

Морбилливирус, вызвавший эпизоотию в 1987 г., продолжает циркулировать в популяции байкальской нерпы

С. И. БЕЛИКОВ, Т. В. БУТИНА, Н. Н. ДЕНИКИНА, Л. В. МАМАЕВ, Е. А. ПЕТРОВ

*Лимнологический институт СО РАН
664033 Иркутск, п/я 4199

АННОТАЦИЯ

Методами ПЦР исследовано наличие морбилливируса CDV в популяции байкальской нерпы в 1995–1996 гг. Показано, что с 1992 г. количество вирусоносителей выросло в 6 раз и зарегистрировано у 40 % обследованных животных. Определена первичная структура участка варибельного гена фосфобелка и показано, что она соответствует структуре гена, определенной в 1992 г.

В течение 1987–1988 гг. на Байкале зарегистрирована массовая гибель байкальских тюленей (*Phoca sibirica*), причем во время эпизоотии погибло до 6,5 тыс. животных из общего количества 70 тыс. [1,2]. Заболевание сопровождалось симптомами, характерными для морбилливирусных инфекций, и, хотя ранее чума плотоядных (CDV) у сибирских тюленей не регистрировалась, к январю 1988 г. с помощью различных серологических исследований и гибридационного анализа были получены убедительные доказательства того, что болезнь вызвана морбилливирусом, близким вирусу чумы плотоядных (CDV) – собачьей "чумке" [1, 3].

Весной 1988 г. началась массовая гибель серых (*Halichoerus grypus*) и обыкновенных (*Phoca vitulina*) тюленей в Балтийском и Северном морях. Причиной болезни европейских ластоногих также оказался вирус, близкий вирусу чумы плотоядных [4]. Примерно в это же

время морбилливирусные инфекции были обнаружены у других морских животных семейства китообразных: морских свиней (*Phocoena phocoena*) и дельфинов (*Stenella coeruleoalba*) Средиземного моря [5, 6].

Вирус чумы плотоядных относится к морбилливирусам, которые представляют собой антигенно связанную группу внутри семейства Парамиксовирусов [7]. Кроме вируса чумы плотоядных группа включает также вирус кори, инфицирующий человека и других приматов, вирус чумы крупного рогатого скота, вирус чумы мелких жвачных и недавно описанные морбилливирусы морских млекопитающих: вирусы дельфинов и морских свиней и вирус европейских тюленей. Геном морбилливируса представлен линейной молекулой негативной РНК, последовательно кодирующей шесть структурных белков: N – белок нуклеокапсида, Р – фосфопротеин, М – матриксный белок, F – белок слияния, Н – гемагглютинин

и L – большой белок полимеразы. В структуре гена Р-белка имеются еще две независимые рамки считывания, кодирующие два неструктурных белка С и V [7]. Несмотря на то что ген фосфопротеина является одним из наиболее вариабельных, наличие двух дополнительных независимых рамок считывания внутри гена Р обуславливает исключительную консервативность ряда коротких фрагментов гена. Это обстоятельство позволило нам выбрать на основе сравнения известных последовательностей гена Р вирусов кори и CDV (штамм *Onderstepoort*) [8, 9] полностью совпадающие участки длиной более 20 нуклеотидов и синтезировать олигонуклеотидные праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10]. Таким образом была разработана универсальная система ПЦР, позволяющая быстро и с минимальными затратами идентифицировать любую морбилливирусную инфекцию. Методика хорошо себя зарекомендовала в дальнейшем при анализе вирусов собаки, хорька, вакцинного штамма *Rockborn*, а также морбилливирусов от других морских животных [11–14].

