖҰМАТОВ, М.Х. САЯТОВ

ҚР ҒК БЖҒМ РМК «Микробиология және вирусология институты», Алматы қ.

ОҢТҮСТІК-ШЫҒЫС ҚАЗАҚСТАНДА ЕГІЛГЕН ҚҰСТАРДАН НЬЮКАСЛ АУРУЫ ВИРУСЫНЫҢ ВЕЛОГЕНДІ ПАТОТИПІН БӨЛІП АЛУ

Мақалада Оңтүстік-Шығыс Қазақстанның құс фабрикаларының бірінде егілген құстардан Ньюкасл ауруы вирусын бөліп алу, оның патогендігін анықтау мен F-генін секвендеу нәтижелері келтірілген. Эмбриондардың орташа өлім уақыты көрсеткішін анықтау және қосылу ақуызының ажырау сайтында негізгі RRGKR аминқышқылдарының бар болуы бойынша, вирус велогенді патотипіне жатқызылды.

K.O. KARAMENDIN, S.E. ASANOVA, A.I. KYDYRMANOV, K.A. NURSHIN, K.D. DAULBAEVA, A. SEYDALINA, M. KHOZHAMZHAROVA, E.Y. KHAN, E.T. KASYMBEKOV, K.KH. ZHUMATOV, M.KH. SAYATOV.

Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

ISOLATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS OF MESOGENIC PATHOTYPE FROM VACCINATED POULTRY IN SOUTHEASTERN KAZAKHSTAN

Summary

The results of the detection of Newcastle disease virus among vaccinated cattle at a poultry farm in South-East Kazakhstan, determine its pathogenicity and sequencing of the F-gene. It is shown that according to the calculation of the average time of death of embryos and RRGKR the presence of basic amino acids at the cleavage site of the protein binding, the virus is related to the mesogenic pathotypes.

Key words: Newcastle disease, mesogenic pathotype

Paramyxoviruses (PMV) form the Avulavirusgenusof Paramyxoviridae family, characterized by a single-stranded non-segmentednegative-sense RNA genome and circulate among mammals, birds and reptiles. Their viral RNA is represented by six genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase (HN), nucleoprotein (NP), phosphoprotein (P), matrix (M), RNA-dependent RNA polymerase (L) and fusion proteins (F). On the basis of serological differences in surface proteins, PMV divided into nine serotypes (PMV-1 - PMV-9), the most dangerous of them is PMV-1 (Newcastle disease virus, NDV), which causes devastating outbreaks among poultry population in all regions of the world [1].

Newcastle disease was first described by F. Kraneveldon Java islandin 1926 [2] and the virus was isolated by Doyle in 1927 [3]. In the former Soviet Union NDV first isolated from waterfowl in 1974 [4].In Kazakhstan NDV found in poultry and commensal birds (house and tree sparrow, gray crow, magpie), as well as in wild pigeons during their mass die [5, 6].

The aim of the present work is to isolate, identify, and characterize the biological properties of the etiological agent causing the disease in poultry in a poultry farm in South-East Kazakhstan.

Materials and methods

Cloacal swabs and pieces of necropsied organs from birds inpoultry farm located in the Southeast of Kazakhstan used for virological studies.Samples were stored in a liquid nitrogen prior to research (-196 ° C).

Virus isolation and passages were performed by inoculation of each sample into the allantoic cavity of the three 10-11-day-old chicken embryos (CE) with subsequent incubation at +36 ° C for 48 hours according to certified methodology recommended by the Office International des Epizooties [6].

To determine the mean death timeof CE caused by minimal lethal dose of the virus (MDT / MLD), a series of 10-fold dilutions of the virus (from 10^{-1} to 10^{-10}), five of which (10^{-1} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) was used to infect 10-day CE allantoic cavity in a volume of 0.1 ml. Each of these dilutions were used to infect 10 embryos and incubated at +37 ° C, five of them checkedin the morning, otherfive -in the evening. Infected embryosinspected two times a day with intervals of 8 hours during 120 hours, and the time of their death was recorded. For the minimum lethal dose, the highest dilution of the virus that causes the death of all embryoswas considered. MDT was calculated by dividing the sum of all the hours of the death of embryos caused by MLD by the quantity of embryos.

