

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Карамендин К.О., Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Касымбеков Е.Т., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Хан Е.Я.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ AVIAN AVULAVIRUS 20, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДИКИХ ПТИЦ

НПЦ микробиологии и вирусологии, Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103

Введение. В 2013–2014 гг. на территории Казахстана от диких птиц были выделены ранее не описанные в науке штаммы парамиксовирусов, впоследствии идентифицированные как представители нового вида – *Avian avulavirus 20*.

Цель и задачи исследований заключались в молекулярно-генетической характеристике изолятов новых авулавиров и определении их филогенетических взаимоотношений.

Материал и методы. Биологическими образцами в виде клоакальных и трахеальных смывов от диких птиц заразили развивающиеся куриные эмбрионы с последующим выделением культуры вирусов. Полные нуклеотидные последовательности геномов вирусов получены методом массового параллельного секвенирования нуклеиновых кислот вирусов с биоинформационной обработкой результатов.

Результаты. При первичном заражении куриных эмбрионов пробами от 179 диких птиц, относящихся к семействам утиные, чайковые, бекасовые и ржанковые, выделены 19 гемагглютинирующих агентов, из которых 5 впоследствии оказались представителями новых видов парамиксовирусов. Исследование секвенированных последовательностей их геномов выявило их идентичность по размерам, но значительную генетическую вариабельность внутри вида. Выявлены 2640 нуклеотидных замен, из них 273 оказались несинонимическими, т.е. оказывали влияние на белковую структуру вирусов. Показано, что изоляты *Avian avulavirus 20*/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013 и *Avian avulavirus 20*/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 оказались на 86 и 95% соответственно идентичны ранее описанному референсному штамму, что свидетельствует о значительной эволюционной дивергенции внутри вида.

Обсуждение. Авторы предполагают существование двух независимых линий – Каспийской, представленной референсным Актау/5976 и Атырау/5541, а также географически значительно отдалённой Балхашской линии.

Заключение. Проведённые исследования подтверждают, что птицы семейства чайковые являются основным резервуаром *Avian avulavirus 20* в орнитофауне, играют ключевую роль в поддержании авулавиров в биосфере и представляют потенциальный источник возникновения новых вариантов. Непрерывное наблюдение за ними в дикой природе – одна из важнейших задач при обеспечении безопасности птицеводства.

Ключевые слова: парамиксовирус; секвенирование; *Avian avulavirus 20*; серотип; эволюция; дикая птица; Казахстан; чайка.

Для цитирования: Карамендин К.О., Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Касымбеков Е.Т., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Хан Е.Я. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Avian avulavirus 20*, выделенных от диких птиц. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4):185-192. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-185-192>

Информация об авторах:

Карамендин К.О., <https://orcid.org/0000-0003-0829-3330>

Саятов М.Х., <https://orcid.org/0000-0003-4740-9156>

Кыдырманов А.И., <https://orcid.org/0000-0002-8374-6128>

Касымбеков Е.Т., <https://orcid.org/0000-0002-8773-4984>

Асанова С.Е., <https://orcid.org/0000-0002-7259-5539>

Даулбаева К.Д., <https://orcid.org/0000-0001-5618-3385>

Хан Е.Я., <https://orcid.org/0000-0002-6279-3419>

Для корреспонденции: Карамендин Кобей Омертаевич, канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии вирусов НПЦ микробиологии и вирусологии, Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103. E-mail: kobey.karamendin@gmail.com

Karamendin K.O., Sayatov M.Kh., Kydyrmanov A.I., Kasymbekov E.T., Asanova S.E., Daulbayeva K.D., Khan E.Ya.

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF AVIAN AVULAVIRUS 20 STRAINS ISOLATED FROM WILD BIRDS

SPC for Microbiology and Virology, Almaty, 050010, Kazakhstan

Introduction. Previously unknown paramyxovirus strains were isolated from wild birds in 2013–2014 in Kazakhstan and subsequently identified as representatives of the novel *Avian avulavirus 20* species. The aims and tasks were molecular genetic characterization of novel avulaviruses and investigation of their phylogenetic relationships.

Material and methods. Embryonated chicken eggs were inoculated with cloacal and tracheal swabs from wild birds with subsequent virus isolation. The complete nucleotide sequences of viral genomes were obtained by massive parallel sequencing with subsequent bioinformatics processing.

Results. By initial infection of chicken embryos with samples from 179 wild birds belonging to the *Anatidae*, *Laridae*, *Scolopacidae* and *Charadriidae* families, 19 hemagglutinating agents were isolated, and five of them were identified as representatives of new viral species. The study of their sequenced genomes revealed their similarity in size, but there was a significant genetic variability within the species. 2,640 nucleotide substitutions were identified and 273 of them were non-synonymous, influencing the protein structure of viruses. It was shown that isolates *Avian avulavirus 20*/black-headed gull/Balkhash/5844/2013 and *Avian avulavirus 20*/great black-headed gull/Atyrau/5541/2013 were 86% and 95% respectively identical to the previously described reference strain, indicating a significant evolutionary divergence within species.

Discussion. The authors suggest the existence of two independent lineages - the Caspian, represented by the reference strain Aktau/5976 and Atyrau/5541, as well as the second, geographically significantly distant Balkhash lineage.

Conclusion. The study confirms the role of the birds of the *Laridae* family as the main reservoir of Avian avulavirus 20 in the avifauna that plays a key role in maintaining viruses of the genus *Avulavirus* in the biosphere and is a potential natural source for the emergence of new viral variants. Continuous surveillance of them in the wild is one of the most important tasks in ensuring the safety of the poultry industry.

