

Информационные сообщения

BULLETIN OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 1991-3494

Volume 4, Number 374 (2018), 211 – 216

**K. O. Karamendin¹, A. I. Kydyrmanov¹, E. T. Kasymbekov¹,
K. D. Daulbayeva¹, M. H. Sayatov¹, Sasan Fereidouni²**

¹Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan,

²Conservation Medicine Research Institute of Wildlife Ecology
University of Veterinary Medicine Vienna, Austria.

E-mails: kobey.karamendin@gmail.com, kydyrmanov@yandex.kz, kasymbek.ermuxan@mail.ru,
daulbaevak@mail.ru, sayatov37@mail.ru, s.fereidouni@gmail.com.

APPLICATION OF MASSIVE PARALLEL SEQUENCING FOR THE INVESTIGATION OF WILD BIRDS VIRUSES

Abstract. Identification of viral pathogens is of great importance for the diagnostics of infectious diseases in humans and animals. Almost all outbreaks of dangerous infections in the last two decades have been caused by new viruses, most of which originated from a natural reservoir.

Experimental studies on avian paramyxovirus (APMV) of serotype 1 have shown that wild birds can spread and introduce mild or non-pathogenic virus variants into the poultry population, which, after several passages in the organism of susceptible birds, often acquire highly pathogenic properties.

Using the new technology of massive parallel sequencing, information on the genetic structure of wild bird viruses belonging to the *Paramyxoviridae* family was obtained. The high efficiency of the method is shown, which allows simultaneous sequencing of the complete genomes of viruses without prior knowledge of their belonging to any family. The data obtained will allow us to expand our knowledge of the course of the natural evolution of migratory bird viruses.

Keywords: Virus, Massive Parallel Sequencing, Wild Birds, Complete Genome of the Virus, RNA, DNA, Bioinformatic Analysis.

УДК 578.832.1:578.4
МРНТИ 34.25.00

**К. О. Карамендин, А. И. Кыдырманов, Е. Т. Касымбеков,
К. Д. Даулбаева, М. Х. Саятов, Sasan Fereidouni**

Институт микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан,
Conservation Medicine Research Institute of Wildlife Ecology
Венский Университет Ветеринарной Медицины, Австрия.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ВИРУСОВ ДИКИХ ПТИЦ

Аннотация. Идентификация вирусных патогенов имеет огромное значение для диагностики инфекционных заболеваний человека и животных. Почти все вспышки опасных инфекций последних двух десятилетий были вызваны новыми вирусами, большинство из которых происходили из природного резервуара.

Экспериментальные исследования на примере парамиксовируса (ПМВ) серотипа 1 показали, что дикие птицы способны распространять и заносить слабо- или непатогенные варианты в популяцию домашних птиц, которые через несколько пассажей в организме восприимчивых птиц зачастую приобретают высоко-патогенные свойства.

С использованием новой технологии массового параллельного секвенирования получены сведения о генетической структуре вирусов диких птиц, принадлежащим семейству парамиксовирусов. Показана высокая эффективность метода, который позволяет одновременно секвенировать полные геномы вирусов без предварительного знания об их принадлежности к какому-либо семейству.

Полученные данные позволяют расширить наши знания о ходе естественной эволюции вирусов перелетных птиц.

Ключевые слова: вирус, массовое параллельное секвенирование, дикие птицы, полный геном вируса, РНК, ДНК, биоинформационный анализ.

Введение. Исследования последних лет подтверждают приоритетную роль диких птиц как природного резервуара и источника генетического материала для возникновения новых эпизоотических вариантов вирусов.

Эколо-эпизоотологическая оценка состояния вирусных популяций у птиц важна для практической ветеринарии при расшифровке вспышек заболеваемости и контроле возникающих чрезвычайных эпидемических ситуаций. Поскольку Казахстан расположен в центре Евразийского континента и через его территорию проходят важные миграционные пути перелетных птиц, которые могут служить фактором заноса новых патогенных вариантов вирусов, изучение генетического разнообразия вирусов, циркулирующих в организме диких птиц является актуальной задачей.

