

УДК 619:616.98:578.831.1.001.891

UDC 619:616:98:578.831.1.001.891

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ  
ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ,  
ВЫДЕЛЕННЫХ У ГОЛУБЕЙ В КУРСКОЙ  
ОБЛАСТИ**

**BIOLOGICAL PROPERTIES OF NEWCASTLE  
DISEASE VIRUSES ISOLATED FROM  
PIGEONS IN KURSK REGION**

Репин Павел Иванович  
ведущий биолог  
*Федеральный центр охраны здоровья животных*

Repin Pavel Ivanovich  
leading biologist  
*Federal Centre For Animal Health, FGBI*

Чвала Илья Александрович  
заведующий референтной лабораторией вирусных  
болезней птиц, кандидат ветеринарных наук

Chvala Ilya Aleksandrovich  
Head of Reference Laboratory for Avian Viral  
Diseases, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine)

Пчелкина Инна Петровна  
старший научный сотрудник, кандидат  
биологических наук

Pchelkina Inna Petrovna  
Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology)

Бахчин Иван Владимирович  
аспирант

Bahchin Ivan Vladimirovich  
postgraduate student

Дрыгин Владимир Викторович  
заместитель директора по НИР и развитию, доктор  
биологических наук, профессор  
*ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия*

Drygin Vladimir Viktorovich  
Deputy Director for Research and Development,  
Doctor of Science (Biology), professor  
*FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia*

Представлены данные по изучению биологических  
свойств изолятов вируса ньюкаслской болезни  
NDV/Pigeon/Rus/Kursk/1/13 и  
NDV/Pigeon/Rus/Kursk/2/13, выделенных от  
голубей из голубятен в Курской области в 2013г, с  
использованием вирусологических и молекулярно-  
генетических методов

The article provides the data of studying the biological  
properties of Newcastle disease virus isolates  
NDV/Pigeon/Rus/Kursk/1/13 and  
NDV/Pigeon/Rus/Kursk/2/13 derived from pigeons in  
pigeon houses in the Kursk region in 2013 using  
virological and molecular genetic methods

Ключевые слова: ВИРУС НЬЮКАСЛСКОЙ  
БОЛЕЗНИ, ПАРАМИКСОВИРУС ПТИЦ 1  
СЕРОТИПА, САЙТ НАРЕЗАНИЯ БЕЛКА F,  
ВИРУЛЕНТНОСТЬ, ГЕНОТИП

Keywords: NEWCASTLE DISEASE VIRUS,  
SEROTYPE 1 AVIAN PARAMYXOVIRUS,  
PROTEIN F CLEAVAGE SAIIT, VIRULENCE,  
GENOTYPE

## Введение

Возбудителем ньюкаслской болезни (НБ) является РНК-содержащий парамиксовирус птиц 1 серотипа (ПМВ-1), относящийся к роду *Avulavirus* семейства *Paramyxoviridae*[1,2]. В естественных условиях и при экспериментальном заражении восприимчивыми к ньюкаслской болезни являются более 200 видов птиц, однако клинические признаки болезни варьируют в широких пределах, от легкого бессимптомного заболевания до системной генерализованной инфекции, способной вызывать в стадах смертность до 100 %. В настоящее время в

лабораторной диагностике ньюкаслской болезни (НБ) нашли широкое применение как молекулярно-генетические методы исследования, такие как ПЦР и нуклеотидное секвенирование с последующим филогенетическим анализом, так и традиционные методы – вирусологические и серологические [3,4,5]. Общепринятым стандартом изучения вирулентности вируса ньюкаслской болезни (ВНБ) является оценка индекса патогенности при интрацеребральном заражении цыплят и определение сайта нарезания белка F. Так, согласно критериям Всемирной организации охраны здоровья животных (МЭБ), ньюкаслской болезнью может быть признана инфекция птиц, вызванная парамиксовирусом птиц 1 серотипа, отвечающая не менее, чем одному из критериев: вирус имеет значение индекса патогенности (ICPI) более 0,7, или содержит основные аминокислоты аргинин и лизин в позициях 113-116 в сайте нарезания (F2-белок) и фенилаланина в позиции 117 (F1-белок) [6].