Keywords: paramyxovirus; sequencing; Avian avulavirus 20; serotype; evolution; wild bird; Kazakhstan; gull.

For citation: Karamendin K.O., Sayatov M.Kh., Kydyrmanov A.I., Kasymbekov E.T., Asanova S.E., Daulbayeva K.D., Khan E.Ya. Molecular-genetic characterization of Avian avulavirus 20 strains isolated from wild birds. *Voprosy Virusologii* (Problems of Virology, Russian journal). 2019; 64(4): 185-192. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-185-192>

For correspondence: Kobey O. Karamendin, PhD, DVM, Leading researcher, Laboratory of Viral Ecology, SPC for Microbiology and Virology, SPC for Microbiology and Virology, Almaty, 050010, Kazakhstan. E-mail: kobey.karamendin@gmail.com

Information about authors:

Karamendin K.O., <https://orcid.org/0000-0003-0829-3330>

Sayatov M.Kh., <https://orcid.org/0000-0003-4740-9156>

Kydyrmanov A.I., <https://orcid.org/0000-0002-8374-6128>

Kasymbekov E.T., <https://orcid.org/0000-0002-8773-4984>

Asanova S.E., <https://orcid.org/0000-0002-7259-5539>

Daulbayeva K.D., <https://orcid.org/0000-0001-5618-3385>

Khan E.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-6279-3419>

Acknowledgments. This work was supported by grants from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan: AP05131549 «Research of the virome of migratory birds as a source of transcontinental transmission of the human and animal infectious diseases pathogens» and AP0513370 «Molecular evolution of novel for science paramyxoviruses circulating among wild birds in Kazakhstan».

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 07 September 2018

Accepted 31 October 2018

Введение

Парамиксовирусы птиц (ПМВ) – РНК-содержащие вирусы, относящиеся к роду *Avulavirus* в составе семейства *Paramyxoviridae*, способные вызывать заболевания с различными клиническими проявлениями у диких и домашних птиц. До недавнего времени они включали 9 антигенно отличающихся серотипов (ПМВ-1 – ПМВ-9) [1], которые в последнее годы дополнены 11 новыми серотипами ПМВ-10 – ПМВ-20.

ПМВ-1, известный как вирус болезни Ньюкасла (ВБН), является высокопатогенным агентом, вызывающим массовые заболевания и гибель среди поголовья птиц во всём мире. Другие серотипы вызывают респираторные и другие заболевания меньшей степени тяжести у различных представителей орнитофауны [2]. Экспериментальные исследования и практические наблюдения показывают, что ПМВ-2, -3, -6 и -7 способны вызывать заболевания с разной патогенностью у домашних птиц [3–5]. Так, штаммы ПМВ-6 связаны с заболеваниями органов дыхания лёгкой степени и со снижением яйценоскости у индеек [6]. ПМВ-3 и -5 (вирус *Kunitachi*) вызывали болезни лёгких с тяжёлыми проявлениями у диких птиц [7,8]. ПМВ-4, -8, -9 и -10 были выделены от уток, водоплавающих и других диких видов птиц, у которых отсутствовали какие-либо клинические признаки заболевания [9–11]. ПМВ-4 выделен в основном от диких птиц отряда пластинчатоклювых [12], домашних уток и гусей, предположительно заразившихся в результате непосредственного контакта с их дикими сородичами [13]. Экспериментальная инфекция кур ПМВ-4 и 6 показала умеренную дыхательную патологию

и возможность передачи вируса от дикой птицы к домашней [14].

ПМВ-1 – ПМВ-9 были выделены и охарактеризованы в 1970-х годах. В результате совершенствования технологий секвенирования с 2001 г. было обнаружено 11 новых серотипов. Вирус, выделенный от хохлатого пингвина в 2007 г., антигенно и генетически отличался от всех известных к тому времени серотипов и стал представителем новой группы – ПМВ-10 [15]. Следующий новый изолят (ПМВ-11) был выделен во Франции от бекаса в 2010 г. [16]. ПМВ-12 был изолирован в Северной Италии в 2005 г. от утки свизии [17]. Сразу 3 публикации, вышедшие примерно в одно время, описывают ПМВ-13, независимо выделенный в трёх отдельных регионах Евразии – в Японии, Казахстане и Украине [18–20]. В 2017 г. было объявлено о 6 новых серотипах ПМВ: от уток в Японии [21] и Кореи [22], от кулика в Бразилии [23]. Ещё 3 новых серотипа были одновременно выделены от антарктических пингвинов [24]. С 2013 по 2014 г. в Казахстане выявлен новый для науки серотип ПМВ-20 [25], чьё генетическое разнообразие и экология ранее не были описаны и который охарактеризован как вирус – представитель чайковой линии. Приведённые данные показывают, что ПМВ птиц широко распространены в диких популяциях и высока вероятность появления новых генетически различных вариантов.

Следует отметить, что, согласно новой утверждённой классификации Международного комитета по таксономии вирусов, ПМВ птиц серотипов 1–20, получили новое видовое наименование «*Avian avulavirus* 1–20». Далее в тексте будем придерживаться новой классификации.

Целью настоящей работы было изучение молекулярно-генетических свойств изолятов нового вида *Avian avulavirus* 20, выделенных в разные годы в удалённых друг от друга регионах Казахстана и провести их сравнительные филогенетические исследования. В предыдущей работе [25] показаны сравнительные характеристики изолята *Avian avulavirus* 20 с существующими видами рода *Avulavirus* по морфологии, патогенности, ростовым свойствам, а также их филогенетические взаимоотношения. Данная статья описывает молекулярную эволюцию внутри данного вида, содержит более детальное описание структуры генома вирусов, а также подтверждает роль чаек как основного резервуара в орнитофауне.

