

*Н. Ю. Силко<sup>1,2</sup>, А. В. Глущенко<sup>2</sup>, Л. В. Шестопалова<sup>1</sup>, К. С. Юрченко<sup>1</sup>, К. В. Корчагина<sup>1</sup>,  
Ю. Г. Юшков<sup>3</sup>, М. Ю. Щелканов<sup>4</sup>, А. М. Шестопалов<sup>1,2</sup>*

## **Биологические свойства велогенных штаммов вируса болезни Ньюкасла, изолированных от птиц на Северном Кавказе**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; <sup>2</sup>ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Россельхознадзора; <sup>3</sup>ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Российской академии сельскохозяйственных наук; <sup>4</sup>ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России

Представлены результаты изучения биологических свойств двух штаммов вируса болезни Ньюкасла, изолированных от диких птиц водного экологического комплекса на Северном Кавказе: NDV/Adigeya/Duck/8/2008 и NDV/Adigeya/Duck/15/2008. Филогенетический анализ показал, что выделенные штаммы относятся к генотипу 7 генетического класса 2. С помощью молекулярно-генетического анализа установленных нуклеотидных последовательностей, включающих сайт протеолитического расщепления белка слияния, было установлено, что данный сайт относится к категории велогенных. Этот вывод был подтвержден экспериментами по тестированию патогенности на модели интрацеребрально инфицированных цыплят (ICPI — IntraCerebral Pathogenic Index — оказался равным 2). Патоморфологические исследования погибших цыплят позволили классифицировать изолированные штаммы как нейротропные с низкой висцеротропной активностью.

*Ключевые слова:* вирус болезни Ньюкасла, парамиксовирусы птиц, велогенные штаммы, висцеротропность, нейротропность

### **Biological Properties of Velogenic Strains of the Newcastle Disease Virus Isolated in the Northern Caucasian Region**

*N. Yu. Sylko<sup>1,2</sup>, A. V. Glushchenko<sup>2</sup>, L. V. Shestopalova<sup>1</sup>, K. S. Yurchenko, K. V. Korchagina<sup>1</sup>,  
Yu. G. Yushkov<sup>3</sup>, M. Yu. Shchelkanov<sup>4</sup>, A. M. Shestopalov<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> State Novosibirsk University, Novosibirsk, Russia; <sup>2</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rossel'khoz nadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia; <sup>3</sup> Institute of Experimental Veterinary, Russian Academy of Agricultural Sciences, Novosibirsk, Russia; <sup>4</sup> Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

The results of the biological property investigation of two Newcastle virus strains isolated in Northern Caucasian region – NDV/Adigeya/duck/8/2008 and NDV/Adigeya/duck/15/2008 – were presented. The phylogenetic analysis revealed that these strains belonged to genotype 7 of clade 2. Using molecular-biological analysis of established nucleotide sequences including proteolytic site of fusion peptide it was demonstrated that the strains were velogenic. This conclusion was proved by testing the pathogenicity on the model of intracerebral infected chickens (ICPI – IntraCerebral Pathogenic Index – was found to be 2). Pathomorphological study of dead chickens made it possible to classify strains as neurotropic with low level of visceral tropism.

*Key words:* Newcastle disease virus, avian paramyxoviruses, velogenic strains, viscerotropism, neurotropism

Вирус болезни Ньюкасла (ВБН), или парамиксовирус птиц 1-го типа (Paramyxoviridae, Avulavirus), является этиологическим агентом опасного заболевания птиц, протекающего с высоким уровнем смертности и способного наносить серьезный экономический ущерб [2, 3, 8]. Естественный резервуар ВБН — дикие птицы, при этом ВБН имеет обширный круг хозяев, поражая птиц как водно-околоводного, так и наземного экологического комплекса [1—8, 14]. Вирус передается пероральным и перназальным путем. В зависимости от тяжести заболевания выделяют 3 типа штаммов ВБН: лептогенные (вызывающие умеренное респираторное заболевание); мезогенные (нервные и респираторные расстройства с умеренной смертностью); велогенные (тяжелые кишечные или неврологические повреждения с высокой смертностью — до 100%) [7, 8]. Велогенные штаммы в свою очередь подразделяются на висцеротропные и нейротропные.

