

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАГРИППА ТИПА 3 У ВОДНЫХ БУЙВОЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Н. И. ИСКАНДАРОВА, кандидат ветеринарных наук, доцент,
О. Г. ПЕТРОВА, доктор ветеринарных наук, профессор,
Е. С. ОДЕГОВ, ветеринарный врач,
Уральский государственный аграрный университет
(620075, Екатеринбург, ул. К. Либкнехта, д. 42)

Ключевые слова: парагрипп-3 крупного рогатого скота, острые респираторные вирусные инфекции, буйволы, филогенетический анализ, эпизоотология, секвенирование, изоляты, генотип.

Парамиксовирусы – известные патогены ЦНС и дыхательной системы у многих видов хозяев. В последние несколько десятилетий появилось достаточно много новых парамиксовирусов, вызывающих разрушительные болезни у разных водных и наземных животных, в том числе опасных для людей. Вирус парагриппа типа 3 (PIV3) представляет собой эллиптический, одноцепочечный, отрицательно-полярный РНК-вирус рода *Respirivirus*, семейства *Paramyxoviridae*. Род *Respirivirus* включает в себя вирусы парагриппа человека типа 1 и 3 (соответственно HPIV1 и HPIV3), вирус Сендай (мышинный PIV1) и вирус парагриппа-3 (BPIV3). В некоторых случаях, когда животные подвергаются высоким стрессовым нагрузкам, заражение BPIV3 может способствовать повреждению тканей и иммуносупрессии, что приводит к тяжелой бронхопневмонии от вторичных бактериальных инфекций. Вирус парагриппа типа 3 (PIV3) был выделен у молочного стада водных буйволов (*Bubalus bubalis*), естественно зараженных респираторными и репродуктивными клиническими формами. Исследование назальных и вагинальных мазков, собранных у 12 больных буйволов, привело к выделению трех изолятов парамиксовируса от двух животных. Антигенные, морфологические и биологические характеристики этих трех изолятов по существу были аналогичны характеристикам членов семейства *Paramyxoviridae*. Антигенный анализ методом прямой иммунофлуоресценции и перекрестной нейтрализации сопоставил эти изоляты с вирусом парагриппа 3 у коров (BPIV3). Изучены нуклеотидный, аминокислотный и филогенетический анализ последовательностей парных матричных генов изолятов буйвола и шести изолятов полевых BPIV3 из стад коров в Аргентине. Изоляты буйволов были похожи на генотип В (BPIV3b), в то время как шесть изолятов BPIV3 от коров были похожи на генотипы А (BPIV3a) и С (BPIV3c). Это первая характеристика BPIV3 у водного буйвола. Согласно проанализированным образцам в Аргентине генотип В был обнаружен у буйволов, а генотипы А и С – у крупного рогатого скота.

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF BOVINE PARAINFLUENZA VIRUS TYPE 3 FROM WATER BUFFALOES (A REVIEW OF THE LITERATURE)

N. I. ISKANDAROVA, candidate of veterinary sciences, associate professor,
O. G. PETROVA, doctor of veterinary sciences, professor,
E. S. ODEGOV, veterinary doctor,
Ural State Agrarian University
(42 K. Libknehta str., 620075, Ekaterinburg)

Keywords: parainfluenza-3 cattle, acute respiratory viral infections, buffalo, phylogenetic analysis, epidemiology, sequencing, isolates, genotype.

Paramyxoviruses – known pathogens of the CNS and respiratory systems of many host species. In the last few decades, there are quite a lot of new paramyxoviruses that cause devastating diseases in various aquatic and terrestrial animals, including humans. Parainfluenza virus type 3 (PIV3) is an elliptic, single-stranded, negative-polar RNA virus of the genus *Respirivirus*, of the family *Paramyxoviridae*. *Respirivirus* genus includes the viruses of human parainfluenza type 1 and 3 (respectively, HPIV1 and HPIV3), Sendai virus (murine PIV1) and parainfluenza virus-3 (BPIV3). In some cases, when the animals are subjected to high stress loads, infection with BPIV3 can contribute to tissue damage and immunosuppression that leads to severe bronchopneumonia from secondary bacterial infections. Parainfluenza virus type 3 (PIV3) was isolated from dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally affected with respiratory and reproductive clinical conditions. Examination of nasal and vaginal swabs collected from 12 diseased buffaloes led to the isolation of three paramyxovirus isolates from two animals. Antigenic, morphological and biological characteristics of these three isolates were essentially similar to those of members of the *Paramyxoviridae* family. Antigenic analysis by direct immunofluorescence and cross neutralization test placed these isolates together with bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3). Nucleotide and amino acid phylogenetic analysis of partial matrix gene sequences of the buffalo isolates and six field BPIV3 isolates from bovines in Argentina were studied. Buffalo isolates were similar to genotype B (BPIV3b) while the six BPIV3 isolates were similar to genotypes A (BPIV3a) and C (BPIV3c). This is the first characterization of BPIV3 in water buffalo. According to the samples analyzed, in Argentina, the genotype B was found in buffalo and the genotypes A and C were found in cattle.

