

acid tests to diagnose Aleutian mink disease virus // J. Virtanen, K. Aaltonen, O. Vapalahti, T. Sironen // Journal of Virological Methods. – 2019. - Vol. 279. - P. 113776.

8. Development of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Aleutian mink disease virus // T. Lu, Y. Wang, Y. Wu [et al] // Arch Virol. – 2021. – Vol. 166(1). – P. 83-90.

9. Development of an EvaGreen-based real-time PCR assay for detection of Aleutian mink disease virus // L. Lia, Z. Hub, J. Sun [et al] // Journal of Virological Methods. – 2020. – Vol. 275. – P. 113751.

10. Farid A.H. Detection of Aleutian mink disease virus DNA and antiviral antibodies in American mink (*Neovison vison*) 10 days post-inoculation / A.H. Farid, I. Hussain, I. Arju // J. Vet Diagn. Invest. -2015. – Vol. 27(3). – P. 287-94.

УДК 619:616.98:616.476:578.2:616-032.22

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.1.36

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА VP2 ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ШТАММА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ И СРАВНЕНИЕ ЕЁ С КЛАССИЧЕСКИМИ И ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫМИ ШТАММАМИ

Веретенников В.В.- асс. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана, Румянцев А.М. канд. биол. н (ФГБОУ ВО СПбГУ), Джавадов Э.Д. -д.в.н. проф. кафедры эпизоотологии им В.П. Урбана, Тарлавин Н.В.- асс. каф. эпизоотологии им В.П. Урбана (ФГБОУ ВО СПбГУВМ), Веретенников М.В. - студент 3 курса (ФГБОУ ВО МГУ)

Ключевые слова: Инфекционная бурсальная болезнь, классические штаммы, VP2, дендрограмма. **Key words:** Infectious bursal disease, classical strains, VP2, dendrogram.



РЕФЕРАТ

Вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ) является возбудителем тяжелой иммуносупрессивной болезни молодняка птиц. Хотя впервые эта болезнь была обнаружена более 60 лет назад, она продолжает представлять значительную угрозу для птицеводства во всем мире [4]. Возбудителем является РНК-содержащий вирус, который принадлежит к роду *Avibirnavirus* семейства *Birnaviridae* [17].

В состав вириона входит пять вирусных белков, обозначенных как VP1, VP2, VP3, VP4 и VP5 [15] приблизительной молекулярной массой 97 кДа, 41 кДа, 32кДа, 28кДа и 21кДа, соответственно. Также отмечают и дополнительные белки, такие как VPX или pVP2 [12].

Капсидный белок VP2 уже давно остается в центре внимания разработки рекомбинантных субъединичных вакцин, поскольку отвечает за вызов защитного иммунного ответа против ИББ. Но сообщения многих авторов [2,3,6] указывают на антигенную неоднородность штаммов вируса ИББ, выделенных в России и других странах, с чем связывают неудачи применения существующих вакцин при профилактике заболевания, поэтому для создания и успешного применения рекомбинантных вакцин нужно изучать и эпизоотические штаммы, выделенные на территории Российской Федерации.

Поэтому целью данной работы было провести генетический анализ гена VP2 эпизоот-

тического штамма «Синявинский» и сравнить его с классическими штаммами вируса ИББ серотипа 1 и 2, выделенными на территории Европы и высоковирулентными штаммами, выделенными на территории Российской Федерации

ВВЕДЕНИЕ.

На протяжении длительного времени инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) вызывает большие экономические потери в птицеводческой отрасли, особенно в последние десятилетия. Инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) – это высококонтагиозная болезнь домашней птицы, вызываемая РНК-содержащим вирусом, который принадлежит к роду *Avibirnavirus* семейства *Birnaviridae* [17]. Вирус инфекционной бурсальной болезни (ВИББ) разрушает развивающиеся В-лимфоциты в бурсе Фабрициуса, основного органа гуморального иммунитета у птиц. Разрушение бursы Фабрициуса приводит к иммуносупрессии и оказывает заметное экономическое воздействие на производство из-за повышенной восприимчивости к вторичным бактериальным инфекциям и низким титров антител после вакцинации против других инфекционных болезней птиц [18].