Благодаря вакцинации и техническому забою птиц при эпизоотиях можно достаточно эффективно контролировать вспышки болезни Ньюкасла у сельскохозяйст-

венных птиц. Тем не менее ВБН по-прежнему представляет потенциальную угрозу для птицеводства. Вспышки болезни Ньюкасла регистрируются по всему миру. Так, крупные эпизоотии имели место в Австралии [9], Корею [11] и Израиле [15]. В результате мониторинговых исследований диких птиц ВБН регулярно выявляется на всей территории Российской Федерации [1—7].

Целью настоящей работы является анализ биологических свойств велогенных штаммов ВБН, изолированных от диких птиц водного экологического комплекса на Северном Кавказе, развитие которого требует анализа рисков сельскохозяйственной деятельности, в том числе птицеводства.

#### **Материалы и методы**

Выделение вируса из полевого материала проводили по стандартной методике путем инокуляции тканевых гомогенатов в аллантоисную полость развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) [10].

Индикацию вируса в аллантоисной жидкости осуществляли с помощью реакции гемагглютинации

(РГА) и методом ОТ-ПЦР в реальном времени по стандартным методикам [4, 6, 12].

Нуклеотидную последовательность выделенных штаммов определяли с помощью набора для выделения РНК SV Total RNA Isolation System ("Promega Corporation", США) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с праймерами Random dN6 с использованием AMV обратной транскриптазы ("Fermentas", Литва). Секвенирование выполняли со специфическими праймерами, описанными ранее [12]. Продукты амплификации очищали, используя набор QIAquick PCR purification kit ("QIAGEN", США). ДНК секвенировали при помощи BigDye Terminator v3.1 kit ("Applied Biosystems", США) на автоматическом секвенаторе 3130xl Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США).

Тестирование патогенности штаммов проводили путем интрацеребрального заражения цыплят: 0,05 мл свежей аллантоисной жидкости вводили интрацеребрально 10 однодневным цыплятам. Состояние цыплят регистрировали каждые 8 ч. Индекс ICPI (IntraCerebral Pathogenic Index) определяли в соответствии со стандартными процедурами, рекомендованными Всемирной организацией здоровья животных [15].

Патоморфологические исследования выполняли после фиксации гистологического материала в 4% формалине на фосфатном буфере (рН 7,4) при температуре +4°C в течение 24 ч. Далее следовали стандартная проводка по спиртам возрастающей концентрации (70°, 80°, 90°, абсолютный спирт), бутанолу, ксилолу и заливка в парафиновую заливочную смесь HISTAMIX (Россия). С полученных парафиновых блоков делали срезы толщиной 3—5 мкм на санном микротоме MICROM HM 430 ("Carl Zeiss", Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа Axioimager A1 ("Carl Zeiss", Германия) и документировали с использованием фотокамеры AxioCam MRc ("Carl Zeiss", Германия).

### Результаты и обсуждение

Были исследованы образцы внутренних органов двух крякв (*Anas platyrhynchos*), найденных мертвыми в июле 2008 г. на территории Республики Адыгеи. В полученных образцах методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени было установлено наличие РНК ВБН. Исследование образцов на наличие РНК вируса гриппа А и НРА1/Н5N1 ("АмплиСенс", Россия) дали отрицательный результат.

Первичным материалом заражали РКЭ, в результате чего было выделено 2 штамма ВБН NDV/Adigeya/Duck/8/2008 и NDV/Adigeya/Duck/15/2008. Оба штамма показывали высокие титры в РГА на протяжении трех пассажей.

Значение ICPI для обоих штаммов составило 2, что указывает на высокую патогенность данных штаммов для кур [15]. Во время болезни наблюдались различные нейрорепитические расстройства, в том числе на-

рушение координации движений, характерное положение головы.

Для обоих выделенных штаммов с помощью секвенирования был выявлен генетический маркер патогенности в начальном сегменте F-гена. На основании полученных данных была восстановлена аминокислотная последовательность сайта протеолитического расщепления белка слияния. Данная последовательность содержала замены, характерные для велогенных штаммов (см. таблицу). Таким образом, генетический анализ подтвердил данные вирусологического анализа о высокой патогенности исследуемых изолятов.

Филогенетический анализ (рис. 1) показал, что выделенные штаммы относятся к генотипу 7 генетического класса 2; наиболее близкие штаммы были ранее выделены на территории Юго-Восточной Азии (преимущественно КНР) от домашних птиц (утки, гуси).