Материал и методы

Биологические материалы в виде клоакальных и трахеальных смывов получены от диких птиц, согласно требованиям Международного эпизоотического бюро [26]. Пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196 °C).

Изоляцию вирусов и восстановительные пассажи проводили путём инокуляции каждой пробы вируса в 9-10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) и последующей инкубации их при температуре 36 °C в течение 48 ч по сертифицированным методикам, рекомендованным ВОЗ [27].

Вирусные РНК выделены с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией проводили с использованием праймеров к консервативному фрагменту L-гена, общему для всех ПМВ [28]. Реакцию проводили в термоциклере «Eppendorf Gradient» при следующих параметрах: обратная транскрипция при 48 °C 45 мин, начальная 2-минутная денатурация при 95 °C и амплификация в 30 циклов, включающая денатурацию (94 °C, 30 с), отжиг праймеров (55 °C, 30 с) и удлинение цепи (72 °C, 30 с) с последующей окончательной элонгацией при 72 °C, 10 мин.

Секвенирование продуктов ПЦР по Сенгеру проводили с использованием терминирующих дидеоксирибонуклеотидов на автоматическом 8-капиллярном секвенаторе «ABI 3500 DNA Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Подготовку библиотек для массового параллельного секвенирования осуществляли с помощью набора NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, США) согласно прилагаемому протоколу. Фрагментацию РНК проводили до размеров около 400–450 п.о. с применением ферментативного метода, используя двухвалентные катионы в составе набора. Качество приготовленных библиотек проверяли на приборе «Bioanalyzer 2100» (Agilent Technologies, Германия). Секвенирование проводили с использованием комплекта MiSeq Reagent v.3 (Illumina, США) на секвенаторе нового поколения «MiSeq» (Illumina, США).

Биоинформационный анализ полученных в результате секвенирования последовательностей проведён с

использованием компьютерной программы Geneious 11.0 (Biomatters, Новая Зеландия).

Выравнивание и филогенетический анализ секвенированных генов с нуклеотидными последовательностями из GenBank проводили с помощью компьютерной программы MEGA 6.0 методом максимального правдоподобия на основании 500 выборов, модель GTR [29].

Результаты

Выделение и идентификация вирусов. Проведён вирусологический скрининг в РКЭ 204 биологических образцов в виде клоакальных и трахеальных смывов, собранных в 2013 г. в Западном, Юго-Восточном и Центральном Казахстане от 165 диких птиц водного и околородного комплексов, относящихся к семействам утиные (*Anatidae*), чайковые (*Laridae*), бекасовые (*Scolopacidae*) и ржанковые (*Charadriidae*) из отрядов гусеобразные (*Anseriformes*) и ржанкообразные (*Charadriiformes*). В мае 2014 г. были собраны материалы в виде свежих фекалий от 14 чаек в Западном Казахстане.

В результате первичного заражения пробами 10-дневных РКЭ выделены 19 гемагглютинирующих агентов. Идентификация их в ПЦР с праймерами к консервативному участку L-гена, общему для всех ПМВ, позволила отнести 17 гемагглютинирующих агентов к этому семейству.

Осуществлено секвенирование продуктов амплификации L-гена методом Сенгера. При проведении BLAST-анализа в GenBank установлена принадлежность одного из изолятов к *Avian avulavirus* 1, шести – к *Avian avulavirus* 8, четырех – к *Avian avulavirus* 13 и ещё одного – к *Avian avulavirus* 6. Пять оставшихся неидентифицированными изолятов ПМВ 2013 и 2014 гг. выделения показали значительное генетическое расхождение по консервативному фрагменту L-гена с известными в науке видами рода *Avulavirus*. Это позволило предположить, что в Казахстане циркулируют новые, ранее неизвестные ПМВ.

С целью дальнейшей идентификации новых ПМВ осуществляли их массовое параллельное секвенирование на приборе «MiSeq» с последующим BLAST-анализом. В результате изоляты были идентифицированы и получили обозначение *Avian avulavirus* 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 (№ MN844488 в GenBank) и *Avian avulavirus* 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013 (№ MN844489 в GenBank). Ранее из этой группы были описаны штаммы *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5976/2014 (№ MF033136 в GenBank), *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5977/2014 и *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5979/2014, при этом первый из них обозначен как референсный штамм для всего серотипа [25]. Таким образом, в трёх значительно удалённых друг от друга регионах Казахстана и в разное время выделены 5 штаммов – представителей нового вида *Avian avulavirus* 20.

Полногеномное секвенирование изолятов *Avian avulavirus* 20. В результате секвенирования на приборе Illumina «MiSeq» получены в общей сложности от 504 106

до 881 691 прочтений с обоих концов библиотек, которые впоследствии выравнивались на группу контрольных последовательностей, включающих все известные ПМВ птиц с дальнейшим формированием консенсуса.

Были получены полные нуклеотидные последовательности всех 6 генов изолятов *Avian avulavirus* 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 и *Avian avulavirus* 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013. Установлен следующий порядок их очерёдности: 3'-NP-P/V/W-M-F-HN-L-5', которые кодируют 8 белков: NP – 459 аминокислотных остатков (а.о.), P – 431 а.о.; V – 263 а.о.; W – 165 а.о.; M – 376 а.о.; F – 537 а.о.; HN – 574 а.о. и L – 2242 а.о., что соответствует размерам генов референсного вируса *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5976/2014.