Нами продолжают наблюдения за циркуляцией вируса в популяции нерпы. В 1989 и 1992 гг. были проведены массовые серологические исследования сывороток и ПЦР-анализ образцов тканей мозга животных [15]. Последний массовый сбор материала произведен весной 1995 г. Результатам ПЦР-анализа этих образцов тканей мозга байкальской нерпы посвящена предлагаемая работа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Во время ежегодного планового отстрела байкальской нерпы весной 1995 г. собраны образцы головного мозга 35 животных различных возрастных групп. Зимой 1996 г. на берегу оз. Байкал обнаружены погибшие животные, от двух из которых также были отобраны образцы мозга. Полученный материал в дальнейшем использован для обнаружения вирусоспецифических РНК в тканях этих животных методом ПЦР для быстрой идентификации морбилливирусных инфекций [10].

Выделение суммарной РНК из любых тканей животных проводили с использованием кислотоизотиоцианата гуанидина по методу [16].

Синтез кДНК-копий фрагмента гена Р проводили, используя в качестве затравки смесь гексануклеотидов (Random-праймеры, Promega) в общем объеме 20 мкл.

Полимеразную цепную реакцию проводили с универсальными морбилливирусными олигонуклеотидными праймерами, амплифицирующими фрагмент ДНК размером 429 пар нуклеотидов, соответствующий району гена белка фосфопротеина (позиции с 391 по 819) морбилливирусов в 50 мкл, содержащих 5 мкл кДНК. Амплифицированные фрагменты анализировали электрофорезом в 1 % агарозе.

Продукты амплификации ДНК, полученные из образцов мозга двух нерп в 1996 г., очищены в легкоплавкой агарозе, а затем секвенированы методом прямого секвенирования ПЦР-продукта с мечеными праймерами с использованием набора для секвенирования фирмы Promega (fmol DNA Cycle Sequencing System) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ПЦР-анализа РНК, выделенных из тканей головного мозга нерп, отобранных во время планового весеннего отстрела 1995 г., приведены в таблице. Условия отстрела позволяют считать представленную выборку случайной. В качестве положительного контроля на наличие вирусоспецифического генетического материала использовалась РНК, выделенная от больной нерпы в 1992 г. [15].

Из полученных данных видно, что вирус по-прежнему циркулирует в популяции байкальской нерпы, возраст и пол животных не влияет на вероятность заражения. Следует отметить, что количество зараженных животных существенно выше (14 проб из 35 исследованных в эксперименте, т. е. 40 %) по сравнению с результатами исследования 1992 г. (3 пробы из 45, т. е. 6,6 %) [15].

По результатам исследования 1992 г. сделано предварительное заключение о достаточной защищенности популяции байкальской нерпы, так как малое количество зараженных животных препятствует передаче вируса от одного животного другому [13]. Однако полученные нами последние данные свидетельствуют о том, что количество животных, содержащих вирус,

Результаты ПЦР-анализа на наличие вирусоспецифичной РНК в образцах тканей головного мозга байкальской нерпы, отобранных в 1995 г.

Номер животного	Пол	Возраст	ПЦР-анализ
3	F	20	-
4	F	1	-
5	F	13	-
11	M	12	+
12	F	3	-
14	F	9	-
15	M	1	+
16	F	Не опр.	-
17	F	18	-
20	M	2	+
23	F	22	+
24	F	34	+
26	F	19	+
27	F	13	+
28	F	26	-
29	F	Не опр.	-
30	M	20	-
33	M	Не опр.	-
36	F	»	-
41	F	6	-
42	M	4	-
45	F	1	-
49	M	Не опр.	-
60	M	»	-
63	M	10	+
64	M	2	+
70	F	23	-
74	M	4	-
78	F	7	+
90	M	10	-
91	F	14	+
92	F	11	-
93	F	11	+
96	M	13	+
97	M	10	+
J-18 (1992)	F	1	+

Примечание: M – самец, F – самка

растет, хотя массовой гибели не наблюдается. Одна из причин этого несоответствия могла быть вызвана мутацией вируса или появлением нового варианта CDV, иммунитет к которому у животных отсутствует, что и приводит к увеличению зараженности нерпы.