Для морфологического анализа от погибших в ходе экспериментальной инфекции цыплят были взяты пробы тканей головного мозга, трахеи, легкого и кишечника. В тканях головного мозга обнаружены признаки протекающей инфекции. Наблюдали периваскулярные отеки, нейроны в состоянии тигролиза (рис. 2, см. 3-ю полосу обложки). Эпителиоциты трахеи находились в состоянии гиперсекреции, свидетельствующей о развитии вирусной инфекции (рис. 3, см. 3-ю полосу обложки). В тканях легкого наблюдали отечность стромальных и паренхиматозных структур, кровенаполненность сосудов альвеолярных перегородок, образование гемморагий (рис. 4, см. 3-ю полосу обложки). Все это указывало на значительное повреждение легочных структур, вызванное вирусным агентом. В тканях кишечника видимые нарушения выявлены не были (рис. 5, см. 3-ю полосу обложки).

Результаты вирусологического и патоморфологического исследований позволяют отнести выделенные нами штаммы к велогенным нейротропным вариантам ВБН. На это указывает высокая патогенность (100% смертность экспериментально инфицированных цыплят) и наличие нейротропных признаков протекания болезни. Вместе с тем, несмотря на существенные нарушения тканевых структур органов системы дыхания и ЦНС, в кишечнике не были выявлены патоморфологические изменения, что позволяет сделать вывод об отсутствии висцеротропной специфичности у исследованных штаммов.

Данные филогенетического анализа свидетельствуют о генетической близости выделенных велогенных штаммов ВБН и штаммов, циркулирующих в Юго-Восточной Азии. Исследованные в данной работе варианты ВБН были отнесены к генотипу 7 генетического класса 2. Известно, что данный генотип является эндемичным для стран Юго-Восточной Азии и Южной Африки [13]. Наиболее вероятным представляется занос этого вирусного варианта с территории Африки, где зимует большое количество птиц как наземного, так и водно-околоводного комплекса. Однако возможен занос и из Юго-Восточной Азии в два этапа: сначала в Западную Сибирь, а оттуда — на юг европейской части

Аминокислотная последовательность сайта протеолитического расщепления белка слияния выделенных штаммов ВБН

Консенсусная последовательность	G	G	K	Q	G	R	L
NDV/Adigeya/Duck/8/2008	*	R	R	*	K	*	F
NDV/Adigeya/Duck/15/2008	*	R	R	*	K	*	F