The results are calculated by the formula:

$$\text{MDT} = \frac{(\text{QDEM1}) * (\text{DT1}) + (\text{QDEE1}) * (\text{DT1}) + (\text{QDEM 2}) * (\text{DT2}), \text{ etc.}}{\text{The total number of dead embryos}}$$

where: QDEM and QDEE - the quantity of dead embryos in the morning and evening, 1, 2, 3 –orders of inspections, DT–death time of embryos in hours.

MDT up to 60 hours considered as velogenic strains, from 61 hours to 90 hours as mesogenic, and 90 hours or more as lentogenic [6].

Purification and concentration of the viruses was carried out by differential centrifugation at 5000 RPM for 10 min at +4 ° C and at 29 000 RPM for 3 h. at +4 ° C.

Viral RNA was extracted using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden) according to the manufacturer's recommendations. For RNA extraction from pieces of necropsied organs, they were grinded in a sterile mortar with medium.

Complementary DNA was synthesized by reverse transcription using random hexamer primers.

Polymerase chain reaction (PCR) was conducted in Eppendorf Gradient thermocycler with primers targeting the M-gene of NDV.

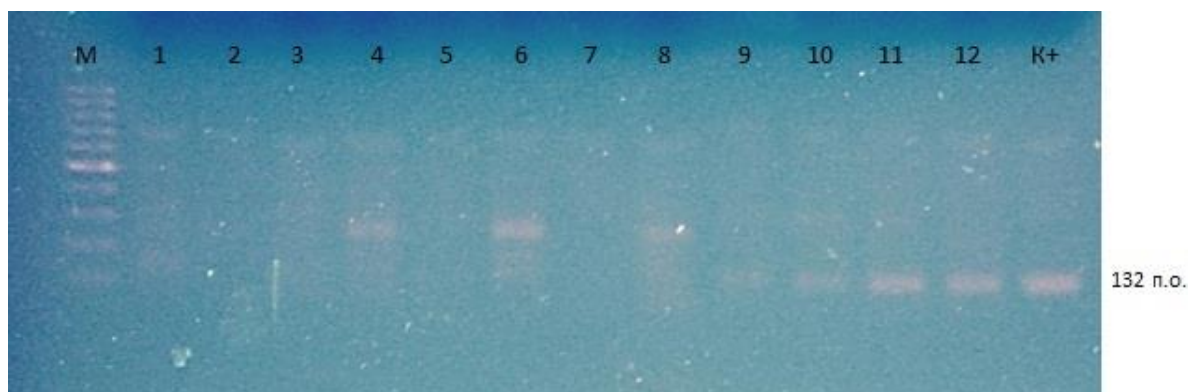
In RT-PCR, primers in a concentration of 0.5 mM were used, the RNA of the isolate PMV-1/chicken/Taldykorgan/1578/06 served as a positive control. The reaction is carried out under the following conditions: reverse transcription at 48 ° C 45 min, 2 min of initial

denaturation at 95 ° C and 30 amplification cycles comprising denaturation (94 ° C, 30 s), primer annealing (55 ° C , 30 s) and chain extension (72 ° C, 30 sec) followed by a final elongation at 72 ° C for 10 min.

Results and Discussion

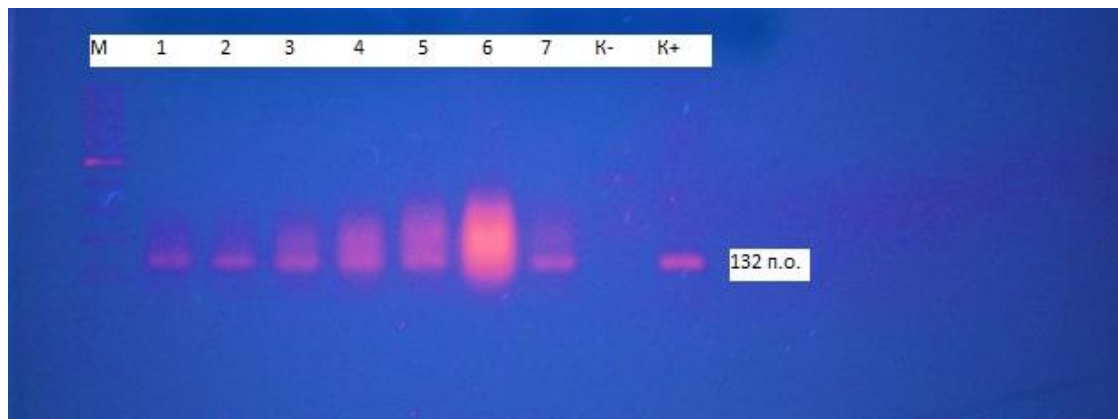
In the spring of 2013 at a large poultry farm in the South-East of Kazakhstan an outbreak of acute infectious disease occurred in 30 days old chickens. The clinical picture was characterized by depression, weakness and disorder of the respiratory system. The most of birds showed signs of disorders in digestive tract, accompanied by diarrhea and affection of the nervous system as movement in a circle, frequent twitching of the head, single and bilateral paresis and paralysis of muscles of legs and wings, twisting their neck.