Положительная рецензия представлена Н. А. Татарниковой, доктором ветеринарных наук, профессором Пермского государственного аграрно-технологического университета им. академика Д. Н. Прянишникова.

Сравнительно недавно по историческим меркам (первое тысячелетие н. э.) это грозное животное можно было встретить чуть ли не повсеместно. Огромный ареал обитания буйволов простирался от Месопотамии до земель южного Китая, а в XIX в. он был завезен в Австралию и заселил северную часть континента. Сейчас животное можно встретить в Непале, Бутане, Лаосе, Таиланде, Индии, Камбодже, Аргентине и на Шри-Ланке. До середины XX в. они водились и в Малайзии, но, по-видимому, были истреблены окончательно. В настоящее время численность диких азиатских буйволов в дикой природе продолжает сокращаться, вид находится на грани полного вымирания. Водный буйвол название свое получил не случайно. Его образ жизни самым тесным образом связан с различного рода водоемами с медленно текущей либо стоячей водой, особенно часто он выбирает тростниковые и высокотравные заросли по берегам, а также заболоченные джунгли и речные долины. Стадо пасется в ранние утренние и вечерние часы, когда на улице еще прохладно. Основной рацион (до 70 %) составляет водная растительность. Жаркие дни буйволы проводят, погрузившись до самой головы в воду или жидкую грязь, зачастую соседствуя с носорогами. Животное очень плохо переносит жару, так как потовые железы крайне слабо развиты. В воде он находится в безопасности, тело становится легким и пребывает в статике, а потому расход энергии сокращается. Эта особенность объясняет, почему животное назвали «водный буйвол», в зоологической таксономии его именуют азиатским или индийским буйволом, и это самый крупный бык на планете.

Вытекающее заболевание является частью комплекса респираторных заболеваний крупного рогатого скота (BRDC – ОРЗ КРС) и считается наиболее значимым заболеванием, связанным с крупным рогатым скотом в США [2, 5] и, возможно, во всем мире. Другие респираторные вирусы, такие как герпесвирус – 1 (вирус инфекционного ринотрахеита, ИРТ), вирусная диарея крупного рогатого скота (BVDV, ВД-БС) и респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (BRSV, РСИ), также были связаны с развитием BRDC у крупного рогатого скота [4, 6]. Клиническое проявление инфекции с BPIV3 (парагрипп-3) может значительно варьироваться, начиная от бессимптомного течения и заканчивая тяжелыми респираторными заболеваниями. В большинстве случаев при вирусе BPIV3 проявляются обычные клинические признаки, включающие кашель, лихорадку и назальные истечения [6].

Генотипы А (BPIV3a), В (BPIV3b) и С (BPIV3c) описываются на основе генетического и филогенетического анализа [7]. Генотип BPIV3b гипотетически мог произойти от штамма, который недавно перешел

от другого вида хозяина к крупному рогатому скоту [8]. Вирус PIV3 был обнаружен у самых разных млекопитающих, в том числе у крупного рогатого скота, людей, овец [7], коз [8], бизонов [9], морских свинок [10], черно-белых носорогов [11], лосей [12] и верблюдов [14]. Сообщалось о межвидовых инфекциях во многих случаях, включающих: HPIV-3 у морских свинок [10], BPIV3 у человека, BPIV3 у овец и PIV3 у крупного рогатого скота [15]. Проведенные серологические исследования в Аргентине показали высокую распространенность антител против BPIV3 (77 %) у крупного рогатого скота в основных регионах животноводства [3, 13]. Кроме того, положительная серология была зарегистрирована у домашних и диких южноамериканских верблюдов, также вирус был выделен у крупного рогатого скота и овец [15]. Однако мало известно о распространении BPIV3 у крупного рогатого скота и других жвачных животных в Аргентине, а также о генотипах, которые присутствуют в этой южноамериканской стране.

Промышленные системы по выведению скота смешались, что дало рост альтернативным видам производства, таким как разведение водных буйволов (*Bubalus bubalis*), которые сосуществовали в том же месте, что крупный рогатый скот. Разведение водных буйволов представляет собой важную экономическую альтернативу для Аргентины, обеспечивающую доступ к национальным и международным рынкам. Этот вид восприимчив к нескольким вирусным инфекциям [14], включая BPIV3, как сообщалось еще в начале 1966 г. в Египте [6]. В дополнение к своей потенциальной значимости в отношении здоровья буйволов это обнаружение имеет эпидемиологическое значение из-за риска передачи вируса крупному рогатому скоту. Цель этого исследования состояла в том, чтобы охарактеризовать изоляты антигенного и генетического происхождения BPIV3 от вспышки респираторного и репродуктивного синдрома у молочных буйволов, а также сравнить изолят буйвола с современным BPIV3, циркулирующим в стадах крупного рогатого скота.