Размеры геномов вновь полученных последовательностей вирусов *Avian avulavirus* 20 были сопоставимы с таковой описанного эталонного штамма и включали 15 954 нуклеотидных основания (н.о.), что согласуется с «правилом шести», характерным для большинства ПМВ птиц.

Последовательности геномов новых казахстанских изолятов *Avian avulavirus* 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 и *Avian avulavirus* 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013 оказались на 95 и 86% соответственно идентичны референсному штамму. Выравнивание позволило обнаружить области со значительными нуклеотидными расхождениями, неравномерно распределёнными по всей протяжённости генома.

Как известно, геномная РНК ПМВ представляет собой единую нить, содержащую концевые участки: лидерный на 3'-конце (как правило, 55 н.о.) и трейлерный на 5'-конце (50–776 н.о.). У исследуемого изолята *Avian avulavirus* 20 определена протяжённость 3'-лидерного концевого участка как 55 н.о., что является характерной длиной для всего семейства. Выявлены 2 нуклеотидные замены T45C и G50A у изолята Балхаш/5844, а также уникальная замена C30T у изолята Атырау/5541. Длина 5'-трейлерного концевого участка составила 248 н.о. и здесь также обнаружены 87 нуклеотидных замен. Следует отметить высокую степень комплементарности концевых участков между собой в 20 начальных нуклеотидов с обоих 3'- и 5'-концов, что свидетельствует о возможном наличии промоторных элементов в этих регионах.

В начале каждого гена присутствует консервативный участок, так называемый gene-start, функционирующий, как сигнал начала транскрипции. В конце нуклеотидной последовательности каждого гена имеется короткий полиуридиловый участок, так называемый gene-end, являющийся сигналом аденилирования и одновременно терминации синтеза мРНК. Установлена последовательность C₅GCUGG стартового фрагмента гена, одинаковая для всех генов *Avian avulavirus* 20, и она оказалась сходной с таковой *Avian avulavirus* 15. При этом участок сигнала терминации оказался вариативным для разных генов *Avian avulavirus* 20: AAUUCU₆ для NP, F, HN и L-генов, AAUUUAU₆ для P-гена, а также GAU₈ для M-гена.

Гены ПМВ птиц отделены друг от друга межген-

ными участками. Количество нуклеотидов в них у разных ПМВ варьирует, только лишь у вирусов родов *Respirovirus* и *Morbillivirus* каждый межгенный участок содержит одинаковое количество нуклеотидов (3). У *Avian avulavirus* 20 межгенные участки содержали от 8 (между NP и P) до 26 (между M и F) нуклеотидов.

Сравнительный молекулярный анализ изолятов Avian avulavirus 20. Казахские изоляты *Avian avulavirus* 20 обнаружили значительную генетическую вариативность между собой и содержали в общей сложности 2640 нуклеотидных замен, из которых 273 оказались несинонимическими, т.е. изменяющими аминокислотную структуру.

Ген нуклеопротеина (NP) *Avian avulavirus* 20 имеет в составе 1380 н.о. и кодирует 459 аминокислот. Выявлены аминокислотные замены в 13 позициях (см. таблицу). Все изоляты содержали аминокислотный фрагмент 324-FAPANYSTLYSYAMG-338, который соответствует консервативной последовательности F-X4-YX3-Ф-S-Ф-A-M-G (где X – любая аминокислота, а Ф – ароматическая аминокислота), обнаруживается у всех представителей семейства *Paramyxoviridae* и считается ответственным за N-N самосборку во время РНК-связывания [30].

Ген фосфопротеина (P) длиной 1296 н.о. кодирует одноименный белок, состоящий из 431 аминокислоты. Казахский изолят Балхаш/5844 отличался от референсного штамма по 83 аминокислотным заменам, изолят Атырау/5541 имел отличие в 17 аминокислотных замен. По белковому составу фосфопротеина наблюдали наименьший процент сходства в 96% между исследуемыми и референсным штаммами, что позволило считать кодирующий его ген наиболее вариативным среди остальных.

Известно, что у большинства вирусов семейства *Paramyxoviridae* ген P содержит информацию для синтеза нескольких белков, что достигается за счёт наличия в мРНК дополнительных рамок считывания или с помощью вставки дополнительных G-нуклеотидов при транскрипции.

Ген P исследуемых изолятов *Avian avulavirus* 20 в позициях 2175–2183 содержал сайт AAAAGGGGG для вставки дополнительных нуклеотидов G. Выявлено, что мРНК без вставок у данного вида кодирует белок P длиной 431 аминокислоты, а мРНК с вставкой одного остатка G кодирует белок V длиной 263 аминокислоты, вставка двух остатков G кодирует белок W длиной 165 аминокислот и у обоих C-концевая часть (начиная от места вставки) иная, чем у белка P.

Матриксный ген (M) казахских изолятов *Avian avulavirus* 20 имеет длину 1131 н.о. и кодирует одноименный белок в 376 аминокислот. По этому гену выявлены аминокислотные замены в 17 позициях. Наряду с NP он оказался наиболее консервативным с наименьшим количеством замен.

Ген белка слияния (F) имеет длину 1614 н.о. и кодирует одноименный белок в 537 аминокислот. Сайт расщепления белка имеет аминокислотную последовательность GEQQAR↓LIG, где отсутствуют основные аминокислоты, что характерно для непатогенных вариантов. По

этому гену выявлены аминокислотные замены в 40 позициях. Также данный белок характеризуется наличием сайтов гликозилирования, которые потенциально могут влиять на формирование вирусных частиц, связывание вируса с клеткой и патогенез. У изолята Атырау/5541 и референсного штамма Актау/5976 зарегистрированы 6 таких сайтов в позициях 61, 74, 432, 456, 467 и 483. На один сайт меньше у изолята Балхаш/5844 из-за аминокислотной замены Н467N.