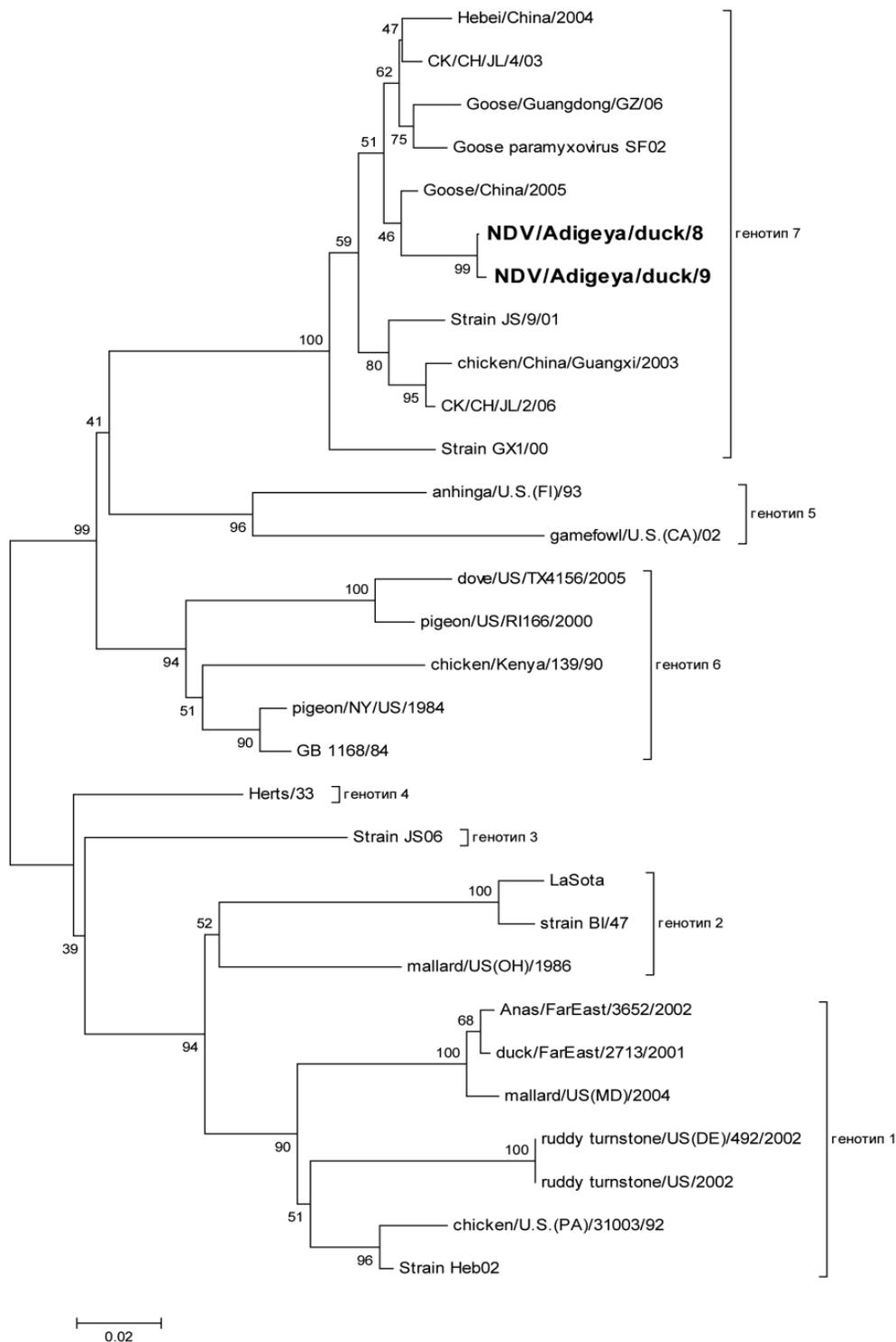


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное по нуклеотидной последовательности начального сегмента F-гена с помощью алгоритма "ближайшего соседа". Исследованные штаммы выделены жирным шрифтом.

России [2]. Последнее диктует необходимость обследования территории Западной Сибири на наличие велогенных штаммов ВБН генотипа 7.

Штаммы, наиболее близкие к NDV/Adigeya/Duck/8/2008 и NDV/Adigeya/Duck/15/2008, ранее выделялись от домашних гусей и уток [13]. Это указывает на способность одних и тех же вариантов ВБН поражать как домашних, так и диких птиц. В связи с этим не стоит недооценивать эпизоотическую роль

диких птиц в распространении высокопатогенных вирусов Ньюкасла на территории Евразии. В данной ситуации возможна модель переноса вируса дикими перелетными птицами с последующей передачей домашним, что может привести к стремительному усложнению эпизоотической ситуации, возникновению локальных вспышек заболевания с дальнейшим развитием в панзоотию. Нельзя исключать и обратную передачу вируса от домашних птиц диким с последующей реинтродукцией данного генетического варианта.

Если учесть, что в настоящее время наиболее распространенная в Российской Федерации вакцина против ВБН производится на основе штамма Ла Сота, принадлежащего к генотипу 2 генетического класса 2, а также то, что в ряде исследований была показана низкая эффективность данной вакцины против генотипа 7 [10], весьма важен вопрос постоянного мониторинга распространения велогенного генотипа 7 генетического класса 2 и разработки новой вакцины. В связи с этим следует сказать, что в ряде стран Юго-Восточной Азии ведутся работы по созданию вакцины с применением методов обратной генетики на основе аттенуированного варианта ВБН генотипа 7 с пониженной патогенностью [10].

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о проникновении велогенных вариантов ВБН генотипа 7 генетического класса 2 на территорию Российской Федерации. Дальнейший эколого-вирусологический мониторинг должен определить их эпизоотическую роль и уровень опасности для птицеводства.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д. К., Дерябин П. Г., Аристова В. А. и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: Изд-во НПЦ МЗ РФ; 2001. 192 с.