Результаты.

Морфологические и биологические свойства изолятов вируса ПГ-3 буйвола

PIV3 был успешно изолирован от двух из 12 изученных водных буйволов, в одном случае из назальных (7 N) и вагинальных (7 V) мазков, а в другом – только из вагинального мазка (2 V).

Изоляты продуцировали характерные цитопатические эффекты (CPE) на клетках MDBK, аналогичные для эталонного штамма BPIV3, со многими разрозненными, округлыми, невосприимчивыми клетками и небольшими синцитиями. CPE были впервые визуализированы на втором проходе, после трех дней после инокуляции (DPI) и CPE наблюдались

Таблица 1
 Сравнение процентного содержания идентичности в аминокислотных и нуклеотидных последовательностях области 217-bp гена M среди изолятов буйвола и быка и контрольных штаммов ВРІV3
 Table 1
 Comparison of identity percentages in amino acid and nucleotide sequences of the 217-bp region of the M gene among buffalo and bovine isolates and reference strains of ВРІV3

	ВРІV3эталонный штамм <i>ВРІV3a ref strain</i>	ВРІV3бэталонный штамм <i>ВРІV3b ref strain</i>	ВРІV3сэталонный штамм <i>ВРІV3c ref strain</i>	Изоляты буйволов <i>Buffalo isolates</i>			Изоляты быков <i>Bovine isolates</i>						Вирус Сендай <i>Sendaivirus</i>	
				ВРІV3b			ВРІV3с			ВРІV3а				
				7 V	2 V	7 N	1882	1885	100204	105189	55275	10237		
AF178655	AF178655		SD0835	97	97	97	99	99	99	99	100	100	100	AB005795
Q5592	Q5592			ID	100	100	99	99	99	99	97	97	97	65
SD0835			ID	89	99	99	ID	100	100	100	99	99	99	64
7V				94	ID	100	88	99	99	99	97	97	97	65
2V				94	100	ID	88	99	99	99	97	97	97	65
7N				94	100	ID	88	99	99	99	97	97	97	65
1882				88	87	87	99	100	100	100	99	99	99	64
1885				88	87	87	99	ID	100	100	99	99	99	64
100204				88	87	87	99	87	100	ID	99	99	99	64
105189				86	87	87	87	87	100	100	ID	100	100	65
55275				87	86	86	87	87	87	87	100	ID	100	65
10237				86	86	86	88	87	87	87	99	100	ID	65
AB005795				61	63	63	65	64	64	64	64	64	63	ID