For identification of the etiological agent, PCR with RNA of pooled three samples extracted from tracheal and cloacal swabs and pieces of organs from dead birds was performed. Test results are shown in Figures 1 and 2.



Note: The "M" - DNA ladder; "K +" - positive control - RNA isolate PMV-1/chicken/Taldykorgan/1578/06; № № 1-12 pools of RNA samples.

Figure 1 - Electrophoresis with the materials of cloacal and tracheal swabs from sick birds



Note: The "M" - DNA ladderer; "K-" - negative control; "K +" - isolate RNA PMV-1/chicken/Taldykorgan/1578/06; № № 1-7 pools of RNA from organs.

Figure 2 - Electrophoresis with pieces of necropsied organs from dead birds

As can be seen from Figures 1 and 2, positive results were obtained with RNAs from cloacal and tracheal swabs of sick birds, and from necropsied organs of dead birds. The electrophoresis picture showed positive results with detection of specific products of 132 base pairs, suggesting the presence of viral RNA in tested samples

After primary infection of CE and first passage with PCR-positive samples, eight agents with titres 1:32-1:512 in Haemagglutination Assay were isolated.

The degree of pathogenicity of the newly isolated strains of NDV were determined by calculating the MDT / MLD, that reached 61.6 hours, which corresponds to the mesogenic pathotype.

To confirm the obtained results sequencing of the cleavage site of F-gene was performed, which showed the presence of multibasic amino acids motif RRGKR at positions 112-116, which is also a sign of high pathogenicity.

Thus, the results of PCR and virological studies identified etiologic agent causing the disease in poultry in South-East Kazakhstan. Relatedness of the virus to the mesogenic pathotype indicates its possible exogenous origin, as poultry in the farm was immunized with vaccine containing lentogenic (non-virulent) strain La Sota.

These findings are important for veterinary practice for identify outbreaks and control of epizootic situation in Kazakhstan, as it is located in the center of the Eurasian continent, and big migration flyways pass through its territory, which can be a source of introduction of new pathogenic virus variants.

The foregoing defines the need for integrated ecological and virological studies of paramyxovirus infection in populations of wild and domestic birds - their natural reservoir and the niche where mutations in the genes of viruses with the emergence of new potentially dangerous variants can occur.

References:

- 1 Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses Rev Sci Tech. -2000. - №19(2). - P.443-62.
- 2 Kranveld F.E.. About a poultry disease in the Netherlands Indies. Ned. Indies, BI. Diergeneek, 1926. - №38. - P.448-450.
- 3 Doyle T.M. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus // Journal of Comparative Pathology. -1927. - № 40. - P. 162-171.
- 4 Lvov D.K., Syurin L.K., Nikiforov A.P., Portyanko N.V., A. Sazonov, V.P .Andreev, V. Chumakov, R. Belousov, Konstantinov L . A., Zabigaylo N.M., N.D. Lions, Mihtaryants E.A., Mymrin N.I., Zhezmer V.Y. Detection of natural foci of Newcastle disease virus in the USSR // Problems of Virology. -1977. - № 3. -C.11 - 315.

5 Sayat M.H., Butakova I.S., Bogomolova T.S., Assanova S.E., Shahvorostova L.I., Daulbaeva K.D., Ishmukhametova N.G., Kydyrmanov A.I., Jumatov K .Kh. Interspecies transmission of Newcastle disease virus // Search. - 2005. - №2. - C.56-63.

6 Sayat M.H., Kydyrmanov A.I., Butakova I.S. Structural organization and antigenic variability of the Newcastle disease virus // Bulletin of the Kazakh National University. Al-Farabi. BiologySeries. - 2002. - №1(16). - C.36-45.

7 Office International des Epizooties (OIE). Newcastle disease. In : Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 3rd Ed. OIE, Paris. -1996. -P.161-169