Чтобы проверить эту гипотезу, были взяты образцы тканей головного мозга у двух процен-

тов животных, павших в декабре 1996 г., и определена первичная структура фрагмента гена Р. Сравнение полученных последовательностей с аналогичной последовательностью штамма CDV [10], выделенного от байкальской нерпы сразу после вспышки болезни в 1988 г., показало, что вирусы идентичны и мутации вируса или повторного заражения новым штаммом не произошло.

Заметный рост количества носителей вируса без значительного увеличения смертности, по-видимому, объясняется наличием устойчивого иммунитета у подавляющего большинства животных, что обуславливает протекание заболевания в облегченной форме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование циркуляции CDV в популяции байкальской нерпы с помощью одного из популярнейших в настоящее время методов молекулярной диагностики – ПЦР позволяет сделать следующие заключения:

1. В популяции байкальской нерпы присутствует вирус CDV.
2. За три года с 1992 по 1995 г. количество животных, зараженных этим вирусом, существенно возросло.
3. В популяции байкальской нерпы циркулирует только штамм вируса CDV, вызвавший эпизоотию в 1987–1988 гг., и повторного заражения животных новым штаммом не произошло.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. D. M. E. Osterhaus, *Nature*, 1988, 334, 301–302.
2. А. М. Бейм, Е. И. Грошева, Б. К. Павлов и др., Диагностическое исследование заболевания байкальской нерпы (отчет по хоз. договору с Лимнол. ин-том СО АН СССР), Байкальск, 1988, 42.
3. Н. М. Пронин, Д. Е. Кабанов, Вспышка чумы плотоядных у байкальской нерпы, Новосибирск., Наука, Сиб. отд-ние, 1992, 12–20.
4. М. А. Grachev, V. P. Kumarev, L. V. Mamaev et al., *Nature*, 1989, 338, 209.
5. S. Kennedy, J. A. Smyth, P. F. Cush et al., *Ibid.*, 1988, 336, 21.
6. M. Domingo, L. Ferrer, M. Pumarola et al., *Ibid.*, 1990, 348, 21.
7. T. Barrett, S. Subbarao, G. J. Belsham et al., *The Paramyxoviruses*, New York, Plenum Press, 1991, 83–102.
8. W. J. Bellini, G. Englund, S. Rosenblatt et al., *J. Virol.*, 1985, 53, 908–919.
9. T. Barrett, S. B. Shimplon, S. E. H. Russell, *Virus Research*, 1985, 3, 367–372

10. Л. В. Мамаев, С. И. Беликов, Н. Н. Деникина, Вспышка чумы плотоядных у байкальской нерпы, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1992, 62–65.
11. T. C. Harder, M. Kenter, M. J. G. Appel et al., *Vaccine*, 1995, 13, 521–523.
12. T. Barrett., I. K. G. Visser, L. V. Mamaev et al., *Virology*, 1993, 193, 1010–1012.
13. L. V. Mamaev, I. K. G. Visser, S. I. Belikov et al., *The Vet. Record*, 1996, 4, 437–439.
14. T. Barrett, M. Blixenkron-Moller, G. Di Guardo et al., *Vet. Microbiol.*, 1995, 44, 261–265.
15. L. V. Mamaev, N. N. Denikina, S. I. Belikov et al., *Ibid.*, 1995, 44, 251–259.
16. P. Chomczynski, N. Sacci, *Analytical Biochemistry*, 1987, 162, 156.

Morbilli-virus That Caused an Epizooty in 1987 Continues Circulating in the Baikal Seal Population

S. I. BELIKOV, T. V. BUTINA, N. N. DENIKINA, L. V. MAMAEV, E. A. PETROV

The presence of Morbilli-virus CDV in the Baikal seal population in 1995–1996 was studied by PCR technique. It is demonstrated that since 1992 the number of virus carriers has increased 6-fold and the presence of the virus is recorded in 40 % of the animals examined. The primary structure of the site of variable phosphoprotein gene is studied, and it is shown to correspond to the gene structure determined in 1992.