### Материалы и методы

*Выделение вируса.* Вирусовыделение проводили в 10-суточных эмбрионах СПФ-кур (КЭ). Из биологического материала готовили 10% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2) и вводили в аллантоисную полость КЭ в объёме 0,2 мл [6]. Эмбрионы, погибшие после 24 ч. инкубации и более, использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) и проведения дальнейших исследований.

*РТГА.* Для идентификации изолята ВНБ применяли РТГА с использованием антигенов и гипериммунных сывороток к вирусам гриппа и ньюкаслской болезни птиц производства ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир) и Института зоофилактики (IZSve, Италия).

*Определение титра инфекционности вируса НБ.* Применяли метод десятикратных последовательных разведений (от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$ ). Каждое разведение вируса инокулировали в аллантоисную полость четырёх КЭ.

Титр вируса в исходном материале определяли по методу Кербера и выражали в единицах ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

*Определение индекса патогенности вируса НБ при интрацеребральном заражении.* Интрацеребрально каждому из десяти суточных СПФ-цыплят вводили по 0,05 см<sup>3</sup> исследуемой вирусосодержащей экстраэмбриональной жидкости в разведении 1:10 на стерильном ФБР.

В течение 8 суток эксперимента ежедневно оценивали клиническое состояние каждой из птиц, и присваивали коэффициент: 0 – птица клинически здорова; 1 – птица больна, отмечены признаки заболевания (угнетение, отказ от корма и воды, нарушения деятельности респираторного или пищеварительного трактов, нервной системы); 2 – птица мертва. Погибшим птицам присваивали коэффициент 2 ежедневно в течение 8 дней эксперимента [6].

Индекс патогенности (ICPI) вычисляли по формуле:

$$ICPI = \frac{\sum_{i=1}^8 (B_i \cdot 1 + P_i \cdot 2)}{8 \cdot N},$$

где  $B_i$  – число больных в сутки  $i$ ;

$P_i$  – число погибших в сутки  $i$ ;

$N$  – общее количество птиц в эксперименте

В качестве отрицательного контроля использовали 5 суточных СПФ-цыплят, которым интрацеребрально вводили по 0,05 см<sup>3</sup> стерильного ФБР.

*Определение индекса патогенности при внутривенном заражении 6-недельных цыплят полученных из СПФ КЭ.* Для определения IVPI использовали общепринятую методику (6). Исследуемую вирусосодержащую ЭЭЖ в разведении 1:10 на стерильном физиологическом растворе вводили внутривенно десяти цыплятам в дозе

0,1 см<sup>3</sup>. За птицами вели ежедневное наблюдение в течение 10 суток и учитывали клиническое состояние каждой птицы при помощи коэффициента: 0 – птица клинически здорова; 1 – больная (отмечены некоторые признаки заболевания, такие, как угнетение, отказ от корма и воды, нарушения со стороны респираторного или пищеварительного тракта, нервные явления); 2 – тяжелобольная (одновременно наблюдаются несколько ярких клинических признаков инфекции); 3 – птица погибла. Погибшим птицам присваивали коэффициент 3 ежедневно, вплоть до десятых суток опыта. Индекс патогенности вычисляли по формуле:

$$IVPI = \frac{\sum_{i=1}^{10} (B_i \cdot 1 + TB_i \cdot 2 + P_i \cdot 3)}{10 \cdot N}, \text{ где}$$

$B_i$  – количество больных в сутки  $i$ ;

$TB_i$  – количество тяжелобольных в сутки  $i$ ;

$P_i$  – количество погибших в сутки  $i$ ;

$N$  – общее количество птиц в эксперимент

В качестве контроля использовали 5 СПФ-цыплят в возрасте 6-недель, которым внутривенно вводили по 0,1 см<sup>3</sup> стерильного ФБР.

*Реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Очистка продуктов ОТ-ПЦР и нуклеотидное секвенирование.* Выделение РНК, ОТ-ПЦР и секвенирования осуществляли по стандартной методике с помощью специфических праймеров [7,8]. Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили, используя пакет прикладных программ BioEdit и MEGA 4. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности ранее изученных изолятов и опубликованные последовательности вируса ньюкаслской болезни из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

## Результаты и обсуждение

В январе 2013 г. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» поступили 2 пробы патологического материала от павших голубей из голубятен г. Железнодорожск и г. Щигры Курской области. В хозяйствах обоих владельцев отмечали падеж голубей, у которых наблюдали признаки поражения нервной системы и диарею. В обеих пробах патологического материала в ПЦР был выявлен геном ВНБ. В результате секвенирования была определена первичная структура фрагмента гена F, кодирующая сайт нарезания белка F<sub>0</sub>.

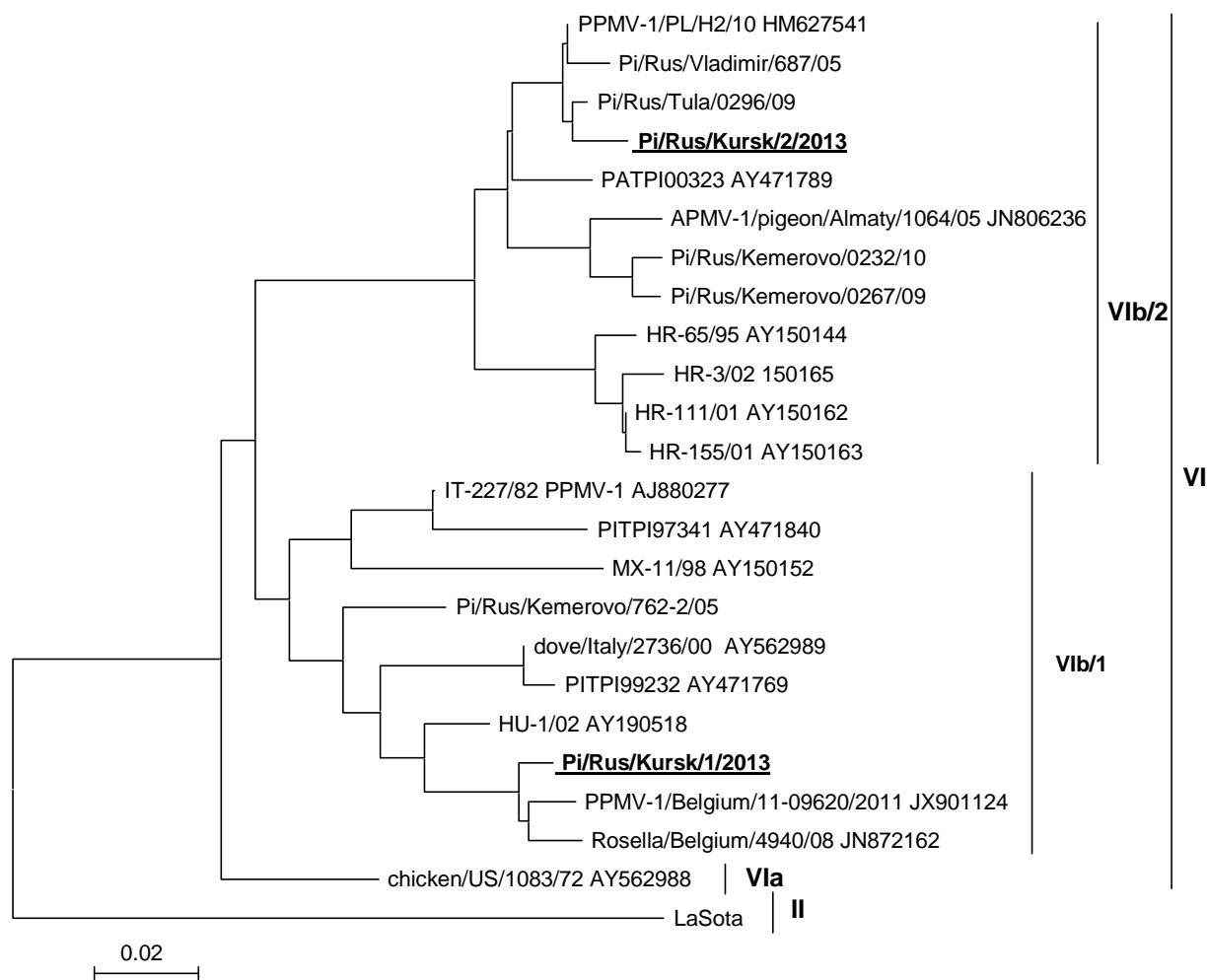
Аминокислотная последовательность данного участка гена для изолята NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13 имела структуру -<sup>112</sup>KRQKR-F<sup>117</sup>-, тогда как для изолята NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13 -<sup>112</sup>RRQKR-F<sup>117</sup>-. Все изоляты имели в составе сайта нарезания парные основные аминокислоты (аргинин и лизин) в позициях 112-113 и 115-116 и остаток фенилаланина в позиции 117, что позволило классифицировать изоляты как вирулентные.