До настоящего времени генетические исследования вирусов с секвенированием их генов проводились с использованием широко распространённого и хорошо зарекомендовавшего себя метода Сенгера. С развитием науки и технологий на арену вышли новые методы, которые постепенно становятся рутинными в научных лабораториях мира. Одним из таких новых методов является массовое параллельное секвенирование, именуемое также секвенированием нового (следующего) поколения (*next generation sequencing – NGS*), которое обеспечивает высокопроизводительный анализ огромных объемов данных о нуклеотидных последовательностях, содержащихся в исследуемом образце.

С целью изучения возможности применения данной технологии в расшифровке полного генома вирусов диких птиц исследованы выделенные на куриных эмбрионах неидентифицированные гемагглютинирующие агенты, без предварительного знания об их принадлежности к какому-либо семейству вирусов.

Материалы и методы. Биологические материалы в виде клоакальных и трахеальных смывов получены от диких птиц согласно требованиям Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ) [1]. Пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Изоляцию вирусов и восстановительные пассажи проводили путем инокуляции каждой пробы вируса в 9-10 дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) и последующей инкубацией их при температуре +36°C в течение 48 ч по сертифицированным методикам, рекомендованным ВОЗ [2].

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

Подготовка библиотек осуществлена с помощью набора NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, США). Комплементарные ДНК из РНК ПМВ синтезированы с использованием случайных гексамерных праймеров (*random hexamers*) методом обратной транскрипции. Массовое параллельное секвенирование – расшифровка последовательностей кДНК, осуществлена с использованием секвенатора нового поколения Illumina MiSeq (США).

Биоинформационный анализ полученных в результате секвенирования последовательностей проведен с использованием компьютерных программ UGENE 1.20 (Россия) [3] и Tablet (Великобритания) [4].

Выравнивание секвенированных последовательностей и филогенетический анализ с помощью метода максимального правдоподобия осуществлены в программе MEGA 6.0 [5].

Результаты. Проведен вирусологический скрининг в РКЭ биологических образцов из архивных материалов, собранных в разные годы в Западном, Юго-Восточном и Центральном Казахстане от диких птиц водного и околоводного комплексов, относящихся к семействам Утиные (Anatidae), Чайковые (Laridae), Бекасовые (Scolopacidae) и Ржанковые (Charadriidae) из отрядов Гулеобразные (Anseriformes) и Ржанкообразные (Charadriiformes). В результате первичного заражения пробами 10-дневных РКЭ выделены гемагглютинирующие агенты, из которых выделили РНК и измерили их концентрацию (таблица 1).

Таблица 1 – Первоначальные концентрации РНК изолятов вирусов птиц для секвенирования

Гемагглютинирующий агент	Концентрация, ng/μl
курица/Алматы/36/2015	100,0
малый баклан/Кызылколь/7074/2016	>8,0
деревенская ласточка/Кызылколь/7079/2016	>8,0
кряква/Коргалжын/6769/2015	>8,0
черноголовый хохотун/Атырау/6452/2015	18,0
белолобый гусь/СКО/5751/2013	>8,0
белолобый гусь/СКО/5759/2013	26,3
белолобый гусь/Коргалжын/1791/2006	9,2
озерная чайка/Балхаш/5844/2013	>8,0
черноголовый хохотун /Атырау/5541/2013	>8,0
чайка/Актау/5976/2014	>8,0
околоводная птица/Алаколь/6952/2016	23,2

Как видно из таблицы 1, концентрации РНК варьировали от 8,0 до 26,3 ng/μl, что, согласно рекомендации производителя набора для секвенирования, является достаточным для производства библиотек.