Ген гемагглютинин-нейраминидазы (HN) имеет длину 1725 н.о. и кодирует одноименный белок в 574 аминокислот. Он содержит 6 консервативных аминокислот 234-N-R-K-S-C-S-239, ответственных за прикрепление к сиаловой кислоте на поверхности клетки [31]. По этому гену выявлены аминокислотные замены в 37 позициях.

Самый большой по размеру вирусный ген L, кодирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу, имеет длину 6729 н.о. и кодирует одноименный белок в 2242 аминокислоты. По этому гену выявлены аминокислотные замены в 83 позициях. Он содержит 5 консервативных аминокислот 775-QGDNQ-779 в домене III, как и у многих минус-нитевых несегментированных РНК-вирусов, и считается принимающим участие в транскрипционной активности [32].

Филогенетический анализ новых казахстанских штаммов Avian avulavirus 20. С использованием компьютерной программы Mega 6.0 проведён филогенетический анализ генов новых изолятов между собой и в сравнении с другими из международной базы данных GenBank. Результаты представлены на рисунке.

Как видно из рисунка, казахстанские изоляты *Avian avulavirus 20* вместе с другими видами *Avian avulavirus 2, 8, 10* и *15* образовали отдельную монофилетическую группу. Внутри данной группы казахстанские ПМВ сформировали отдельный кластер, что свидетельствует об их значительной филогенетической отдалённости от других видов и ином эволюционном происхождении. Также видно, что изоляты из Северного Каспия: референсный штамм *Avian avulavirus 20/чайка/Актау/5976/2014* и изолят *Avian avulavirus 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013* – сформировали отдельную ветвь от изолята *Avian avulavirus 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013*, выделенного в другом географически удалённом регионе Юго-Восточного Казахстана, что также подтверждает данные об их значительной генетической вариабельности.

Обсуждение

Казахстан обладает огромной территорией, пересекаемой трансконтинентальными путями миграций птиц, которые концентрируются в естественных ландшафтах во время пролёта и гнездования [33].

Дикие птицы, преимущественно водоплавающие, известны как основные резервуары *Avian avulavirus 4, 6, 8* и *9* в природе [34, 35]. Несмотря на обширные исследования, проведенные с *Avian avulavirus 1* по всему миру, сведений о молекулярно-биологических свойствах и патогенности остальных видов рода *Avulavirus* недостаточно.

В Казахстане относительно широко изучены эволюционные взаимоотношения различных штаммов *Avian avulavirus 1*, выделенных в разные годы [36–39]. Авторами показано, что на территории республики среди домашних птиц одновременно циркулировали вирусы нескольких генотипов. О других видах в республике имелись лишь единичные сообщения, опубликованные в конце 1980-х годов, и они касаются только *Avian avulavirus 2* [40]. С развитием технологий массового параллельного секвенирования 5 видов рода *Avulavirus 4, 6, 8* и новые виды *Avian avulavirus 13* [18–20] и *20* [25] были выделены от диких птиц в последнее время в Казахстане.

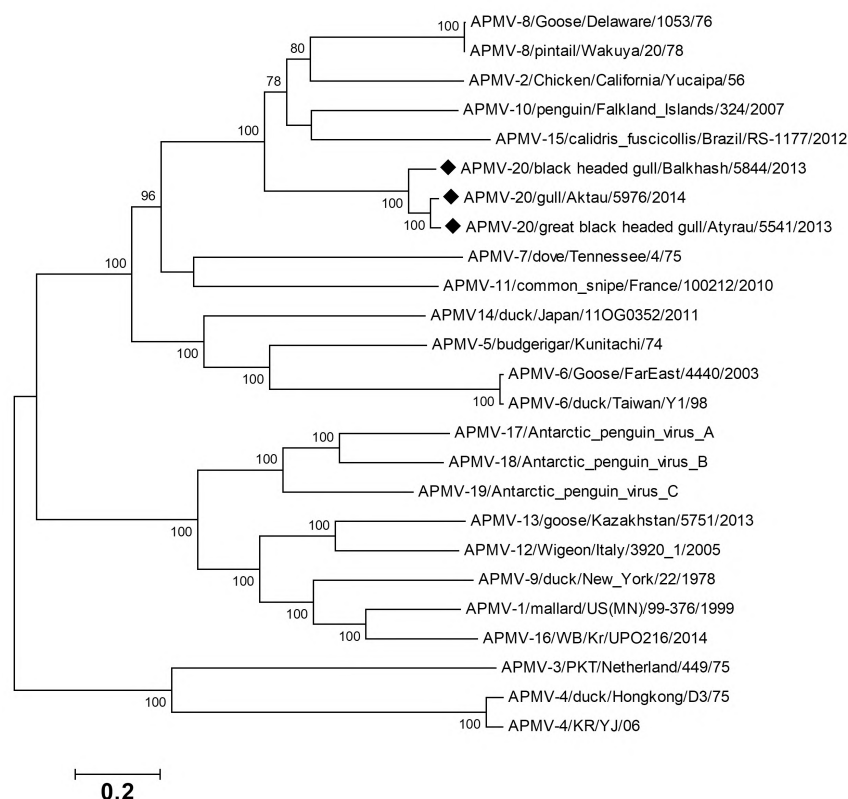
В статье представлены результаты молекулярно-генетических и филогенетических исследований изолятов нового вида *Avian avulavirus 20*, выделенных в разные годы в удалённых друг от друга регионах Казахстана. Анализ полученной полной нуклеотидной последовательности вирусов позволил обнаружить в её составе 6 открытых рамок считывания, которые кодируют 8 вирусных белков. Сопоставление между собой РНК штаммов *Avian avulavirus 20* показало их идентичность между собой по размерам, но выявлена значительная генетическая вариабельность внутри серотипа. В общей сложности выявлены 2640 нуклеотидных замен, из которых 273 оказались несинонимическими. Все нуклеотидные расхождения оказались распределёнными неравномерно по всей протяжённости генома. Наиболее консервативными на каждые 100 нуклеотидов генома оказались гены внутренних белков М, NP и L, что характерно для большинства известных вирусов.