Для сравнения изученных изолятов был проведён их филогенетический анализ и определена генотипическая принадлежность с использованием последовательностей ВНБ, опубликованных в GenBank. Изученные изоляты, согласно полученным филогенетическим исследованиям, относятся к генотипу VI подтипу VIb, который вызвал эпизоотию ньюкаслской болезни у голубей с начала 80-х годов прошлого века [4]. В проведенных нами исследованиях было установлено, что изолят NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13 относится к «классической голубиной» генетической группе VIb/1, а изолят NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13 к генетической группе VIb/2 [1]. На рис показаны филогенетические отношения российских изолятов и ряда референтных штаммов и изолятов генотипа VI подтипа VIb генетических групп VIb/1 и VIb/2.

Ближайшими к изоляту NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13 генетической группы VIb/1, выделенному от голубей в Курской области, относятся

вирусы, выделенные в Бельгии (JX901124, JN872162) и Китае (JX486552) в период с 2008 по 2011 гг ( Данные GenBank). Нуклеотидные отличия на общем фрагменте составляют 1-2% (рис).

К генетической группе VIb/2 принадлежит ряд изолятов, выделенных от голубей в Хорватии (AY150144, AY150162, AY150163, AY150165), Австрии (PATPI00323, AY471789), Польше (PPMV-1/PL/H2/10, NM627541), Казахстане (JN806236), а также большинство изолятов, выделяемых от голубей в Российской Федерации (NDV/Pi/Rus/Vladimir/687/05 (JF827026), NDV/Pi/Rus/Kemerovo/0267/09 (JF827027)), в том числе и изученный в данной работе изолят NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13. Нуклеотидные отличия на общем фрагменте составляют 1-2% (рис).



**Рис. Филогенетические отношения изолятов и штаммов ВНБ, построенные на основе последовательностей гена F (нуклеотиды 1-374 ОРС гена F), опубликованных в GenBank и исследованных в данной работе (названия изолятов выделены жирным шрифтом).**

С целью выделения вируса в аллантоисную полость 10-сут эмбрионов СПФ-кур инокулировали суспензии биологического материала. Через 48-96 ч. инкубации произошла гибель всех эмбрионов. На тушках эмбрионов отмечали кровоизлияния, наиболее выраженные в области лап и головы. В РГА было установлено наличие в ЭЭЖ гемагглютинирующих агентов в титре  $6 \log_2$  и  $8 \log_2$  для изолятов NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13 и NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13, соответственно. В результате типирования микроорганизма в РТГА с панелью гипериммунных сывороток к вирусу

гриппа (H1-N16 подтипы) и парамиксовирусов птиц (1-9 серотипы) гемагглютинирующая активность была подавлена только сывороткой против ПМВ-1 (ВНБ) в титре  $8 \log_2$ .

Титр инфекционной активности изолята NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13 при титровании в КЭ составил  $8,25 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ , а изолята NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13  $8,75 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ .

Для изучения вирулентных свойств изолята ВНБ провели эксперимент по определению индекса патогенности при интрацеребральном заражении цыплят, а также индекс патогенности при внутривенном заражении 6- недельных СПФ-цыплят. Результаты клинического наблюдения за цыплятами представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1-Результаты наблюдения за цыплятами после интрацеребрального заражения

Исследуемый изолят	Клиническое состояние птицы	Период наблюдения, сут.								ICPI
		1	2	3	4	5	6	7	8	
NDV/Pigeon/Rus/K ursk/1/13	здоровые	10	10	6	0	0	0	0	0	1,2
	больные	0	0	4	8	0	0	0	0	
	павшие	0	0	0	2	10	10	10	10	
NDV/Pigeon/Rus/K ursk/2/13	здоровые	10	10	5	0	0	0	0	0	1,21
	больные	0	0	5	6	2	0	0	0	
	павшие	0	0	0	4	8	10	10	10	

При внешнем осмотре инфицированных цыплят отмечали такие признаки заболевания, как угнетение, отказ от корма и воды, парезы конечностей и параличи; при вскрытии наблюдали гиперемию тканей и кровоизлияния в головном мозге, кишечнике, отечность легких. Инкубационный период длился не менее 2 сут, и все цыплята погибли в течение 4-5 сут. эксперимента. Как видно из представленных данных, индекс патогенности имел значение 1,20 для изолята NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13, и 1,21 для изолята NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13, что



позволило идентифицировать изоляты как вирулентный вирус ньюкаслской болезни.

Таблица 2-Результаты наблюдения за цыплятами после внутривенного заражения

Исследуемый изолят	Клиническое состояние птицы	Период наблюдения, сут.										IVPI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
NDV/Pigeon/Rus/Kursk/1/13	здоровые	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
	больные	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	тяжелобольные	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	павшие	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NDV/Pigeon/Rus/Kursk/2/13	здоровые	10	10	10	10	9	9	8	8	8	8	0,26
	больные	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
	тяжелобольные	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	павшие	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	

При внешнем осмотре цыплят, инфицированных изолятом NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13, признаки заболевания (отказ от корма, угнетение, парезы конечностей) отмечались у двух цыплят, погибших на 7 и 8 сутки эксперимента, у остальных цыплят признаков болезни не наблюдалось, индекс IVPI имел значение 0,26. При осмотре цыплят, инфицированных изолятом NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13, птицы оставались клинически здоровыми в течение всего эксперимента, индекс IVPI имел значение 0,0. Ранее было показано, что индексы патогенности при внутривенном заражении цыплят имели низкие значения для вирусов, выделенных от диких видов птиц, в том числе голубей [9,10,11,12]. Низкое значение индекса IVPI в наших исследованиях, по всей видимости, связано с тем, что оба изолята принадлежали к классической «голубиной» линии, и они были неспособны вызвать клиническую болезнь у 6-недельных цыплят без предварительной адаптации. Именно поэтому в настоящее время МЭБ рекомендует применять ICPI для определения потенциальной вирулентности ВНБ.

## Заключение

Проведенные нами исследования показали, что исследуемые изоляты NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13 и NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13 относятся к генетическим группам VIb/1 и VIb/2, соответственно. При проведении интрацеребрального заражения суточных цыплят и молекулярно-генетических исследований подтверждены вирулентные свойства данных изолятов. Индекс IVPI для изолятов NDV/Pi/Rus/Kursk/1/13 и NDV/Pi/Rus/Kursk/2/13 был равен 0,0 и 0,26, соответственно, что характерно для ВНБ, выделенного от голубей.