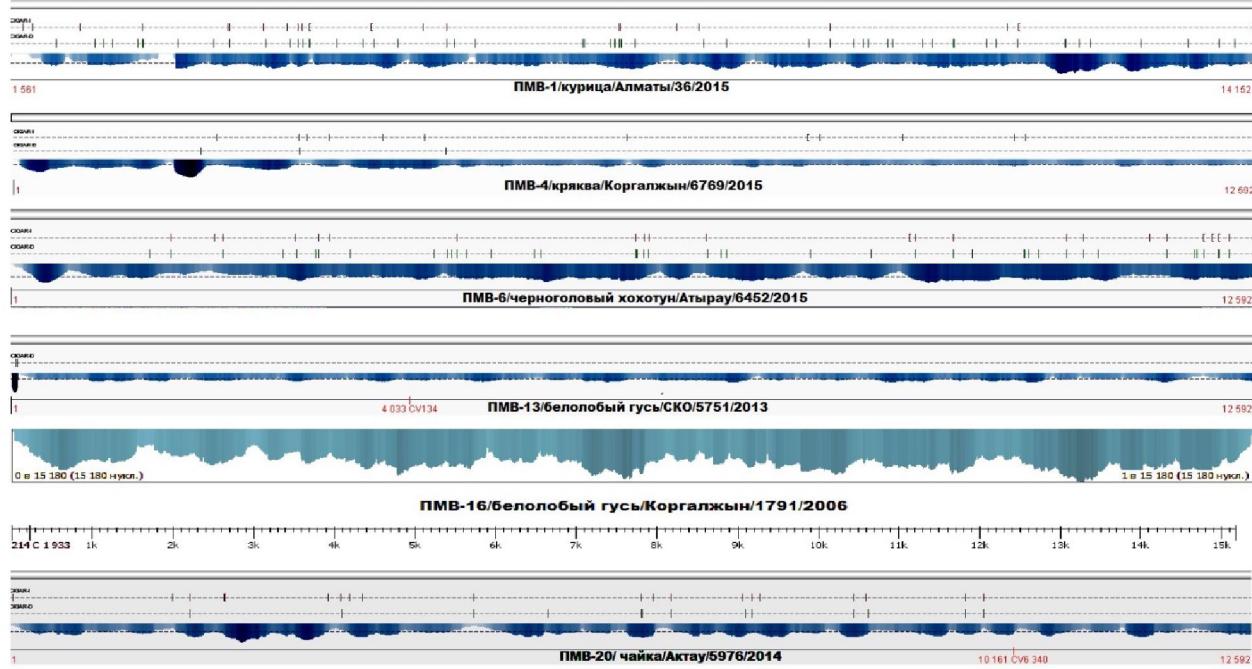
Далее, для дальнейшего секвенирования полных нуклеотидных последовательностей генов выделенных вирусов, удаляли цитоплазматические и митохондриальные рибосомальные РНК (рРНК) с использованием специфичных к ним олигонуклеотидов, в дополнение к используемому набору NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, США).

Проводили фрагментацию РНК до размеров около 300-400 п.о. с применением ферментативного метода при разных температурах, используя двухвалентные катионы в составе набора. Из расщепленных фрагментов РНК синтезировали первую цепь кДНК с использованием обратной транскриптазы и случайных праймеров, а затем вторую цепь с использованием ДНК-полимеразы I и РНКазы Н.

К полученным фрагментам кДНК затем присоединяли молекулу аденина и в последующем лигировали адаптеры. При подготовке библиотеки фрагментированных кДНК использовали адаптеры Illumina. Продукты очищали и амплифицировали в ПЦР для создания библиотеки. Качество приготовленных библиотек проверяли на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Секвенирование осуществлено на секвенаторе нового поколения Illumina MiSeq (США), с применением набор реагентов v.3.

Для биоинформационного анализа полученные последовательности были собраны и обработаны в программе UGENE 1.20 (Россия). В результате получены полногеномные последовательности исследованных вирусов (рисунок).

Из рисунка 1 видно, что покрытие генома вирусов было практически равномерным и варьировало от 4521 до 5500 ридов в разных регионах. Получены последовательности целых геномов вирусов, принадлежащим семейству парамиксовирусов серотипов ПМВ-1, ПМВ-4, ПМВ-6, ПМВ-13, ПМВ-16, ПМВ-20. Полные названия изолятов с идентифицированными серотипами представлены в таблице 2.