N

ID – Идентичный результат

A – Аминокислотная идентичность

N – Нуклеотидная идентичность

ID – Identical

A – Amino acid identity

N – Nucleotide identity

Ref – reference

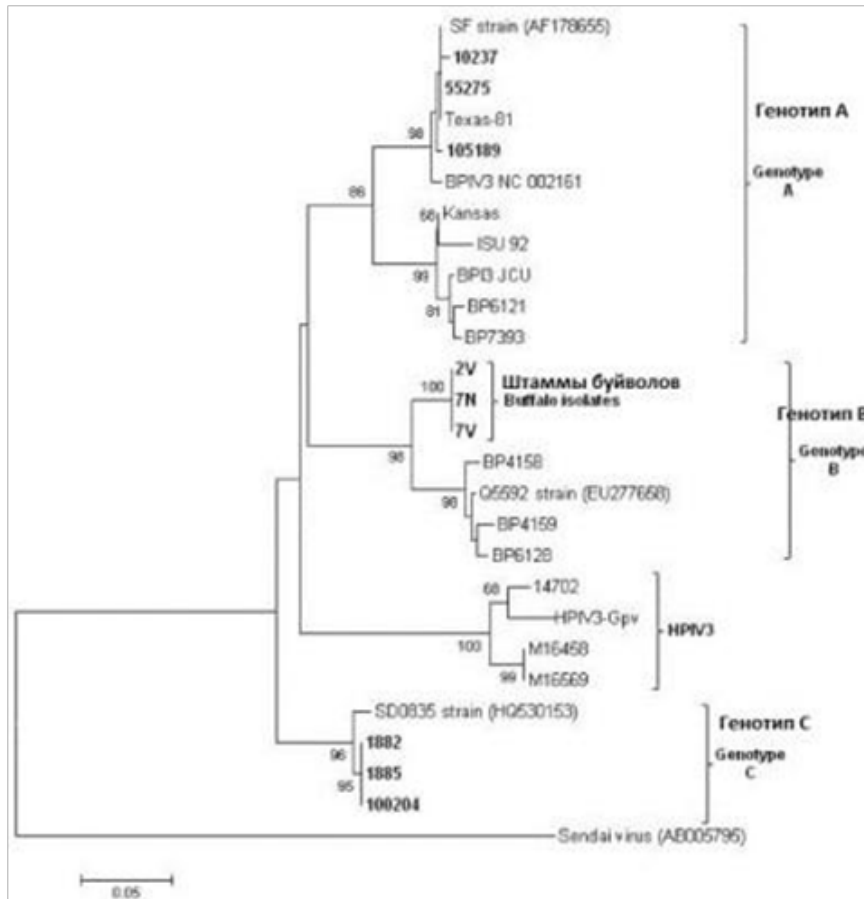


Рис. 1. Филогенетический анализ на основе фрагмента гена М. Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения MEGA 4 с 1000 копий бутстрапов. Филогенетический анализ, основанный на фрагментах нуклеотидных фрагментов гена М, по сравнению с другими членами рода *Respirovirus*. Аргентинские изоляты выделены жирным шрифтом. Номера доступа GenBank представлены в материалах и методах

Fig. 1. Phylogenetic analysis based on M gene fragment. Phylogenetic analysis was performed using MEGA 4 software with 1.000 bootstrap replicates. Phylogenetic analysis based on M gene fragment nucleotide sequences compared to other *Respirovirus* genus members. The Argentinean isolates are indicated in bold. GenBank accession numbers are presented in Materials and Methods

на 4-й или 5-й день. Обе поликлональные сыворотки анти-BPIV3 и флуоресцирующая анти-BPIV3 IgG реагировали с клетками, инфицированными этими изолятами. Электронная микроскопия показала сферические плеоморфные вирионы диаметром приблизительно 100–300 нм, которые были морфологически неотличимы от парамиксовирусов. Интактные вирионы были окутаны и плотно скучены, что характерно для BPIV3. Были видны нуклеокапсиды, имевшие типичный образ «елочки» (рис. 1).

Три изолята (7 N, 7 V и 2 V) были способны агглютинировать RBCs (эритроциты) с титрами УНА 16, 8 и 4 соответственно. Агглютинированные эритроциты элюируются через 1 ч, что предполагает функцию / активность нейраминидазы. Тест НИ (ингибирование гемагглютинации) показал 58 % положительных реакций с титрами от 1,6 до 2,5.

Молекулярная характеристика ПЦР и секвенирование

Фрагмент М-гена, соответствующий ожидаемому размеру 328 pb, был амплифицирован из трех вирусных изолятов (7 N, 7 V и 2 V) с помощью ПЦР. Как и ожидалось, пары праймеров не амплифицировались с использованием геномного материала BRSV в ка-

честве матрицы. Анализ выравниваний 271 pb соответствующих последовательностей показал, что они связаны со штаммом Q5592 BPIV3 из Австралии с 94 %-й нуклеотидной идентичностью и 100 %-й предсказанной идентичностью аминокислот (табл. 1).

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ фрагмента М-гена трех изолятов аргентинских буйволов (7 N, 7 V и 2 V), вместе с другими парамиксовирусами изоляты буйвола поместили в ту же филогенетическую ветвь, что и BPIV3 (рис. 1). В частности, изоляты, сгруппированные с генотипом BPIV3b, представленным в древе австралийским изолятом (Q5592). BPIV3b отличается от ранее охарактеризованных элементов BPIV3, представленных генотипами А и С.

Чтобы определить, циркулирует ли генотип BPIV3 буйвола у крупного рогатого скота, тот же фрагмент гена был амплифицирован с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы РНК BPIV3, выделенную у шести бычков региона Буэнос-Айреса. Три из шести изолятов показывают 98 %-ю нуклеотидную идентичность и 100 %-ю аминокислотную идентичность с изолятом BPIV3с (SD0835), а остальные три – 99 %-ю нуклеотидную идентичность и 100 %-ю

Таблица 2

Сравнение нейтрализующих титров BPIV3b, выделенных от буйволов, и контрольного штамма BPIV3a

Table 2

Comparison of neutralizing titers against BPIV3b isolated from buffaloes and against a BPIV3a reference strain

24 буйвола 24 buffaloes		Титры антител BPIV3b изолированных от буйвола <i>Antibody titers against BPIV3b isolate from buffalo</i>					Промежуточный итог <i>Subtotal</i>
		Отрицательно <i>Negative</i>	0,3	0,6	0,9	1,2	
	Отрицательно <i>Negative</i>	3	1	2	1		7
	0,3				1		1
	0,6		1	2	1	2	6
	0,9			3	4	1	8
* Титры антител к штамму BPIV3a SF * <i>Antibody titers against BPIV3a SF strain</i>	1,2					2	2
Промежуточный итог <i>Subtotal</i>		3	2	7	7	5	24

* Титры нейтрализации рассчитывались как десятичный логарифм обратной реакции последнего разбавления с явным цитопатическим эффектом. Каждая клетка в таблице содержит количество животных с титрами антител против каждого вируса

* Neutralization titers were calculated as the decimal logarithm of the reciprocal of the last dilution with clear cytopathic effects. Each cell contains the number of animals with the antibody titers against each virus

аминокислотную идентичность с эталонным изолятом BPIV3a (SF). Филогенетическая характеристика показала, что изоляты крупного рогатого скота относятся к генотипам BPIV3a и BPIV3c, о которых до сих пор сообщалось лишь в Северной Америке, Европе и Китае.

Реакция сывороточной нейтрализации

Сыворотки буйволов (n = 24) анализировали с помощью перекрестной нейтрализации: три были отрицательными для обоих вирусов, BPIV3a и b, девять показали более высокие титры против BPIV3b, выделенных у буйвола, четыре показали более высокие титры против BPIV3a, а остальные 11 имели одинаковые титры для обоих вирусов (табл. 2). В целом сыворотки от буйволов показали более высокие титры антител против изолированного вируса буйвола, чем против эталонного вируса.

В настоящем исследовании описывается выделение BPIV3 от двух водных буйволов с респираторными и репродуктивными признаками. Вирус был изолирован от назальных и вагинальных мазков от двух из 12 животных с изученными репродуктивными и респираторными симптомами. На данный момент мало известно о патогенезе этого вируса у буйвола. Если существует синдром, подобный синдрому, присутствующему у крупного рогатого скота, где вирус претерпевает экскрецию [15], неудачное выделение вируса от оставшихся затем животных с симптомами может быть связано с временным интервалом отбора проб из-за того, что в конце могла иметь место острая инфекция.

Иммуноферментный анализ показал сильное и специфическое связывание антител против BPIV3, к клеткам, инфицированным этими тремя положительными

клиническими изолятами. Сыворотки от буйволов смогли нейтрализовать активность изолятов 7 N, 7 V и 2 V, а также контрольного бычьего вируса (штамм SF BP3), но титры нейтрализации против последних были ниже, чем против изолятов от буйвола, что указывает на антигенные различия.

Последовательность М-амплифицированного фрагмента показала 94 %-ю нуклеотидную идентичность между изолятами буйвола и штаммом Q5592 BPIV3b из Австралии [8]. Это первый отчет о молекулярной характеристике BPIV3, выделенной у буйволов. Чтобы определить гомологию между изолятами PIV3 от аргентинской коровы и буйвола, мы ретроспективно охарактеризовали шесть изолятов, собранных из вспышек ОРВИ крупного рогатого скота, которые произошли в 2009 и 2011 гг. Эти изоляты показали высокий процент нуклеотидной и аминокислотной идентичности с генотипами А и С. В Аргентине только несколько сообщений о циркуляции BPIV3 описывали изоляцию, вирусологическую и физико-химическую характеристику PIV3 у аргентинского крупного рогатого скота и овец в 1974 г. [11]. Однако филогенетические исследования этих изолятов не проводились. Филогенетические реконструкции, основанные на выравнивании нуклеотидных последовательностей М-гена, показали, что изоляты 7 N, 7 V и 2 V сгруппированы в группу генотипов В. До сих пор этот генотип сообщался только в Австралии [8]. Филогенетическое положение аргентинских изолятов буйволов может быть сопоставлено с антигенными различиями, наблюдаемыми в исследованиях перекрестной нейтрализации, где контрольный штамм, принадлежащий группе BPIV3a, был менее нейтрализован, чем изоляты буйвола из сывороток. Поэто-

му серологическая и молекулярная характеристики изолятов буйвола BPV13 показывают, что эти вирусы более похожи на В, чем на эталонный штамм А (SF) и С генотипы BPV13 (эталонный штамм SD0835). Интересно, что генотип В, выделенный от буйволов, не был найден среди бычьих образцов, проанализированных в этой работе и сгруппированных с генотипами А и С. Генотип В до сих пор наблюдался только в Австралии с гипотезой о недавнем пересечении другого вида у крупного рогатого скота [8]. Это свидетельство генотипа В у буйволов должно нуждаться в дальнейшем исследовании, чтобы знать, может ли этот вид быть одним из видов-хозяев этого генотипа. Поэтому анализ большего количества изолятов от крупного рогатого скота и буйволов необходим для определения того, распространяются ли три генотипа у обоих видов или наблюдаемое распределение является репрезентативным. Важно отметить, что это первый отчет о геномной циркуляции генотипов В и С у крупного рогатого скота из Австралии и Китая соответственно. Циркуляция генотипа С только в Китае была связана с географическим ограничением [7]. Эти гипотезы можно исключить из наших результатов, и данное наблюдение, скорее всего, связано с относительной частотой этих генотипов по сравнению с проанализированными образцами.