## Список литературы

1. Ujvari, D. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission / D. Ujvari, E. Wehmann, E.F. Kaleta [et al.] // *Virus Res.* - 2003. - Vol. 96, N 1-2. - P. 63-73.
2. Вирус ньюкаслской болезни, выявленный в популяциях диких и синантропных птиц на территории России в 2008 году / И.П. Пчёлкина, С.Н. Колосов, Т.Б. Манин [и др.] // *Вет. медицина: міжвід. тем. наук. зб.* - 2009. - Вип. 92. - С. 417-422.
3. Биологические свойства вируса ньюкаслской болезни, выделенного в 2010 году из популяции голубей в Кемеровской области / П.И. Репин, И.П. Пчёлкина, И.А. Чвала [и др.] // *Ветеринария сегодня.* - 2013. - №1. - С. 29-34.
4. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons / E.W. Aldous, C.M. Fuller, J.K. Mynn, D.J. Alexander // *Avian Pathol.* - 2004. - Vol. 33, N 2. - P. 258-269
5. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus / T. Toyoda, T. Sakaguchi, K. Imal [et al.] // *Virology.* - 1987 - Vol. 158. - P. 242-247.
6. Newcastle disease // O.I.E. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, adopted 2012.
7. I. P. Pchelkina, T. B. Manin, S. N. Kolosov, S. K. Starov, A. V. Andriyasov, I. A. Chvala, V. V. Drygin, Q. Yu, P. J. Miller, D. L. Suarez. Characteristics of Pigeon Paramyxovirus Serotype-1 Isolates (PPMV-1) from the Russian Federation from 2001 to 2009 / *AVIAN DISEASES* 57:2-7, 2013.
8. I. P. Pchelkina, T. B. Manin, V. V. Drygin, S. K. Starov. Newcastle disease: molecular-biological diagnosis in the Russian Federation / *FAO/IAEA International Symposium on sustainable improvement of animal production and health. Abstract book.* - Vienna, Austria, 2009. - P. 352.
9. Alexander DJ: Newcastle disease diagnosis. In *Newcastle Disease*. Edited by: Alexander DJ. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1988:147-160.
10. Pearson JE, Senne DA, Alexander DJ, Taylor WD, Peterson LA, Russell PH: Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Dis* 1987, 31:105-111

11. Alexander DJ, Gough RE: Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In Diseases of Poultry.. 11 edition. Edited by: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE. Iowa State University Press USA; 2003:63-92.
12. Alexander DJ: Newcastle disease. Chapter 2.3.14. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Paris, France: OIE, the World Organisation for Animal Health; 2009, 576-589

### References

1. Ujvari, D. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission / D. Ujvari, E. Wehmann, E.F. Kaleta [et al.] // *Virus Res.* - 2003. - Vol. 96, N 1-2. - P. 63-73.
2. Virus n'jukaslskoj bolezni, vyjavlennyj v populacijah dikih i sinantropnyh ptic na territorii Rossii v 2008 godu / I.P. Pchjolkina, S.N. Kolosov, T.B. Manin [i dr.] // *Vet. medicina: mizhvid. tem. nauk. zb.* - 2009. - Vip. 92. - S. 417-422.
3. Biologicheskie svojstva virusa n'jukaslskoj bolezni, vydelenogo v 2010 godu iz populjacii golubej v Kemerovskoj oblasti / P.I Repin, I.P. Pchjolkina, I.A Chvala [i dr.] // *Veterinarija segodnja.*- 2013.-№1.- S. 29-34.
4. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons / E.W. Aldous, C.M. Fuller, J.K. Mynn, D.J. Alexander // *Avian Pathol.* - 2004. - Vol. 33, N 2. - P. 258-269
5. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus / T. Toyoda, T. Sakaguchi, K. Imal [et al.] // *Virology.* - 1987 - Vol. 158. - P. 242-247.
6. Newcastle disease // O.I.E. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, adopted 2012.
7. I. P. Pchelkina, T. B. Manin, S. N. Kolosov, S. K. Starov, A. V. Andriyasov, I. A. Chvala, V. V. Drygin, Q. Yu, P. J. Miller, D. L. Suarez. Characteristics of Pigeon Paramyxovirus Serotype-1 Isolates (PPMV-1) from the Russian Federation from 2001 to 2009 / *AVIAN DISEASES* 57:2-7, 2013.
8. I. P. Pchelkina, T. B. Manin, V. V. Drygin, S. K. Starov. Newcastle disease: molecular-biological diagnosis in the Russian Federation / *FAO/IAEA International Symposium on sustainable improvement of animal production and health. Abstract book.* - Vienna, Austria, 2009. - P. 352.
9. Alexander DJ: Newcastle disease diagnosis. In Newcastle Disease. Edited by: Alexander DJ. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1988:147-160.
10. Pearson JE, Senne DA, Alexander DJ, Taylor WD, Peterson LA, Russell PH: Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Dis* 1987, 31:105-111
11. Alexander DJ, Gough RE: Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In Diseases of Poultry.. 11 edition. Edited by: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE. Iowa State University Press USA; 2003:63-92.
12. Alexander DJ: Newcastle disease. Chapter 2.3.14. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Paris, France: OIE, the World Organisation for Animal Health; 2009, 576-589