Вид в программах Tablet и UGENE 1.20 полных геномов секвенированных вирусов

Таблица 2 – Идентифицированные серотипы парамиксовирусов

Вирусы	Длина генома
PMB-1/курица/Алматы/36/2015	15097
PMB-4/малый баклан/Кызылколь/7074/2016	15054
PMB-4/деревенская ласточка/Кызылколь/7079/2016	15054
PMB-4/кряква/Коргалжын/6769/2015	15054
PMB-6/черноголовый хохотун/Атырау/6452/2015	16236
PMB-13/белолобый гусь/СКО/5751/2013	15996
PMB-13/белолобый гусь/СКО/5759/2013	15996
PMB-16/белолобый гусь/Коргалжын/1791/2006	15180
PMB-20/озерная чайка/Балхаш/5844/2013	15786
PMB-20/ черноголовый хохотун /Атырау/5541/2013	15786
PMB-20/ чайка/Актау/5976/2014	15786
PMB-20/ околоводная птица/Алаколь/6952/2016	15786

Обсуждение. Идентификация новых патогенов имеет огромное значение для диагностики инфекционных заболеваний человека и животных. Почти все вспышки опасных инфекций последних двух десятилетий были вызваны новыми патогенами, такими как вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) [6], хантавирус Sin Nombre [7], вирус пандемического гриппа 2009 года H1N1 [8], а также недавно описанный коронавирус EMC [9], большинство из которых происходит из природного резервуара.

Современные технологии позволяют идентифицировать вирусы с помощью широкого набора методов. Традиционные методы включают в себя электронную микроскопию, культивирование на клетках и живых организмах, а также серологические исследования [10], но все они имеют свои ограничения. Например, многие вирусы не культивируются в лабораторных условиях и могут быть охарактеризованы только молекулярными методами [11], такими как использование гибридизационных микрочипов [12] и ПЦР [13].

Конечным результатом большинства методов гибридизации и ПЦР являются амплифицированные продукты, которые требуют окончательной идентификации путем секвенирования. Ограничением же данных методов является необходимость знания последовательности нуклеотидов до начала исследования, что не всегда возможно.

Массовое параллельное секвенирование позволяет без предварительного знания о содержимом пробы, выявить все присутствующие в ней нуклеиновые кислоты разных организмов, что значительно расширяет возможности генетических исследований.

Возможно, наиболее очевидным применением этих технологий является секвенирование генома. Хотя вирусные геномы относительно небольшие, но их научная ценность часто чрезвычайно важна, и данная технология может представлять собой высокоеффективный способ расшифровки полной последовательности вирусного генома.

Данное исследование позволило с помощью метода массового параллельного секвенирования одновременно расшифровать полные геномы парамиксовирусов различных серотипов. Известно, что дикая орнитофауна играет ключевую роль в поддержании ПМВ в биосфере и является потенциальным природным источником возникновения новых опасных вариантов вирусов.

Экспериментальные исследования на примере парамиксовируса серотипа 1 (ПМВ-1) 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 [14]. По этой причине, непрерывное наблюдение за ПМВ в дикой природе является одной из важнейших задач при обеспечении безопасности птицеводства.

Полученные данные о полных геномах парамиксовирусов с использованием новых технологий позволяют расширить наши знания о ходе естественной эволюции вирусов перелетных птиц.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals OIE 2015. – Chapter 2.3.4. Avian influenza. – Sixth Edition. – ISBN 978-92-9044-718-4.
- [2] World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. 20025. Rev1.
- [3] Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. – 2012 28: 1166-1167. – DOI:10.1093/bioinformatics/bts091.
- [4] Milne I., Stephen G., Bayer M., Cock P.J.A., Pritchard L., Cardle L., Shaw P.D., Marshall D. 2013. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data // Briefings in Bioinformatics 14(2), 193-202. – DOI: 10.1093/bib/bbs012.
- [5] Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Molecular Biology and Evolution. – 2013; 30: 2725±2729. – DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- [6] Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S., Nix W.A., Campagnoli R., Icenogle J.P., Penaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M.H. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome // Science. – 2003, 300:1394-1399. – DOI: 10.1126/science.1085952.
- [7] Nichol S.T., Spiropoulou C.F., Morzunov S., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Feldmann H., Sanchez A., Childs J., Zaki S., Peters C.J. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness // Science. – 1993, 262:914-917. – DOI: 10.1126/science.8235615.
- [8] Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L.V., Xu X., Bridges C.B., Uyeki T.M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans // N Engl J Med. 2009, 360:2605-2615. – DOI: 10.1056/NEJMoa0903810.
- [9] Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia // N Engl J Med 2012, 367:1814-1820. – DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
- [10] Storch G.A., 2007. Diagnostic virology. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.) // Fields Virology. – Vol. 1. Lippincott, Williams & Wilkins. – P. 565-604. – ISBN 978-0-7817-6060-7.
- [11] Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiological Reviews. 59, 143-169. – PMID: 7535888.
- [12] Wang D., Coscoy L., Zylberman M., Avila P.C., Boushey H.A., Ganem D., DeRisi J.L., 2002. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens // Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). – 99, 15687-15692. – DOI: 10.1073/pnas.242579699.
- [13] Mullis K., Falloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 1986; 51 Pt 1:263-73. DOI:10.1101/SQB.1986.051.01.032.
- [14] Shengqing Y., Kishida N., Ito H., Kida H., Otsuki K., Kawaoka Y. and Ito T. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens // Virology. – 2002. – N 301. – P. 206-211. DOI:10.1006/viro.2002.1539.