Насколько нам известно, это первый отчет об изоляции вируса парагриппа типа 3 из вагинальных секретов. Однако важно подчеркнуть, что наличие вируса в секрете может быть связано с генитальным контактом между животными. Доказательства вирусной репликации в слизистой оболочке половых органов требуют новых исследований.

Методы

Назальные и вагинальные мазки были получены от 12 водных буйволов с молочной фермы в аргентинской провинции Чако во время вспышки респираторных и репродуктивных заболеваний в июле 2009 г. У этих животных была белая волокнистая слизь в носу и вульве. Образцы инокулировали в культурах клеток почки Мадина Дарби (MDBK). В качестве эталона использовали штамм SF BPV13. Клетки ежедневно анализировали под оптическим микроскопом, чтобы наблюдать появление цитопатических эффектов.

Изоляты крупного рогатого скота были получены от крупного рогатого скота с респираторными синдромами, пять из них в 2009 г. и оставшийся изолят – в 2011 г. Их собирали и усиливали в лаборатории Azul (провинция Асиль-Буэнос-Айрес) из очагов провинции Буэнос-Айрес.

Реакция иммунофлюоресценции

Изоляты вируса инокулировали в конглобатные клетки MDBK в 8-луночных камерах при MOI 1,0, 0,1 и 0,01. Для прямого ИФ-теста клетки с цитопатическим эффектом фиксировали 99,5 % ацетоном и затем инкубировали с FITC anti-BPV13 IgG (Ames). Для непрямого ИФ клетки инкубировали с поликлональным антителом против антитела к PIV3 (NVSL), разбавленным 1 : 100 в PBS при 37 °С во влажной среде в течение 1 ч. Затем клетки инкубировали с FITC антителом IgG (KPL). В обоих случаях слайды были слоистыми с буферизированным глицерином и наблюдались при эпифлуоресценции в микроскопе Olympus BX 40 + H hal.

Титры были выражены как log₁₀ обратной реакции ингибитора гемагглютинации максимального разведения, умноженной на постоянный коэффициент 8.

Трансмиссионная электронная микроскопия

25 мл вирусной суспензии (16 HAU) помещали на коллоидную мембрану, нанесенную на медную сетку, отрицательно окрашивали фосфорновольфрамовой кислотой и наблюдали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL 1200 EX II.

Анализ гемагглютинации

и анализ ингибирования гемагглютинации

Последовательные двукратные разведения культуральных супернатантов из инфицированных MDBK (50 мкл) титровали против 50 мкл эритроцитов морской свинки в микропланшетах V-bottom (Nunc). После инкубации при 4 °С в течение 4 ч гемагглютинацию оценивали по появлению или отсутствию клеток с красной пуговкой. Результаты были выражены в виде гемагглютинирующих единиц / 50 мкл (HAU / 50 мкл). Последнее разведение, при котором наблюдалась гемагглютинация, принималось за конечную точку гемагглютинирующей активности. Разведение выражает количество гемагглютинирующих единиц или титр вируса в УНА.

Для реакции торможения гемагглютинации (РТГА) применялись последовательные двукратные разведения сывороток от буйволов, им давали возможность реагировать с фиксированной дозой контрольного вирусного гемагглютинина (8 УНА) с последующим добавлением агглютинируемых эритроцитов морской свинки. Титры были выражены как log₁₀ обратной реакции ингибитора гемагглютинации максимального разведения, умноженной на постоянный коэффициент 8.

ПЦР и секвенирование

Зараженные клетки MDBK соскабливали с планшетами и гомогенизировали тремя циклами замораживания и оттаивания. После начального центрифугирования при 3000 оборотов в течение 15 мин к клеточным лизатам добавляли полиэтиленгликоль 8000 (Sigma), 10 % (мас. / Об. конечная концентрация) с последующей инкубацией в течение 4 ч при 4 °С. Вирус гранулировали при 12 000 оборотов в течение 60 мин при 4 °С. Вирусную геномную РНК экстрагировали из гранулы вируса с использованием RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Олигонуклеотидные праймеры для определения и идентификации BPV13 (Mfwd: 5'AGTGATCTAGATGATGATCCA 3'nt – 3960 и Mrev:

5'GTTATTGATCCAAATGGCTGT -3'nt – 4288) были разработаны на основе сегмента 328 bp консенсусного гена матрицы BPIV3 (M). Комплиментарную ДНК синтезировали с использованием специфического олигонуклеотидного праймера (Mfw) и обратной транскриптазы MMLV (Promega). Затем для амплификации фрагмента гена M использовали ДНК-полимеразу Go Taq (Promega).

Праймеры Mfw и Mrev тестировали на специфичность с помощью ПЦР на BRSV (респираторно-синцитиальный вирус) РНК, что давало отрицательные результаты. Продукты ПЦР очищали с использованием набора для очистки ПЦР Qiaquick (Qiagen). Реакцию секвенирования выполняли дважды в обоих направлениях с помощью набора BigDye Terminator v3.0 (Applied Biosystems, Lennik, Belgium) и анализировали с помощью анализатора ДНК ABI Prism 3730 (Applied Biosystems).

Филогенетический анализ

М фрагмента нуклеотида и прогнозируемые аминокислотные последовательности изолятов буйвола были отредактированы и проанализированы с помощью BioEdit версии 7.0.5.3. Выравнивание этих последовательностей вместе с другими из репрезентативных изолятов ранее идентифицированного вируса парагриппа 3 у человека (HPIV3) было обнаружено Clustal W. Нуклеотидные последовательности фрагментов M были использованы для филогенетических анализов с использованием программного обеспечения MEGA версии 4 [13]. Филогенетические отноше-

ния исследовались методом бутстрепа (1000 повторов) с использованием метода соседнего соединения с двухпараметрической моделью Кимуры для анализа данных нуклеотидов. Номера доступа в GenBank последовательностей, используемых в филогенетическом дереве: контрольные штаммы BPIV3: штамм BPIV3 Kansas / 15626/84, D84095; BPIV3, NC 002161, AF178654; SF штамм AF178655; Q5592, EU277658; SD0835, HQ530153; BPI3 JCU, EF 108221; BP4158 штамм EF 108222; BP4159, EF 108223; BP6121, EF 108224; BP6128, EF 108225; BP7393, EU266069; ISU92, EU439428; Texas-81, EU439429 и HPIV3: штаммы HPIV, M16458, M16569; HPIV3-Gpv, штамм NC 001796 и 14702, EU424062. Сендай (AB005795) как аутгруппа.

Реакция нейтрализации (РН)

Тесты на кросс-нейтрализацию проводили в 96-луночных планшетах MDBK, путем инкубации 200 TCID₅₀ на 50 мкл изолятов из семи буйвольных вирусов или контрольного штамма BPIV3 (SF) с 50 мкл инактивированных ионами двукратно разведенных сывороток. Планшет инкубировали в течение пяти дней при 37 °С, под 5 % CO₂, а затем подвергали скринингу на присутствие или отсутствие цитопатических эффектов в оптическом микроскопе (увеличение 400 раз) для определения титровальных нейтрализаций вируса. Титры нейтрализации рассчитывались как десятичный логарифм обратной реакции последнего разбавления сыворотки с явным цитопатическим эффектом.

Литература

1. Баттс Н. Генетический анализ вирусов / Н. Баттс, Е. А. Гудвин, Дж. Р. Уинтон // Журнал «Вирусология». 2012. № 93. Т. 6. С. 1247–1252.
2. Гроот Р. Дж. Семейство коронавирусов / Р. Дж. Гроот, С. Бейкер и др. // Вирусная таксономия : девятый доклад международного комитета по таксономии вирусов / под ред. А. М. К. Кинг, М. Дж. Адамс, Е. Б. Карстенс, Е. Дж. Лефковитц. Оксфорд : Элсевер, 2011. С. 806–828.
3. Ван дер Вал Ф. Дж., Ахтерберг Р. П., де Боэр С. М., Бошра Х., Брун А., Массен С. В. и др. Одновременное обнаружение антител против нуклеокапсид вируса лихорадки долины Рифт и гликопротеина GN // Вирусологические методы. 2012. № 183. С. 99–105.
4. Ванг Л. Ф., Коллинз П. Л., Фучер Р. А. М., Курат Г., Ламб Р. А., Рэндалл Р. Е., Рима В. К. Семейство Парамиксовирусов // Вирусная таксономия : девятый доклад международного комитета по таксономии вирусов / под ред. А. М. К. Кинг, М. Дж. Адамс, Е. Б. Карстенс, Е. Дж. Лефковитц. Оксфорд : Элсевер, 2011. С. 672–685.
5. Вирус. Таксономия: выпуск 2015 // URL : <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
6. Всемирная организация охраны здоровья животных (МЭБ). Лихорадка долины Рифт. Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных 2015. Глава 2.1.14 // URL : <http://BCP.meb.int/руководство-для-диагностики-тестов-и-вакцин-для-terrestrialanimals>.
7. Всемирная организация охраны здоровья животных (МЭБ). Руководство по диагностическим тестам и вакцинам 2014. Лихорадка долины Рифт. Р. : OIE, 2014 // URL : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.14_RVF.pdf (по состоянию на 3 января 2015 г.).
8. Всемирная Хелатная Организация. Международное медико-санитарное регулирование вступило в силу (последнее цитирование – 15 января 2012 г.) // URL : http://www.whoedia.org/en/section1_1417.гадюка.
9. Дмитриев А. Ф. Внутритрубочное инфицирование потомства у продуктивных животных / А. Ф. Дмитриев // Ветеринарная патология. 2012. № 2. С. 25–29.

10. Концевая Н. Н. Вакцины КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л для создания колострального иммунитета у молодняка крупного рогатого скота / Н. Н. Концевая, Г. Л. Соболева, И. В. Непоклонова // Ветеринария. 2016. № 5. С. 8–13.
11. О результатах работы референтной лаборатории болезней КРС ФГБУ «ВНИИЗЖ» за I квартал 2015 г. // Новости с официального сайта Россельхознадзора. URL : <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/13068.html>.
12. Симмондс П. Семейство флавивирусов / П. Симмондс, П. Бехер, М. С. Коллетт и др. // Вирусная таксономия : девятый доклад международного комитета по таксономии вирусов / под ред. А. М. К. Кинг, М. Дж. Адамс, Е. Б. Карстенс, Е. Дж. Лефковитц. Оксфорд : Элсевер, 2011. С. 1003–1020.
13. Чжэн С. Геномная и эволюционная характеристика нового вируса гриппа / С. Чжэн, З. Ран, Д. Ванг, А. Хопп и др. // Архивы вирусологии. 2014. № 159. С. 249–255.
14. Уилсон В. К. Диагностические подходы к лихорадке Рифт / В. К. Уилсон // Биология. 2013. № 135. С. 73–80.
15. Эллис Ю. А. Парагриппа-3 крупного рогатого скота вирус / Ю. А. Эллис // Ветеринарная клиника. 2010. В. 26. № 3. С. 575–593.

References

1. Batts W. N. Genetic analysis of a novel nidovirus from fathead minnows / W. N. Batts, A. E. Goodwin, J. R. Winton // J. Gen. Virol. 2012. No. 93. Vol. 6. P. 1247–1252.
2. Groot R. J. de. Family Coronaviridae / R. J. de Groot, S. C. Baker, R. Baric et al. // Virus Taxonomy : ninth report of the international committee on taxonomy of viruses / eds. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz. Oxford : Elsevier, 2011. P. 806–828.
3. Van der Wal F. J., Achterberg R. P., de Boer S. M., Boshra H., Brun A., Maassen C. B. et al. Bead-based suspension array for simultaneous detection of antibodies against the Rift Valley fever virus nucleocapsid and Gn glycoprotein // J VirolMethods. 2012. No. 183. P. 99–105.
4. Wang L. F., Collins P. L., Fouchier R. A. M., Kurath G., Lamb R. A., Randall R. E., Rima B. K. Family Paramyxoviridae // Virus Taxonomy : ninth report of the international committee on taxonomy of viruses / eds. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz. Oxford : Elsevier, 2011. P. 672–685.
5. Virus. Taxonomy: 2015 edition // URL : <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
6. The world organization for animal health (OIE). The Rift valley fever. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2015. Chapter 2.1.14 // URL : <http://www.OIE.int/manual-for-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrialanimals>.
7. The world organization for animal health (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccines 2014. The Rift valley fever. P. : OIE, 2014 // URL : http://www.oie.int/fileadmin/Home_/eng/Health_standards/tahm/2.01.14_RVF.pdf (as of January 3, 2015).
8. World of Chelate Organization. International health regulation in force (the last citation – January 15, 2012) // URL : http://www.who.int/en/section1_1417.Viper.
9. Dmitriev A. F. Intrauterine infection of offspring from productive animals / A. F. Dmitriev // Veterinary pathology. 2012. No. 2. P. 25–29.
10. Koncevaya N. N. Vaccines, COMBOVAC 2+L and COMBOVAC 4+L to create colostral immunity in young cattle. / N. N. Koncevaya, G. L. Soboлева, I. V. Nepoklonova // Veterinary Medicine. 2016. No. 5. P. 8–13.
11. On the results of the reference laboratory for cattle diseases of the FGBI «ARRIAH» for the 1st quarter of 2015 // News from the official site of the Rosselkhoz nadzor. URL : <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/13068.html>.
12. Simmonds P. Family Flaviviridae / P. Simmonds, P. Becher, M. S. Collett, et al. // Virus Taxonomy : ninth report of the international committee on taxonomy of viruses / eds. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz. Oxford : Elsevier, 2011. P. 1003–1020.
13. Zheng S. Genomic and evolutionary characterization of a novel influenza C-like virus from swine / S. Zheng, Z. Ran, D. Wang, A. Hoppe, et al. // Archives of Virology. 2014. No. 159. P. 249–255.
14. Wilson V. K. Diagnostic approach to fever of the rift / V. K. Wilson // Biology. 2013. No. 135. P. 73–80.
15. Ellis J. A. Bovine parainfluenza-3 virus / J. A. Ellis // Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 2010. V. 26. No. 3. P. 575–593.