Интересно, что наиболее генетически вариабельным на каждые 100 нуклеотидов оказался Р-ген, где выявлены 83 несинонимичные нуклеотидные замены. Подобную картину авторы данной статьи наблюдали при исследовании штамма *Avian avulavirus 16* (неопубликованные данные), похожий феномен выявлен при описании ВБН генотипа VI [41], где было высказано предположение, что существенная вариабельность в области Р-гена может объясняться участием продуцируемого им белка в процессе приспособления вируса к новым хозяевам за счёт эффективного преодоления внутренней защиты в виде выработки интерферона и апоптоза. В 2 раза меньшее количество несинонимических замен в генах F и HN, представляющих собой поверхностные гликопротеины оболочки вируса и являющиеся главной мишенью иммунного ответа хозяина, авторы объясняют как косвенное свидетельство незначительного влияния антигенного дрейфа в эволюции ПМВ.

Полногеномные последовательности новых казахстанских изолятов *Avian avulavirus 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013* и *Avian avulavirus 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013* оказались на 86 и 95% соответственно идентичны референсному штамму, что свидетельствует о значительной эволюционной дивергенции внутри серотипа. В данном случае можно говорить о существовании двух независимых линий –

Аминокислотные замены в вирусных белках штаммов *Avian aviavirus* 20

		Вирусный белок	
		NP	P
Замена			
в позиции			
Акту/5976	182		
Атырау/5541	180		
Балхаш/5844	179		
	178		
	176		
	175		
	174		
	169		
	165		
	162		
	159		
	157		
	153		
	151		
	144		
	140		
	126		
	120		
	116		
	113		
	109		
	102		
	101		
	100		
	98		
	96		
	95		
	94		
	92		
	91		
	87		
	86		
	85		
	81		
	80		
	78		
	77		
	72		
	69		
	68		
	66		
	64		
	63		
	62		
	60		
	59		
	46		
	45		
	36		
	448		
	445		
	444		
	442		
	439		
	438		
	434		
	433		
	425		
	419		
	418		
	142		
	111		
Замена			
в позиции			
Акту/5976	79		
Атырау/5541	57		
Балхаш/5844	16		
	15		
	13		
	12		
	8		
	5		
	4		
	3		
	2		
	375		
	370		
	366		
	350		
	343		
	341		
	305		
	302		
	253		
	249		
	215		
	196		
	84		
	74		
	34		
	29		
	13		
	409		
	382		
	378		
	373		
	366		
	355		
	352		
	348		
	341		
	274		
	252		
	251		
	250		
	248		
	243		
	235		
	234		
	230		
	228		
	222		
	216		
	214		
	213		
	210		
	209		
	203		
	202		
	200		
	199		
	197		
	196		
	192		
	184		
	183		
Замена			
в позиции			
Акту/5976	482		
Атырау/5541	466		
Балхаш/5844	465		
	460		
	437		
	385		
	380		
	375		
	361		
	328		
	325		
	323		
	293		
	290		
	287		
	285		
	284		
	282		
	271		
	257		
	170		
	164		
	151		
	147		
	109		
	99		
	94		
	85		
	70		
	65		
	45		
	43		
	12		
	521		
	520		
	519		
	514		
	506		
	498		
	477		
	467		
	459		
	433		
	424		
	408		
	407		
	396		
	394		
	382		
	312		
	296		
	264		
	263		
	258		
	246		
	162		
	155		
	105		
	103		
	100		
	96		
	86		
Замена			
в позиции			
Акту/5976	1747		
Атырау/5541	1746		
Балхаш/5844	1745		
	1720		
	1669		
	1662		
	1635		
	1578		
	1561		
	1416		
	1285		
	1275		
	1271		
	1190		
	1164		
	1130		
	1040		
	973		
	937		
	917		
	798		
	732		
	730		
	641		
	640		
	631		
	537		
	530		
	427		
	425		
	416		
	396		
	358		
	350		
	338		
	334		
	322		
	298		
	286		
	279		
	269		
	251		
	238		
	233		
	228		
	175		
	165		
	129		
	125		
	100		
	93		
	90		
	85		
	83		
	82		
	75		
	73		
	41		
	526		
	522		
	501		
	488		
Замена			
в позиции			
Акту/5976	2233		
Атырау/5541	2224		
Балхаш/5844	2200		
	2182		
	2174		
	2164		
	2161		
	2138		
	2137		
	2092		
	2062		
	2002		
	1983		
	1952		
	1911		
	1907		
	1900		
	1875		
	1808		
	1778		
	1774		
	1768		
	1767		
	1765		
	1761		
Замена			
в позиции			
Акту/5976	2233		
Атырау/5541	2224		
Балхаш/5844	2200		
	2182		
	2174		
	2164		
	2161		
	2138		
	2137		
	2092		
	2062		
	2002		
	1983		
	1952		
	1911		
	1907		
	1900		
	1875		
	1808		
	1778		
	1774		
	1768		
	1767		
	1765		
	1761		



Филогенетические взаимоотношения новых казахстанских *Avian avulavirus* 20 между собой и в сравнении с другими серотипами из международной базы данных GenBank.

Каспийской, представленной референсным штаммом Актау/5976 и изолятом Атырау/5541, а также Балхашской линии, географически значительно отдалённой от первой.

Филогенетические исследования подтверждают разделение на 2 отдельные линии: на дендрограмме видно, что изоляты из Северного Каспия референсный штамм *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5976/2014 и изолят *Avian avulavirus* 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 – сформировали отдельную ветвь от изолята *Avian avulavirus* 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013, выделенного в Юго-Восточном Казахстане.

Данное исследование также подтверждает приоритетную роль чайковых как основного носителя *Avian avulavirus* 20 в природе, так как вирусы этого вида выделены исключительно от птиц этого семейства в разные годы и в удалённых друг от друга регионах.

Дикая фауна играет ключевую роль в поддержании вирусов рода *Avulavirus* в биосфере и является потенциальным природным источником возникновения новых вариантов. Экспериментальные исследования на примере ВБН показали, что дикие птицы способны распространять и заносить слабо- или непатогенные варианты в популяцию домашних птиц, которые через несколько пассажей *in vivo* зачастую приобретают высокопатогенные свойства [42]. По этой причине непрерывное наблюдение за вирусами рода *Avulavirus* в дикой природе является одной

из важнейших задач при обеспечении безопасности птицеводства.

Кроме этого, имеются скудные сведения о молекулярной биологии вирусов рода *Avulavirus* в популяциях диких птиц, и исследования в этом направлении имеют определённый эпидемиологический интерес, что важно для разработки вакцин в случае появления новых патогенных штаммов.

Финансирование. Данная работа профинансирована грантами Министерства образования и науки Республики Казахстан AP05131549 «Изучение виroma перелетных птиц как источников трансконтинентального переноса возбудителей инфекционных болезней человека и животных» и AP05133370 «Молекулярная эволюция новых для науки парамиксовирусов, циркулирующих среди диких птиц в Казахстане».

Конфликт интересов. Все авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-32, 34-37, 39-42 см. REFERENCES)

33. Полный список видов птиц Казахстана. Available at: <http://www.birds.kz/v2checklist.php?l=ru>
38. Коротецкий И.С., Богоявленский А.П., Прилипов А.Г., Усачев Е.В., Усачева О.В., Турмагамбетова А.С. и др. Молекулярно-генетическая характеристика выделенных на территории Российской Федерации, Украины, Казахстана и Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(4): 25-9.

REFERENCES

- Alexander D.J. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: *Diseases of Poultry*. Ames, IA, USA: Iowa State Press; 2003.
- Saif Y.M., Mohan R., Ward L., Senne D.A., Panigrahy B., Dearth R.N. Natural and experimental infection of turkeys with avian paramyxovirus-7. *Avian Dis.* 1997; 41(2): 326-9.
- Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: *Diseases of Poultry*. Ames, IA, USA: Iowa State Press; 1997.
- Jung A., Grund C., Muller I., Rautenschlein S. Avian paramyxovirus serotype 3 infection in Neopsephotus, Cyanoramphus, and Neopheuma species. *J. Avian Med. Surg.* 2009; 23(3): 205-8. Doi: <https://doi.org/10.1647/2008-022.1>
- Nerome K., Nakayama M., Ishida M., Fukumi H. Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *J. Gen. Virol.* 1978; 38(2): 293-301. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-2-293>
- Gough R.E., Alexander D.J. Avian paramyxovirus type 4 isolated from a ringed teal (*Calonetta leucophrys*). *Vet. Rec.* 1984; 115(25-26): 653. Doi: <https://doi.org/10.1136/vr.115.25-26.653>
- Stallknecht D.E., Senne D.A., Zwank P.J., Shane S.M., Kearney M.T. Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in coastal Louisiana. *J. Wildl. Dis.* 1991; 27(1): 123-8. Doi: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-27.1.123>
- Alexander D.J., Hinshaw V.S., Collins M.S., Yamane N. Characterization of viruses which represent further distinct serotypes (PMV-8 and PMV-9) of avian paramyxoviruses. *Arch. Virol.* 1983; 78(1-2): 29-36. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01310856>
- Stanislawek W.L., Wilks C.R., Meers J., Horner G.W., Alexander D.J., Manvell R.J., et al. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Arch. Virol.* 2002; 147(7): 1287-302. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0818-2>
- Turek R., Gresiková M., Tůmová B. Isolation of influenza A virus and paramyxoviruses from sentinel domestic ducks. *Acta Virol.* 1984; 28(2): 156-8.
- Chang P.C., Hsieh M.L., Shien J.H., Graham D.A., Lee M.S., Shieh H.K. Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 isolated from ducks. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 9): 2157-68. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-9-2157>
- Miller P.J., Afonso C.L., Spackman E., Scott M.A., Pedersen J.C., Senne D.A., et al. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11496-504. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00822-10>
- Briand F.X., Henry A., Massin P., Jestin V. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus. *J. Virol.* 2012; 86(14): 7710. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00946-12>
- Terregino C., Aldous E.W., Heidari A., Fuller C.M., De Nardi R., Manvell R.J., 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. Virol.* 2013; 158(11): 2233-43. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1735-2>
- 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(9): 1079-85. Doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0529>
- Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A., Asanova S., Sayatov M., Kasymbekov E., et al. Complete genome sequence of novel avian paramyxovirus (APMV-13) isolated from a wild bird in Kazakhstan. *Genome Announc.* 2016; 4(3): pii e00167-16. Doi: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00167-16>
- Goraichuk I., Sharma P., Stegny B., Muzyka D., Pantin-Jackwood M.J., Gerilovych A., et al. Complete genome sequence of an avian paramyxovirus representative of putative new serotype 13. *Genome Announc.* 2016; 4(4): pii e00729-16. Doi: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00729-16>
- Thampaisarn R., Bui V.N., Trinh D.Q., Nagai M., Mizutani T., Omatsu T., et al. Characterization of avian paramyxovirus serotype 14 a novel serotype isolated from a duck fecal sample in Japan. *Virus Res.* 2017; 228: 46-57. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.018>
- Lee H.J., Kim J.Y., Lee Y.J., Lee E.K., Song B.M., Lee H.S., et al. Novel Avian Paramyxovirus (Putative Serotype 15) Isolated from Wild Birds. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 786. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00786>
- Thomazelli L.M., de Araújo J., Fabrizio T., Walker D., Reisach D., Ometto T., et al.
- Novel avian paramyxovirus (APMV-15) isolated from a migratory bird in South America. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0177214. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177214>
- Neira V., Tapia R., Verdugo C., Barriga G., Mor S., Ng T.F.F., et al. Novel Avulaviruses in Penguins Antarctica. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(7): 1212-4. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2307.170054>
- Karamendin K., Kydyrmanov A., Kasymbekov Y., Asanova S., Daulbayeva K., Seidalina A., et al. Novel avian paramyxovirus isolated from gulls in Caspian seashore in Kazakhstan. *PLoS One.* 2017; 12(12): e0190339. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190339>
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Avian influenza. Available at: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Available at: http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/documents/docs/manualonanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf
- Tong S., Chern S.W., Li Y., Pallansch M., Anderson L.J. Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays to Detect Novel Paramyxoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(8): 2652-8. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.00192-08>
- Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000.
- Morgan E.M. Evolutionary relationships of paramyxovirus nucleocapsid-associated proteins. In: Kingsbury D.W., ed. *The Paramyxoviruses*. New York: Plenum Press; 1991: 163-79.
- Paldurai A., Subbiah M., Kumar S., Collins P.L., Samal S.K. Complete genome sequences of avian paramyxovirus type 8 strains goose/Delaware/1053/76 and pintail/Wakuya/20/78. *Virus Res.* 2009; 142(1-2): 144-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.02.003>
- Xiao S., Subbiah M., Kumar S., De Nardi R., Terregino C., Collins P.L., et al. Complete genome sequences of avian paramyxovirus serotype 6 prototype strain Hong Kong and a recent novel strain from Italy: evidence for the existence of subgroups within the serotype. *Virus Res.* 2010; 150(1-2): 61-72. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.02.015>
- The Checklist of the Birds of Kazakhstan. Available at: <http://www.birds.kz/v2checklist.php?l=en>
- Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A., Asanova S., Daulbayeva K., Kasymbekov E., et al. Circulation of avian paramyxoviruses in wild birds of Kazakhstan in 2002-2013. *Virol. J.* 2016; 13: 23. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0476-8>
- Yamane N., Arikawa J., Odagira T., Ishida N. Characterization of avian paramyxoviruses isolated from feral ducks in northern Japan: the presence of three distinct viruses in nature. *Microbiol. Immunol.* 1982; 26(7): 557-68. Doi: <https://doi.org/10.1111/mim.1982.26.7.557>
- Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A., Usachev E., Lyapina O., Levandovskaya S., et al. Molecular Characterization of Virulent Newcastle Disease Virus Isolates from Chickens during the 1998 NDV Outbreak in Kazakhstan. *Virus Genes.* 2000; 31(1): 13-20. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-004-2195-2>
- Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A., Usachev E., Lyapina O., Korotetskiy I., et al. Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004 and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. *Virus Genes.* 2009; 39(1): 94-101. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0370-1>
- Korotetskiy I.S., Bogoyavlenskiy A.P., Prilipov A.G., Usachev E.V., Usacheva O.V., Turmagambetova A.S., et al. Molecular genetic characteristics of cyclic isolates of the Newcastle disease virus isolated on the territory of the Russian Federation, Ukraine, Kazakhstan, and Kyrgyzstan. *Voprosy virusologii.* 2010; 55(4): 25-9. (in Russian)
- Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A., Usachev E., Korotetskiy I., Zaitceva I., et al. Characterization of Pigeon Paramyxoviruses (Newcastle disease virus) Isolated in Kazakhstan in 2005. *Virol. Sin.* 2012; 27(2): 93-9. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12250-012-3234-0>
- Kydyrmanov A., Panshin A., Shihmanter E., Sayatov M. Monoclonal antibody analysis of avian paramyxovirus serotype 1 (NDV) and serotype 2 (APMV2) strains isolated in Kazakhstan. In: *News. The Annual Meeting of the Israel Society for Microbiology*. Tel Aviv: Tel Aviv University Press; 1997.
- Munir M., Linde A.M., Zohari S., Ståhl K., Baule C., Engström B., et al. Whole genome sequencing and characterization of a virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in Sweden. *Virus Genes.* 2011; 43(2): 261-71. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0636-2>
- Shengqing Y., Kishida N., Ito H., Kida H., Otsuki K., Kawaoka Y., et al. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology.* 2002; 301(2): 206-11. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1539>

Поступила 07.09.18

Принята в печать 31.10.18