

Молекулярно-генетический анализ штамма «Winterfield 2512» вируса инфекционной бурсальной болезни птиц

Соколов В.В. Норкина С.Н. – ОО «НПП «АВИВАК».

Южаков А.Г. Алипер Т.И. – ФГУ «НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского»

Ключевые слова: болезнь Гамборо; «Winterfield 2512»; белок VP2.

Summary

Infectious bursal disease (IBD) is caused by a virus that is a member of the genus Avibirnavirus of the family Birnaviridae. Although turkeys, ducks, guinea fowl and ostriches may be infected, clinical disease occurs solely in chickens. Molecular virological techniques have been developed that allow IBDV to be identified more quickly than by virus isolation[6]. The most frequently used molecular method is the detection of IBDV genome by the reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)[8].

Введение

Инфекционная бурсальная болезнь (инфекционный бурсит, болезнь Гамборо) – широко распространенное высококонтагиозное заболевание, поражающее цыплят 2-15 недельного возраста, возбудителем которого является вирус, принадлежащий к роду *Avibirnavirus* семейства *Birnaviridae* [1].

На основании обобщенных данных установлено, что вирионы бирнавирусов содержат пять белков: VP1, который является РНК-зависимой РНК-полимеразой и взаимодействует с сегментами генома[2]. О белке VPX известно, что он является предшественником белка VP2. Основными структурными компонентами вирусного капсида являются VP2 и VP3. Белок VP2 содержит эпитопы для вируснейтрализующих антител. Наличие в VP2 конформационно-зависимого эпитопа, индуцирующего синтез вируснейтрализующих антител, позволяет предположить, что VP2 экспонирован на поверхности вириона[3,4]. Структурный белок VP3 несет группоспецифические антигены. Белок VP4 является вирусной протеазой. Кроме того, в вирионах присутствует положительно заряженный минорный полипептид VP5 с неизвестной функцией[5].

Анализ белкового состава показал, что 51 % вирусного белка приходится на VP2, 40 % - на VP3, 6 % на VP4, 3% - на VP1[6].

С появлением в птицеводческих хозяйствах высоковирулентных штаммов вируса ИББ, которые вызывали болезнь у птиц даже при наличии материнского иммунитета против классических штаммов, возникли дополнительные трудности в профилактике болезни Гамборо.

Антигенные различия между штаммами вируса ИББ связывали с появлением изменений в аминокислотной последовательности белка VP2 различных штаммов вируса[2,4]. Было установлено, что структурный белок VP2 имеет в центральной части гипервариабельную область, в которой локализован эпитоп, узнаваемый моноклональными антителами, являющийся конформационным. Высоковирулентные штаммы имели аминокислотные замены в вариабельной области гена VP2, что отражалось на антигенных свойствах. Это привело, в свою очередь,

привело к тому, что ранее созданные вакцинные штаммы не обладали достаточными протективными свойствами против новых высоковирулентных штаммов[7].

Цель исследования

Целью данной работы является молекулярно-генетический анализ штамма «Winterfield 2512», используемого для изготовления вакцины «АВИВАК ИББ-АН» и сравнение его с различными классическими и высоковирулентными штаммами вируса инфекционной бурсальной болезни.

Материалы и методы

Для выделения РНК вируса ИББ использовали лиофилизированную вакцину «АВИВАК ИББ-АН», произведенную из штамма «Winterfield 2512» .

Генетический анализ исследуемого штамма проводили методом ПЦР, с использованием тест-системы производства ООО «Ветбиохим» в соответствии с инструкцией по применению.

Теоретический расчёт вирусспецифических олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих переменную область гена VP2, был произведён в результате анализа нуклеотидных последовательностей геномного сегмента А (либо участка сегмента А, кодирующего белок VP2) вируса ИББ, опубликованных в GenBank (NCBI). С целью достижения максимальной чувствительности и специфичности метода были подобраны две пары праймеров для проведения ПЦР. Структура праймеров приведена в таблице 1.

Таблица 1

| Праймер | Последовательность | Длина | Позиция в геноме ИББ |
|---------|-----------------------------|-------|-------------------------|
| PR1 | 5'-GTATCTGAGGCTTGGTGATCC-3' | 21 | 659-679н. |
| PR2 | 5'-GTGACAGGCCAGAGTCCAC-3' | 20 | 730-749н. |
| PR3 | 5'-GATCCTCTTGCCACTCTTTC-3' | 20 | 1194-1213н. |
| PR4 | 5'-CATGGCTCCTGGCTCAAATCG-3' | 21 | 1295-1315н. |

Для проведения филогенетического анализа и генотипирования исследуемого образца были использованы штаммы из базы данных GenBank. Нуклеотидные последовательности участков генов VP2, этих штаммов были использованы в качестве эталонных при построении филогенетического дерева.

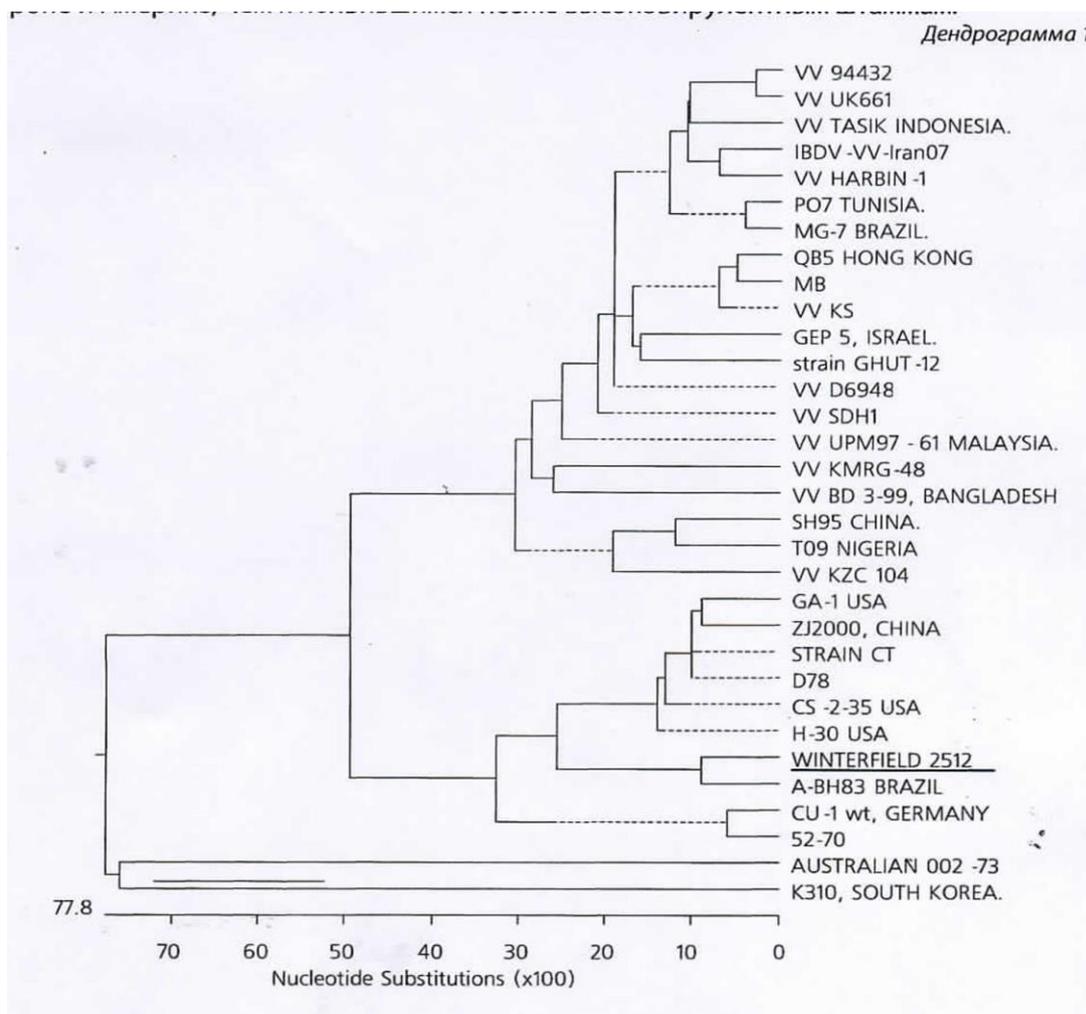
Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР.

Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера при помощи секвенирования ПЦР-продукта с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя. Электрофорез ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ BioEdit (version 7.0.0.) и программы SeqMan из пакета программLasergene (version 7.1.0.).

Филогенетическое дерево было построено при помощи программы MegAlign из пакета программ Lasergene (version 7.1.0.), для определения степени филогенетического родства был выбран метод «ближайшего соседа». Результаты исследования приведены в дендрограмме 1.

Дендрограмма 1



Результаты и обсуждения

Максимальную степень отличия от всех представленных штаммов имеют австралийский штамм «AUSTRALIAN 002-73» и южно-корейский «K310, SOUTH KOREA». Обособленность данных штаммов, вероятно, может объясняться их географической изоляцией и относительно давним сроком выделения. Остальные штаммы делятся на две большие подгруппы. Исследуемый штамм «Winterfield 2512» является близкородственным южноамериканскому классическому штамму «A-BH83 BRAZIL», и североамериканским «H-30 USA» и «CS-2-35 USA». Также в эту подгруппу попали такие классические штаммы, как «CU-1 wt, GERMANY», «52-70» и «D 78». Во второй подгруппе представлены все высоковирулентные штаммы, помеченные буквами «VV», а так же

некоторые классические штаммы, выделенные в Китае, Малайзии и Индонезии. Аналогичные данные были получены Tsuyoshi Yamaguchi[8] и Lana D.P.[7], что позволяет нам сделать вывод о том, что вакцинный штамм «Winterfield 2512» генетически ближе к классическим штаммам вируса ИББ, выделенным при появлении заболевания в Европе и Америке, чем к появившимся позже высоковирулентным штаммам.

Библиография

1. Brown F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984// Intervirology. – 1986.
2. Dobos P., Hill B.J., Hallet R., Kells D.T.C., Becht H., Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes.
3. Becht H., Muller H., Muller H.K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotype of infectious bursal disease virus.
4. MacReadie I.G., Vaughan P.R., Chapman A.J. et al. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast// Vaccine. – 1990.
5. Calvert J.G., Nagy E., Soler M., Dobos P. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus// J. gen. Virol. – 1991.
6. Kibenge F. S.B., Dhillon A.S., Russell R.G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus// J. gen. Virol. – 1988.
7. Lana D.P., Beisel C.E., Silva R.F. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus// Virus Gen. – 1992.
8. Tsuyoshi Yamaguchi et al. Nucleotide Sequence Analysis of VP2 Hypervariable Domain of Infectious Bursal Disease Virus Detected in Japan from 1993 to 2004// Avian Pathology 2007