**К. О. Қарамендин¹, А. И. Қыдырманов¹, Е. Т. Қасымбеков¹,
К. Д. Даулбаева¹, М. Х. Саятов¹, Sasan Fereidouni²**

¹Микробиология және вирусология институты, Алматы, Қазақстан,

²Conservation Medicine Research Institute of Wildlife Ecology

Венский Университет Ветеринарной Медицины, Австрия

ТҮЗ ҚҰСТАРЫНЫҢ ВИРУСТАРЫН ЗЕРТТЕУДЕ ЖАППАЙ БІР МЕЗГІЛДЕ СЕКВЕНДЕУ ӘДІСІН ҚОЛДАНУ

Аннотация. Вирустық патогендерді идентификациялаудың адам мен жануарлардың инфекциялық ауыруларын балаудағы маңызы зор. Соңғы екі онжылдықтағы қауіпті инфекциялардың барлығын дерлік жаңа вирустар шақырды. Олардың басым бөлігі табиги резервуарларда туындағы.

Серотүрі 1 парамиксовирусы (ПМВ) негізінде сынақтық зерттеулер, түз құстарының үй құстары арасына вирустардың әлсіз немесе зардапсыз нұскаларын енгізуге және таратуға қабілетті екенін, олардың жиі жағдайда бірнеше пассаждан кейін бейім құстардың ағзасында зардаптылығы жоғары қасиетке ие болатынын көрсетті.

Жаңа, жаппай бір мезгілде секвендеу технологиясын қолдану нәтижесінде парамиксовирустар тұystастығына жататын түз құстары вирустарының генетикалық құрылымдары жайында мәліметтер алынды. Бір уақытта вирустардың кай тұystастық өкілі екенін алдын-ала білмей ақ, олардың толық геномын секвендеуге мүмкіндік беретін аса тиімді әдіс екені анықталды.

Алғынған мәліметтер жыл құстары вирустарының табиги эволюциясы барысы жайында біздің білімімізді нығайтады.

Түйін сөздер: вирус, жаппай бір мезгілде секвендеу, жабайы құс, вирустың толық геномы, РНҚ, ДНҚ, биоинформатикалық талдау.

Сведения об авторах:

Карамендин К.О. – канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии вирусов, Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, kobey.karamendin@gmail.com.

Қыдырманов А.И. – докт. вет. наук, заведующий лабораторией экологии вирусов, Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, kydyrmanov@yandex.kz

Қасымбеков Е.Т. – PhD студент, научный сотрудник лаборатории экологии вирусов, Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, kasymbek.ermuxan@mail.ru

Даулбаева К.Д. – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии вирусов, Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, daulbaevak@mail.ru

Саятов М.Х. – докт. биол. наук, профессор, академик НАН РК, главный научный сотрудник лаборатории экологии вирусов, Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, sayatov37@mail.ru

Dr. Sasan Fereidouni. – Conservation Medicine Research Institute of Wildlife Ecology, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria.