

Молекулярная эпидемиология вирусов

УДК 619:578.2(574)

doi: 10.15389/agrobiology.2016.2.255rus

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА**М.Б. ОРЫНБАЕВ, К.Т. СУЛТАНКУЛОВА,
А.А. КЕРИМБАЕВ, В.М. СТРОЧКОВ, Э.К. ШАЛГЫНБАЕВ, З.Д. ОМАРОВА,
Г.К. МУСАЕВА, Е.Д. БУРАШЕВ, Ж.К. КЫДЫРБАЕВ, А.Р. САНСЫЗБАЙ**

Болезнь Ньюкасла (БН) — высококонтагиозная вирусная инфекция птиц, характеризующаяся пневмонией, энцефалитом, множественными точечными кровоизлияниями и поражением внутренних органов, — в настоящее время распространена в разных регионах мира. Все выделенные до настоящего времени вирусы БН (сем. *Paramyxoviridae*, род *Paramyxovirus*) разделены на два класса, представляющие разнообразные и постоянно развивающиеся группы вирусов. Несмотря на повсеместную вакцинацию, болезнь трудно поддается контролю, в связи с чем ее возбудитель внесен в список наиболее важных патогенов. В последние годы исследований по генетической вариабельности штаммов БН в Казахстане не проводилось, хотя именно здесь пересекаются многие трансконтинентальные пути миграции диких птиц — основных переносчиков возбудителей заболевания. Настоящее исследование было проведено с целью изучения особенностей циркуляции, а также выделения и характеристики изолятов вируса болезни Ньюкасла, вызвавших заболевание птиц в различных регионах Республики Казахстан в 2010, 2012 и 2013 годах. На 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) изучали изоляты вируса, выделенные от павшей птицы при вспышках БН в птицеводческих хозяйствах и на частных подворьях в Алматинской, Северо-Казахстанской и Жамбылской областях Казахстана. Определяли среднее время гибели эмбрионов (mean death time, MDT) и интрацеребральный индекс патогенности (intracerebral pathogenicity index, ICPI). Выделяли РНК вируса, выполняли ПЦР-амплификацию, проводили детекцию ее продуктов, очищали и секвенировали. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали в программе Sequencher v. 4.5 («Gene Codes Corporation», США). Для построения филогенетического дерева и определения генотипа был использован набор нуклеотидных последовательностей из международной базы данных GenBank (NCBI). Филогенетический анализ последовательностей проводили с помощью программы Mega 6.06 со следующими параметрами: Statistical Method — Neighbor-joining; Test of Phylogeny — Bootstrap method; No. of Bootstrap Replications — 500; Model/Method — Kimura 2-parameter model. Исследования показали, что БН вызывает вспышки и у вакцинированной, и у невакцинированной птицы. Выделенные вирусы БН относились к велогенным штаммам. Все они имели сайт протеолитического расщепления ¹¹⁰GGRRQKRF¹¹⁷ белка слияния, характерный для V-патогена. Секвенирование и филогенетический анализ *F*-гена показал, что вирус, выделенный на птицефабрике в Алматинской области от павших особей из вакцинированного поголовья, относится к генотипу VII_d, а вирусы, выделенные от невакцинированных птиц в частных подворьях Алматинской, Жамбылской и Северо-Казахстанской областей, — к генотипу VII_b. Согласно полученным данным, несмотря на географическую отдаленность вспышек, на территории Северного Казахстана циркулировали те же генотипы, что и в южных регионах страны. Широкое распространение БН в Казахстане требует от ветеринарных служб принятия мер по разработке эффективных мер контроля с учетом данных молекулярной эпидемиологии.

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла, штамм, индекс патогенности, ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ.

Болезнь Ньюкасла (БН) — это высококонтагиозная вирусная инфекция птиц, характеризующаяся пневмонией, энцефалитом, множественными точечными кровоизлияниями и поражением внутренних органов (1). Впервые она была зарегистрирована на острове Ява в 1926 году (2). Возбудитель болезни (РНК-содержащий вирус из семейства *Paramyxoviridae*, род *Paramyxovirus*) выделен и описан как фильтрующийся вирус во время вспышки в г. Ньюкасл (Великобритания, 1926 год) (3), а заболевание получило название «ньюкаслская болезнь». Вирус БН был обнаружен у 241 вида из 27 отрядов класса Птицы (*Aves*) (4).

Все выделенные до настоящего времени вирусы БН разделены на два класса, представляющие собой разнообразные и постоянно развивающиеся группы. Вирусы I класса распространены по всему миру среди диких птиц, относятся к низковирулентным и в настоящее время разделяются на девять генотипов (5). Вирусы II класса до последнего времени разделяли на 10 генотипов. Однако в 2012 году D.G. Diel с соавт. (6) предложили новую генетическую классификацию вирусов БН. Авторы разделили вирусы II класса на 15 генотипов, в которые вошли 10 ранее известных и 5 новых. Позже S.C. Courtney с соавт. (7), изучив вирусы, выделенные в Доминиканской Республике и Мексике, показали существование XVI генотипа, а C.J. Snоек с соавт. (8) классифицировали вирусы, выделенные в Западной и Центральной Африке, как XVII и XVIII генотипы.

В настоящее время филогенетический анализ выполнен для огромного числа штаммов вируса БН и определены основные генотипы, циркулирующие в различных частях мира, всего их 18 (6, 7). Группой ученых из стран СНГ установлено, что все изоляты вируса БН, выделенные на территории России, Казахстана, Киргизии и Украины от домашних и синантропных птиц за период с 1993 по 2007 годы, относились к генотипам VIIa, VIIb и VIId (9-11). Показано также, что в популяциях голубей на территории России циркулируют вирусы II класса VI генотипа (12, 13), в популяциях водоплавающих птиц — вирусы I генотипа (13, 14), а среди домашней птицы — вирусы VII генотипа (15, 16). Однако, несмотря на изученность этого вируса, в разных странах, в том числе на территории Республики Казахстан, происходят массовые заболевания птиц с высокой смертностью.

В последние годы исследования генетической вариабельности у штаммов БН в Казахстане не проводились. В настоящей работе мы изучали варианты вируса БН, циркулирующие на территории Республики Казахстан и изменившиеся в процессе эволюции, что представляло особый интерес, поскольку именно здесь пересекаются многие трансконтинентальные пути миграции диких птиц — основных переносчиков инфекции.

Целью нашей работы было изучение особенностей циркуляции, а также выделение и характеристика изолятов вируса болезни Ньюкасла, вызвавших заболевание птиц в разных регионах Республики Казахстан.

Методика. Изучали изоляты вируса, выделенные от павшей птицы при вспышках БН в птицеводческих хозяйствах и на частных подворьях на территории Казахстана в 2010, 2012 и 2013 годах.

В качестве системы культивирования использовали 10-суточные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Среднее время гибели (mean death time, MDT) определяли посредством деления суммы часов гибели всех эмбрионов, вызванной минимальной летальной дозой, на число эмбрионов (17). Интрацеребральный индекс патогенности (intracerebral pathogenicity index, ICPI) определяли по общепринятой методике (18).

РНК выделяли с помощью набора QIAmp Viral RNA mini kit («Qia-gen GmbH», Германия) согласно инструкции изготовителя. Для получения ПЦР-продуктов использовали пару праймеров (19) (Fwd-upper-f1 — TTGCTTA-TAGTTAGTTCGCCTGTC, Rev-down-f2 — ACCCGTGTATTGCTCTTTGG) и набор One-step RT-PCR Kit («Qiagen GmbH», Германия).

Детекцию ПЦР-продуктов проводили в 1 % Трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия в гель документирующей системе Bio Rad («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). ПЦР-продукты очищали с помощью набора QIAquick PCR purification kit («Qiagen GmbH», Германия) согласно инструкции изготовителя. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили с использованием набора BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems, Inc.», США) на автоматическом анализаторе 3130xl

Genetic Analyzer («Applied Biosystems, Inc.», США; «Hitachi», Япония).

Полученные нуклеотидные последовательности анализировали в программе Sequencher v. 4.5 («Gene Codes Corporation», США). При помощи комплекса компьютерных программ Mega 6.0 (20) провели выравнивание нуклеотидной последовательности. Для построения филогенетического дерева и определения генотипа использовали набор нуклеотидных последовательностей из международной базы данных GenBank (NCBI). Филогенетический анализ последовательностей проводили с помощью программы Mega 6.06 при следующих параметрах: Statistical Method — Neighbor-joining; Test of Phylogeny — Bootstrap method; No. of Bootstrap Replications — 500; Model/Method — Kimura 2-parameter model.

Результаты. Эпизоотическое благополучие в птицеводческих хозяйствах Республики Казахстан поддерживается благодаря интенсивной вакцинации птиц, начиная с первых дней жизни. Во многих хозяйствах отработаны схемы вакцинации для поддержания высокого количества поствакцинальных антител, которое требуется для обеспечения невосприимчивости птиц к болезни Ньюкасла. Однако, несмотря на все проводимые мероприятия, эпизоотические вспышки болезни Ньюкасла наносят ущерб птицеводству на территории Казахстана.

В ноябре 2010 года на птицефабрике «Аллель Агро» (Илийский р-н, Алматинская обл.) произошла массовая гибель 30-40-суточных цыплят-бройлеров. В хозяйстве имелась отработанная программа профилактической вакцинации, все птицы вакцинировались живой вакциной (Nobilis ND Clone 30, «Intervet international B.V.», Нидерланды). Несмотря на вакцинацию, за 1 нед пало более 2000 птиц. В октябре 2012 года была зарегистрирована массовая гибель птицы на частных подворьях пос. Аксуат (Тимирязевский р-н, Северо-Казахстанская обл.) — пало более 900 особей. В июне 2013 года на частных подворьях в пос. Отар (Кордайский р-н, Жамбылская обл.) и пос. Матыбулак (Жамбылский р-н, Алматинская обл.) также отмечалась массовая гибель домашней птицы. Птица на частных подворьях не была вакцинирована против БН.

Мы установили, что во всех случаях заболевание и гибель птицы вызывал вирус БН (табл.).

Биологическая характеристика изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных в разных областях Республики Казахстан ($X \pm m$, $n = 3$, культивирование на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах)

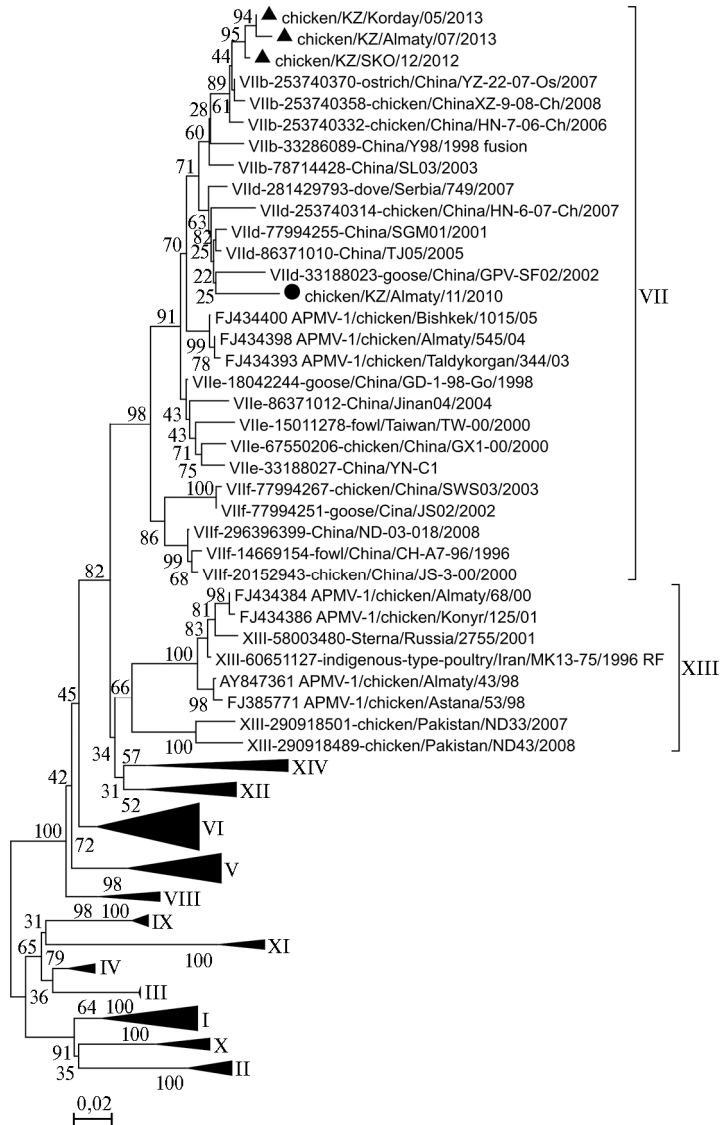
Изолят (ID GenBank)	Место (год выделения), хозяин	БА	ГА	СВГ	ICPI	СР
Chicken/KZ/Almaty/11/2010 (KT719396)	Алматинская обл. (2010), домашняя курица	9,20±0,047	8,06±0,12	56	1,76	¹¹⁰ GGRRQKRF ¹¹⁷
Chicken/KZ/SKO/12/2012 (KT719397)	Северо-Казахстанская обл. (2012), домашняя курица	8,80±0,080	8,53±0,12	52	1,82	¹¹⁰ GGRRQKRF ¹¹⁷
Chicken/KZ/Kordai/06/2013 (KT719398)	Жамбылская обл. (2013), домашняя курица	9,26±0,074	8,20±0,08	56	1,82	¹¹⁰ GGRRQKRF ¹¹⁷
Chicken/KZ/Almaty/07/2013 (KT719399)	Алматинская обл. (2013), домашняя курица	9,58±0,069	8,73±0,05	56	1,80	¹¹⁰ GGRRQKRF ¹¹⁷

Примечание. БА — биологическая активность, lg ЭИД₅₀/см³ (эмбриональная инфицирующая доза); ГА — геммагглютинирующая активность, log₂; СВГ — среднее время гибели куриных эмбрионов, ч; ICPI — интрацеребральный индекс патогенности; СР — сайт протеолитического расщепления продукта F-гена.

Среднее время гибели эмбрионов для выделенных вирусов БН составляло 52-56 ч, что соответствует показателю для везикулярных штаммов вируса БН. ICPI был в пределах 1,76-1,82 и подтвердил вирулентность выделенных на территории Казахстана вирусов БН.

Анализ показал наличие сходной последовательности в сайте протеолитического расщепления (¹¹⁰GGRRQKRF¹¹⁷) белка слияния F, харак-

терной для V-патотипа (velogenic) БН (21). Следовательно, результаты генетических исследований согласовывались с данными биологических тестов (ICPI и MDT) и подтвердили вирулентность изученных изолятов БН.



Филогенетическое дерево F-гена, кодирующего белок слияния вируса болезни Ньюкасла II класса: I-XIV — генотипы; ▲ и ● — изоляты, выделенные в Казахстане (соответственно вирусы VIIb и VIId генотипов; дендрограмма построена с использованием нуклеотидных последовательностей, депонированных в GenBank, методом Neighbor-joining, bootstrap = 500).

Углубленное изучение генетических связей между вирусами, выделенными в различных географических зонах, дало важную информацию о молекулярной эпидемиологии БН. Требовалось выяснить, к каким генотипам относятся штаммы, вызвавшие эпизоотические вспышки болезни Ньюкасла в Алматинской, Жамбылской и Северо-Казахстанской областях. Для этого мы провели выравнивание нуклеотидных последовательностей выделенных вирусов с последовательностями вируса БН, доступными в GenBank, и построили филогенетическое дерево (рис.). Все вирусы БН, выделенные на территории Казахстана, оказались близки к циркулирующим в Азии и относились к VII генотипу. Вирусы VII генотипа впер-

вые выделены в Тайване в 1984 году (22). Позже их обнаружили в Европе (23), Китае (24), Африке (25, 26), а также на территории СНГ — в России, на Украине, в Казахстане, Кыргызстане (9-11, 27).

При использовании референтных штаммов, предложенных D.G. Diehl с соавт. (6), изолят Chicken/KZ/Almaty/11/2010 вируса БН, выделенный от вакцинированной птицы, павшей на птицефабрике, был отнесен к генотипу VII_d, а изоляты Chicken/KZ/SKO/12/2012, Chicken/KZ/Kordai/06/2013, Chicken/KZ/Almaty/06/2013, полученные от невакцинированной птицы на частных подворьях в Алматинской, Жамбылской и Северо-Казахстанской областях, — к генотипу VII_b.

То есть, несмотря на географическую отдаленность вспышек, на территории Северного Казахстана циркулировали те же генотипы, что и в южных регионах страны. Наши данные подтверждают, что каждая генетическая группа географически имела свой ареал, а ее распространение, возможно, было связано с путями миграции диких птиц. Того же мнения придерживаются И.С. Коротецкий с соавт. (11), которые установили, что наличие короткого пути миграции между странами Северной Европы и Украиной привело к локальному распространению вирусов БН VII_a генотипа только на территории Украины, а мощные миграционные пути от Юго-Восточной Азии через Россию, Казахстан и Киргизию на Каспий и далее — к распространению вирусов VII_b и VII_d генотипов.

Проведенные исследования показали, что БН вызывал вспышки среди как вакцинированной, так и невакцинированной птицы. Как отмечалось выше, на птицефабрике «Аллель Агро» (Алматинская обл.) проводилась профилактическая вакцинация живой вакциной. Следует отметить, что штамм вируса БН, используемый для приготовления вакцины, по имеющимся в доступной литературе данным, относится ко II генотипу (28). Возможно, вспышка заболевания произошла в результате снижения иммунитета, поскольку при хорошо отработанной схеме вакцинации классические вакцины, относящиеся ко II генотипу, обеспечивают 100 % защиту птиц независимо от антигенных различий эпизоотического штамма (24, 29, 30). Предполагается, что вакцинация против БН должна обеспечивать иммунитет против заражения и подавление размножения вируса. Однако, по данным некоторых авторов, существующие вакцины предотвращают болезнь, но не могут остановить репликацию и распространение вируса (31-33). Анализ этих исследований показывает, что продукция вируса была значительно ниже только при использовании вакцины на основе определенного генотипа (34, 35).

Итак, заболевание и гибель домашней птицы в Алматинской, Жамбылской и Северо-Казахстанской областях Республики Казахстан в 2010, 2012 и 2013 годах были вызваны вирусом болезни Ньюкасла (БН). Исследования показали, что вирус БН приводит к вспышкам как среди вакцинированных, так и невакцинированных птиц. Вспышка заболевания среди вакцинированных птиц, возможно, произошла в результате снижения иммунитета. Биологические характеристики (среднее время гибели — МДТ, интрацеребральный индекс патогенности — ICPI), а также последовательность сайта протеолитической активации F белка у изученных вирусов БН соответствовали таковым у вельогенных штаммов. Филогенетический анализ показал, что вирус, выделенный от птиц, павших на птицефабрике среди вакцинированного поголовья, относится к генотипу VII_d, а изоляты, выделенные от невакцинированных птиц на частных подворьях Алматинской, Жамбылской и Северо-Казахстанской областей, — к генотипу VII_b. Широкое распространение болезни Ньюкасла в Республике Казахстан требует от ветеринарных служб разработки эффективных мер контроля с

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexander D.J., Aldous E.W., Fuller C.M. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology*, 2012, 41(4): 329-335 (doi: 10.1080/03079457.2012.697991).
2. Kraneveld F.C. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned. Indisch. Bl. Diergeneeskd.*, 1926, 38: 448-450.
3. Doyle T.M. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J. Comp. Pathol. Theory*, 1927, 40(1): 44-69.
4. Kaleta E.F., Baldaus C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: *Newcastle disease* /D.J. Alexander (ed.). Kluwer Acad. Publ., Boston, 1988: 197-246 (doi: 10.1007/978-1-4613-1759-3_12).
5. Kim L.M., King D.J., Curry P.E., Suarez D.L., Swayne D.E., Stallknecht D.E., Slemmons R.D., Pedersen J.C., Senne D.A., Winker K., Afonso C.L. Phylogenetic diversity among low-virulence newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J. Virol.*, 2007, 81: 12641-12653 (doi: 10.1128/JVI.00843-07).
6. Diel D.G., Silva L.H.A., Liu H., Wang Z., Miller P.J., Afonso C.L. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect. Genet. Evol.*, 2012, 12: 1770-1779 (doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.012).
7. Courtney S.C., Susta L., Gomez D., Hines N.L., Pedersen J.C., Brown C.C., Miller P.J., Afonso C.L. Highly divergent virulent isolates of Newcastle disease virus from the Dominican Republic are members of a new genotype that may have evolved unnoticed for over 2 decades. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, 51: 508-517 (doi: 10.1128/JCM.02393-12).
8. Snoeck C.J., Owoadé A.A., Couacy-Hymann E., Alkali B.R., Okwen M.P., Adeyanju A.T., Komoyo G.F., Nakouné E., Le Faou A., Muller C.P. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: Cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, 51(7): 2250-2260 (doi: 10.1128/JCM.00684-13).
9. Bogoyavlenskiy A., Berezin V., Prilipov A., Usachev E., Lyapina O., Levandovskaya S., Korotetskiy I., Tolmacheva V., Makhmudova N., Khudyakova S., Tustikbaeva G., Zaitseva I., Omirtaeva E., Ermakova O., Daulbaeva K., Asanova S., Kydyrmanov A., Sayatov M., King D. Molecular characterization of virulent Newcastle disease virus isolates from chicken during the 1998 NDV outbreaks in Kazakhstan. *Virus Genes*, 2005, 31: 13-20 (doi: 10.1007/s11262-004-2195-2).
10. Bogoyavlenskiy A., Berezin V., Prilipov A., Usachev E., Lyapina O., Korotetskiy I., Zaitseva I., Asanova S., Kydyrmanov A., Daulbaeva K., Shakhvorostova L., Sayatov M., King D. Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIII. *Virus Genes*, 2009, 39: 94-101 (doi: 10.1007/s11262-009-0370-1).
11. Коротецкий И.С., Богоявленский А.Я., Прилипов А.Г., Усачев Е.В., Усачева О.В., Турмагамбетова А.С., Зайцева И.А., Кыдырманов А., Шахворостова Л.И., Саятов М.Х., Борисов В.В., Пчелкина И.П., Геррилович А.П., Березин В.Э. Молекулярно-генетическая характеристика везикулярных изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории Российской Федерации, Украины, Казахстана и Киргизии. *Вопросы вирусологии*, 2010, 4: 29-32.
12. Pchelkina I.P., Manin T.B., Kolosov S.N., Starov S.K., Andriyosov A.V., Chvala I.A., Drygin V.V., Yu Q., Miller P.J., Suarez D.L. Characteristics of pigeon paramyxovirus serotype-1 isolates (PPMV-1) from the Russian Federation from 2001 to 2009. *Avian Dis.*, 2013, 57(1): 2-7 (doi: 10.1637/10246-051112-Reg.1).
13. Пчелкина И.П., Колосов С.Н., Чвала И.А., Старов С.К. Генетический анализ и изучение генотипической принадлежности изолятов вируса ньюкаслской болезни, выделенных на территории Российской Федерации в 2010 г. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных (Владимир)*, 2011, 9: 94-103.
14. Щелканов М.Ю., Чумаков В.М., Славский А.А., Федякина И.Т., Усачев Е.В., Санков М.Н., Киреев Д.Е., Ананьев В.Ю., Баранов Н.И., Гореликов В.Н., Колосов С.А., Семенов В.И. Вирус болезни Ньюкасла в популяциях диких птиц на территории юга Приморского края в период осенних миграций 2001-2004 гг. *Вопросы вирусологии*, 2006, 4: 37-41.
15. Пчелкина И.П., Колосов С.Н., Щербакова Л.О., Манин Т.Б., Андриясов А.В., Чвала И.А., Старов С.К., Дрыгин В.В. Генетический анализ изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных у домашних, синантропных и диких птиц на территории Российской Федерации и Украины (Крыма). *Труды Федерального центра*

- охраны здоровья животных (Владимир), 2007, 5: 162-175.
16. Дрыгин В.В., Щербакова Л.О., Бочков Ю.А., Старов С.К., Ельников В.В., Минин Т.Б., Пчелкина И.П. Характеристика полевого изолята ньюкаслской болезни, выделенного во время вспышки на птицефабрике в Ленинградской области в 2002 году. Вопросы вирусологии, 2002, 6: 41-43
 17. Alexander D.J. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens /D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed (eds.). American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, 1998: 156-163.
 18. Alexander D.J. Newcastle disease, in OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris, 2008 (<http://www.oie.int>).
 19. Aldous E.W., Mynn J.K., Banks J., Alexander D.J. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathol, 2003, 32(3): 239-256 (doi: 10.1080/030794503100009783).
 20. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol., 2013, 30(12): 2725-2729 (doi: 10.1093/molbev/mst197).
 21. Munir M., Zohari S., Abbas M., Khan M.T., Berg M. Genomic and biological characterization of a velogenic Newcastle disease virus isolated from a healthy backyard poultry flock in 2010. Virology Journal, 2012, 9: 46 (doi: 10.1186/1743-422X-9-46).
 22. Yang C.Y., Shieh H.K., Lin Y.L., Chang P.C. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe. Avian Dis., 1999, 43: 125-130 (doi: 10.2307/1592771).
 23. Lomniczi B., Wehmann E., Herczeg J., Ballagi-Pordany A., Kalenta E.F., Werner O., Meulemans G., Jorgensen P.H., Mante A.P., Gielkens A.L., Capua I., Damoser J. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). Arch. Virol., 1998, 143: 49-64 (doi: 10.1007/s007050050267).
 24. Liu X.F., Wan H.Q., Ni X.X., Wu Y.T., Liu W.B. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. Arch. Virol., 2003, 148: 1387-1403 (doi: 10.1007/s00705-003-0014-z).
 25. Abolnik C., Horner R.F., Bisschop S.P., Parker M.E., Romito M., Viljoen G.J. A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. Arch. Virol., 2004, 149: 603-619 (doi: 10.1007/s00705-003-0218-2).
 26. Snoeck C.J., Ducatez M.F., Owoade A.A., Faleke O.O., Alkali B.R., Tahita M.C., Tarnagda Z., Ouedraogo J.B., Maikano I., Mbah P.O., Kremer J.R., Muller C.P. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. Arch. Virol., 2009, 154: 47-54 (doi: 10.1007/s00705-008-0269-5).
 27. Пчелкина И.П., Колосов С.Н., Манин Т.Б., Чвала И.А., Щербакова Л.О., Старов С.К., Дрыгин В.В. Определение генотипической принадлежности изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных на территории Российской Федерации в 2006 году. Ветеринарная патология, 2007, 4(23): 162-167.
 28. Wang J.Y., Liu W.H., Ren J.J., Tang P., Wu N., Wu H.Y., Ching C.D., Liu H.J. Characterization of emerging Newcastle disease virus isolates in China. Virology Journal, 2015, 12: 119 (doi: 10.1186/s12985-015-0351-z).
 29. Dortmans J.C., Peeters B.P., Koch G. Newcastle disease virus outbreaks: vaccine mismatch or inadequate application? Vet. Microbiol., 2012, 160(1-2): 17-22 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.003).
 30. Bwala D.G., Abolnik C., van Wyk A., Cornelius E., Bisschop S.P. Efficacy of a genotype 2 Newcastle disease vaccine (Avinew) against challenge with highly virulent genotypes 5d and 3d. J. S. Afr. Vet. Assoc., 2009, 80: 174-178 (doi: 10.4102/jsava.v80i3.197).
 31. Kapczynski D.R., King D.J. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. Vaccine, 2005, 23: 3424-3433 (doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.140).
 32. Yu L., Wang Z., Jiang Y., Chang L., Kwang J. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. J. Clin. Microbiol., 2001, 39: 3512-3519 (doi: 10.1128/JCM.39.10.3512-3519.2001).
 33. Miller P.J., King D.J., Afonso C.L., Suarez D.L. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. Vaccine, 2007, 25: 7238-7246 (doi: 10.1016/j.vaccine.2007.07.017).
 34. Hu S., Ma H., Wu Y., Liu W., Wang X., Liu Y., Liu X. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. Vaccine, 2009, 27: 904-910 (doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.091).
 35. Miller P.J., Estevez C., Yu Q., Suarez D.L., King D.J. Comparison of viral shed-

ding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. Avian Dis., 2009, 53: 39-49 (doi: 10.1637/8407-071208-Reg.1).

ПГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности КН МОН РК,
080409 Республика Казахстан, Жамбылская обл., Кордайский р-н,
п.г.т. Гвардейский,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

Поступила в редакцию
22 сентября 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 2, pp. 255-263

MOLECULAR AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF PATHOGENIC NEWCASTLE DISEASE VIRUSES ISOLATED IN KAZAKHSTAN

M.B. Orynbaev, K.T. Sultankulova, A.A. Kerimbaev, V.M. Strochkov, E.K. Shalgynbaev, Z.D. Omarova, G.K. Musaeva, E.D. Burashev, Zh.K. Kydyrbaev, A.R. Sansyzbai

Research Institute for Biological Safety Problems SC MES RK, p.g.t. Gvardeiskii, Kordaiskii Region, Zhambylskaya Province, 080409 Republic of Kazakhstan, e-mail ribsp@biosafety.kz

Received September 22, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2016.2.255eng

Abstract

Currently, Newcastle disease (ND) is highly contagious viral infection of birds, characterized by pneumonia, encephalitis, multiple pointed hemorrhages and defeat of internals is spread in various regions of the world. All isolated to the present ND viruses (*Paramyxoviridae*, *Paramyxovirus*) are divided into two classes, representing the diverse and constantly developing group of viruses. Despite the conducting universal vaccination, the disease is difficult to control, in connection with what it is listed in the most important pathogens. In recent years, studies on the genetic variability of the ND strains in Kazakhstan were not conducted, although exactly here many transcontinental migratory routes of wild birds, the main carriers of the pathogens, are crossed. The present study was conducted to examine the characteristics of the circulation, as well as the isolation and characterization of isolates of Newcastle disease virus that caused the disease of birds in different regions of Kazakhstan in 2010, 2012 and 2013. Using 10-day-old developing chicken embryos (DCE), we studied virus isolates from dead hens at ND outbreaks in poultry farms and private yards in Almatinskaya, North Kazakhstan and Zhambylskaya provinces of Kazakhstan. The mean death time of embryos (MDT) and intracerebral pathogenicity index (ICPI) were estimated. Viral RNA was isolated and used for PCR. Amplified products were further detected, purified and sequenced. The obtained nucleotide sequences were analyzed using Sequencher v. 4.5 (Gene Codes Corporation, USA). A set of nucleotide sequences from an international database GenBank was used to construct the dendrogram and determine the genotype. Phylogenetic analysis of the sequences was performed using Mega 6.06 and the following parameters: Statistical Method — Neighbor-joining; Test of Phylogeny — Bootstrap method; No. of Bootstrap Replications — 500; Model/Method — Kimura 2-parameter model. Studies have shown that the ND causes outbreaks both among vaccinated and non-vaccinated poultry. The ND isolates belong to velogenic strains. All of them had a proteolytic cleavage site ¹¹⁰GGRRQKRF¹¹⁷ of fusion protein, which is characteristic of the V-pathotype. The sequencing and phylogenetic analysis of the *F*-gene showed that the virus from dead birds of those vaccinated at the poultry farm in Almatinskaya Province belongs to VIIId genotype, while the isolates from non-vaccinated birds of the private farms in Almatinskaya, Zhambylskaya and North Kazakhstan provinces belong to VIIb genotype. According to the obtained information, despite the geographical distance of outbreaks, the same ND genotypes are circulating in the territory of Northern Kazakhstan and in the southern regions of the country. Wide spread of the virus in Kazakhstan requires from veterinary services to develop effective control measures with regard to ND molecular epidemiology.

Keywords: Newcastle disease, strain, pathogenicity index, PCR, sequencing, phylogenetic analysis.

Научные собрания

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ»,

посвященная 110-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора ветеринарных наук, профессора, академика ВАСХНИЛ, основоположника ветеринарной иммунологии в России Якова Романовича Коваленко

(17 мая 2016 года, г. Москва, ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко)

Основной темой научных исследований академика ВАСХНИЛ Якова Романовича

Коваленко была борьба с инфекционными заболеваниями животных. В 1938 году (через семь лет после окончания Московского ветеринарного института) он защитил кандидатскую диссертацию «Получение иммунной сыворотки против эмфизематозного карбункула», продолжил исследования анаэробных инфекций и в 1945 году защитил докторскую диссертацию «Некробациллез у крупного рогатого скота и овец». Под его руководством впервые в России разрабатывались методы диагностики и борьбы с африканской чумой свиней, дифференциации микоплазм (на основе серологической характеристики). Результатом стали монографии «Африканская чума свиней» (1965, 1972) и «Микоплазмозы животных» (1976).

Благодаря изучению различных аспектов иммунитета Я.Р. Коваленко предложил новые методы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных. Опубликованная им в 1958 году в журнале «Ветеринария» статья «Влияние введения иммунной сыворотки на развитие иммунитета при последующей вакцинации» определила направление иммунологических исследований в нашей стране. Уже в те годы стало очевидно, что для обеспечения эпизоотического благополучия в условиях высокой концентрации животных необходим постоянный мониторинг состояния иммунной системы с учетом ряда факторов (кормление, содержание, физиологическое состояние, вакцинопрофилактика, а также изменение вирулентности микроорганизмов).

Под руководством профессора Я.Р. Коваленко проведены первые опыты по изучению формирования вакцинального иммунитета у молодняка и обнаружено отсутствие γ -глобулинов в сыворотке крови поросят от иммунных и неиммунных свиноматок до приема молока. Показано, что при активной иммунизации телят и поросят от иммунных против паратифа матерей колостральный иммунитет задерживает образование у них специфических антител, а напряженность приобретенного вакцинального иммунитета зависит от состояния пассивного колострального иммунитета. В 1964 году по итогам пленума Отделения животноводства ВАСХНИЛ, посвященного вопросам иммунитета при инфекционных и инвазионных заболеваниях, была издана книга «Проблемы иммунитета сельскохозяйственных животных» под редакцией академика Я.Р. Коваленко.

Огромным вкладом в становление ветеринарной иммунологии как науки стало создание в 1967 году Всесоюзного института экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ), который Я.Р. Коваленко возглавлял долгие годы. В руководимой им лабораторию иммунитета (впоследствии лаборатории иммунологии) в 1960-1970-е годы изучалось влияние различных факторов на поствакцинальный иммуногенез у сельскохозяйственных животных. Были определены оптимальные сроки вакцинации, исследовались принципы иммунопрофилактики болезней новорожденных животных негативное, передача антител от матерей потомству, влияние дефицита перевариваемого протеина, аминокислот, стресса и радиации на иммунореактивность.

Я.Р. Коваленко писал: «При встрече возбудителя инфекции и организма различные системы реагируют друг с другом и взаимно влияют друг на друга. Возбудитель, хозяин и окружающая среда связаны между собой разнообразнейшими факторами, и от их взаимодействия и иммунологической подготовленности организма против возбудителя болезни зависит исход этой встречи». Используя термин «иммунологическая подготовленность организма», Я.Р. Коваленко обобщил все полученные ранее результаты и пришел к обоснованному заключению о необходимости массовой иммунизации животных, направленной на создание устойчивости к эпизоотическим заболеваниям. За цикл работ по ветеринарной иммунологии Я.Р. Коваленко в 1977 году был награжден золотой медалью имени С.Н. Выхелесского. В эти годы в лаборатории иммунитета велись исследования роли различных вирусов, пастерелл, микоплазм, кишечной палочки в этиологии респираторных, желудочно-кишечных болезней овец и крупного рогатого скота. Целью работ был поиск сведений о механизмах формирования поствакцинального иммунного ответа для определения принципов устойчивости животных к инфекционным заболеваниям при массовой иммунизации.

В настоящее время лаборатория иммунологии ВИЭВ продолжает исследования, начатые Яковом Романовичем Коваленко. Изучаются механизмы формирования поствакцинального иммунного ответа на различные типы вакцин, исследуются клеточные и молекулярные аспекты онто- и иммуногенеза у животных, механизмы взаимодействия макро- и микроорганизма, биосинтеза протективных антител в связи с разработкой диагностических препаратов. Развитие эволюционной иммунологии, одно из основных направлений которой заключается в изучении филогенетической связи между врожденным и адаптивным иммунитетом, предполагает применение иммунологических методов, которые оптимизированы для различных групп животных.

Главные современные направления в развитии ветеринарной иммунологии неразрывно связаны с общепризнанной научной школой академика Я.Р. Коваленко. Расширение и углубление знаний, основанных на его исследованиях, с использованием подходов молекулярной, клинической, эволюционной и экологической иммунологии позволит понять механизмы невосприимчивости организма животных и расширить наши возможности в эффективной противодействии инфекционными болезнями.

М.И. Гулокин, И.Ю. Ездакова

Контакты и информация: <http://www.view.ru>