2. Львов Д. К., Ильичев В. Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекций. М.: Наука; 1979. 270 с.
3. Каверин Н. В., Львов Д. К. Парамиксовирусы (Paramyxoviridae). В кн.: Медицинская вирусология: Руководство. М.: МИА; 2008. 183—189.
4. Усачёв Е. В., Федякина И. Т., Щелканов М. Ю. и др. Молекулярно-генетическая характеристика вируса болезни Ньюкасла Sterna/Astrakhan/2755/2001, изолированного в России. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2006; 1: 14—20.
5. Усачёв Е. В., Щелканов М. Ю., Федякина И. Т. и др. Молекулярно-вирусологический мониторинг вируса болезни Ньюкасла (Paramyxoviridae, Avulavirus) в популяциях диких птиц дельты Волги (данные 2001 г.). Вопросы вирусологии. 2006; 51 (5): 32—38.
6. Щелканов М. Ю., Ананьев В. Ю., Львов Д. Н. и др. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края (2003—2006). Вопросы вирусологии. 2007; 52 (5): 37—48.
7. Щелканов М. Ю., Усачёв Е. В., Федякина И. Т. и др. Вирус болезни Ньюкасла в популяциях диких птиц на территории юга Приморского края в период осенних миграций 2001—2004 гг. Вопросы вирусологии. 2006; 51 (4): 37—41.
8. Alexander D. J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Rev. Sci. Tech. 2000; 19 (2): 443—462.
9. Gould A. R., Kattenbelt J. A., Selleck P. et al. Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998—2000. Virus Res. 2001; 77 (1): 51—60.
10. Hu S., Ma H., Wu Y. et al. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. Vaccine. 2009; 27 (6): 904—910.
11. Lee Y. J., Sung H. W., Choi J. G. et al. Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. Avian Pathol. 2004; 33 (5): 482—491.
12. Mia Kim L., Suarez D. L., Afonso C. L. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. J. Vet. Diagn. Invest. 2008; 20 (4): 414—425.
13. Miller P. J., Decanini E. L., Afonso C. L. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. Infect. Genet. Evol. 2010; 10 1. — P. 26—35.
14. Morens D. M., Folkers G. K., Fauci A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature. 2004; 430 (6996): 242—249.
15. OIE Summary of Immediate notifications and Follow-ups — 2011 ([http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_immediate\\_summary](http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_immediate_summary)).

Поступила 31.05.12

## ЮБИЛЕЙ

### Раиса Яковлевна Подчерняева (к 80-летию со дня рождения)



26 февраля 2013 г. исполняется 80 лет со дня рождения руководителя лаборатории культур тканей, доктора медицинских наук, профессора Подчерняевой Раисы Яковлевны.

Р.Я. Подчерняева — известный ученый в области вирусологии, автор более 350 научных работ, опубликованных в отечественных и зарубежных журналах, ряда патентов и монографий, авторских свидетельств и методических рекомендаций, применяемых в практике здравоохранения.

Научные исследования Р.Я. Подчерняевой посвящены профилактике и лечению вирусных инфекций.

В последние годы Р.Я. Подчерняева руководит лабораторией культур тканей, на базе которой создана Российская коллекция клеточных культур, включенная в число национальных коллекций культур мира. В настоящее время она занимается актуальными вопросами контроля качества клеточных линий, применяемых как субстраты при создании живых вакцинных препаратов, а также инновационными разработками в биотехнологических исследованиях.

Р.Я. Подчерняева — академик РАЕН, ведущий вирусолог ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.В. Ивановского Минздрава России, член Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов, паразитологов и вирусологов им. И.И. Мечникова, член Российской ассоциации цитологов, член Американского биографического центра. Она награждена серебряной медалью "Выдающийся ученый XX столетия" Международного биографического центра Кембридж (Англия, 1999 г.), медалью имени Павлова РАЕН "За развитие медицины и Здравоохранения" (2003 г.), имеет знак "Отличнику здравоохранения". С 1959 г. Р.Я. Подчерняева работает в НИИ вирусологии, все эти годы она активно участвует в общественной жизни института, пользуется заслуженным авторитетом в научном мире и у сотрудников института.

*Редколлегия журнала "Вопросы вирусологии" поздравляет Раису Яковлевну с юбилеем и желает ей крепкого здоровья, счастья, дальнейших творческих успехов.*