До 90-х годов прошлого столетия болезнь достаточно хорошо контролировалась с помощью вакцинации, но позже были отмечены многочисленные случаи вспышек в разных частях мира. В США новые изоляты подверглись антигенному дрейфу, против которого классические вакцины против ИББ не были способны дать достаточный уровень перекрестной защиты [10]. Более того, острые вспышки ИББ со смертностью до 30%-60% в стадах бройлеров стали часто регистрироваться как в Европе [9], так и в Российской Федерации [5]. Такие серьезные вспышки были связаны с заметным увеличением патогенности некоторых штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни, известных как "высоковирулентные".

Адекватная борьба с ИББ возможна только путем вакцинации, поскольку ИББ является высококонтагиозным заболеванием, а ВИББ является очень устойчивым и может сохраняться в птичниках даже после тщательной очистки и дезинфек-

ции.

В последние годы были достигнуты успехи в разработке новых стратегий вакцинации против ИББ. Было предпринято много попыток экспрессировать структурный белок VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни в качестве субъединичных вакцин в различных гетерологических системах, включая кишечную палочку [7], дрожжи [4,19], вирус вакцины [16], рекомбинантный NDV-вектор [11], рекомбинантный бакуловирус [14], и ДНК-вакцину [13]. Во всех случаях рекомбинантный белок VP2 обеспечивал защиту иммунизированных цыплят против вируса ИББ.

Сообщения многих авторов [2,3,6] указывают на антигенную неоднородность штаммов вируса ИББ, выделенных в России и других странах, с чем связывают неудачи применения существующих вакцин при профилактике заболевания, поэтому для создания и успешного применения рекомбинантных вакцин нужно изучать и эпизоотические штаммы, выделенные на территории Российской Федерации.

В настоящем исследовании приведён генетический анализ последовательности гена белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «Синявинский», который антигенно родственен эталонному штамму «52/70» и сравнение его с последовательностями классических и высоковирулентных штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В качестве источника гена оболочечного гликопротеина VP2 использовали эпизоотические штаммы инфекционной бурсальной болезни «Синявинский», полученный в компании ООО «Кронвет».

Вирусный материал получен после расщепления на развивающихся СПФ эмбрионах кур (Specific Pathogen Free) и приготовлен в виде осветленного гомогената (20 %) инфицированных эмбриональных тканей на изотоническом фосфатном буфере (рН 7,2-7,6).

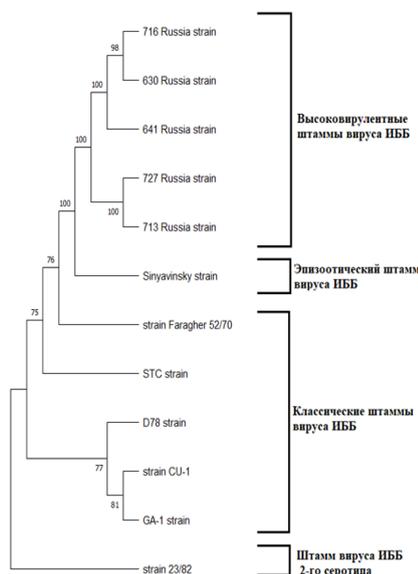


Рисунок 1. Дендрограмма изученных штаммов инфекционной бурсальной болезни, построенная методом «Neighbor-Joining» с использованием программы MEGA 11.

Тотальную РНК выделяли из образцов с использованием набора для выделения РНК GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя.

Для клонирования последовательности гена оболочечного гликопротеина VP2 был использован вектор рAL2-T от фирмы Евроген.

Нуклеотидная последовательность гена белка VP2 была получена при помощи полуавтоматического секвенирования по Сэнгеру с использованием прибора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Выравнивание нашей и эталонных последовательностей было выполнено с помощью программы ClustalW, программы множественного выравнивания последовательностей. Филогенетические деревья были сгенерированы с использованием программы MEGA 11 методом «Neighbor-Joining».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Последовательность гена оболочечного гликопротеина VP2 была получена в ходе обратной транскрипции (ОТ) и последующей амплификации методом поли-

меразной цепной реакции (ПЦР). Обратная транскрипция проводилась с использованием набора «RevertAid™ First Strand cDNA» (Fermentas) по методике производителя. При этом использовали геноспецифичный обратный праймер (VP2-R). Полученная кДНК служила матрицей для проведения ПЦР. При этом использовали набор «Encyclo Plus PCR kit» (Евроген, Россия) с применением следующих праймеров:

VP2- EcoRI -F 5'-
AgaattcATGACAAACCTGCAAGATCA-3'
VP2- XbaI-R 5'- Atcta-
gaAATGCTCCTGCAATCTTCAG -3'

Использовали следующие параметры ПЦР: 95°C – 3 минуты, а затем 30 циклов: 95°C - 30 с, 53°C - 30 с, 72°C - 90 с. ПЦР-продукт, кодирующий ген оболочечного гликопротеина VP2, был очищен методом выделения из агарозного геля с помощью набора «Evrogen Cleanup standart kit» (Евроген, Россия).

Полученный фрагмент гена VP2 встраивали в плазмиду рAL2-T (Евроген).

Клонирование последовательности гена VP2 в плазмиду рAL2-T позволило

эффективно проанализировать его нуклеотидную последовательность. Для этого мы использовали Сэнгеровское секвенирование с праймерами M13, места посадки которых находятся в составе плазмиды.

M13 Forward: 5'-GTTGTAACGACGGCCAGTG-3'
M13 Reverse: 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'

Нуклеотидную последовательность гена белка VP2 штамма «Синявинский» инфекционной бурсальной болезни сравнивали с последовательностями эталонных и высоковирулентных штаммов. Для этого из международных баз данных (GenBank) брали последовательности таких штаммов как: F52/70 ((United Kingdom; HG974565), D78 (Netherlands; AF499929), Cu-1 (Germany; X16107), Ga-1 (USA; EF418034), 23/82 (Germany; AF362773), STC (D00499), 641_Russia (Russia; MF142556), 716_Russia (Russia; MF142563), 630_Russia (Russia; MF142554), 727_Russia (Russia; MF142565), 713_Russia (Russia; MF142562).

Дендрограмму строили на основе гомологии нуклеотидных последовательностей гена VP2 эпизоотического штамма, эталонных (классических) и высоковирулентных. Из данных дендрограммы (рис. 1) можно увидеть, что исследуемый штамм «Синявинский» является близкородственным к высоковирулентным штаммам, выделенных на территории Российской Федерации и штамму 52/70, который выделен у больных цыплят в Англии и описан A.S. Vygrave и J.T. Faragher в 1970 г [8], что подтверждает данные Алиевой А. К. [1] о антигенной идентичности этих штаммов. Максимальную степень отличия от всех представленных штаммов имеют штаммы Cu-1, Ga-1, D78, STC. Обособленность данных штаммов, вероятно, может объясняться их относительно давним сроком выделения и использование этих штаммов в производстве вакцин, которые редко применялись на территории Российской Федерации. Также понятна высокая степень отличия штамма «Синявинский» от штамма 23/82,

ведь он относится к 2-му серотипу вируса инфекционной бурсальной болезни.

Похожие данные были получены Щербаковой Л.О. [5], что позволяет нам сделать вывод о том, что эпизоотический штамм «Синявинский» генетически ближе к высоковирулентным штаммам и классическому штамму «52/70» вируса ИББ, выделенным при появлении болезни в Европе, чем к другим классическим штаммам.

ВЫВОДЫ.

В результате проведенного опыта установлено, что эпизоотический штамм «Синявинский» более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ, чем к другим классическим штаммам Cu-1, Ga-1, D78, STC и 23/82. Многие авторы указывали на неудачный опыт применения вакцин из классических штаммов, что приводило к вспышкам инфекционной бурсальной болезни.

Поэтому можно сделать вывод, что для производства и применения рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни, на основе белка VP2, лучше использовать штаммы, выделенные на территории Российской Федерации (эпизоотический штамм «Синявинский», 641_Russia, 716_Russia, 630_Russia, 727_Russia, 713_Russia) либо классический штамм «52/70».

Исследование выполнено при поддержке гранта ФГБОУ ВО СПбГУ М1 2020-1 (СПбГУ ID: 75428571) «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адьювантов – иммуностимуляторов».

THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE VP2 GENE OF THE EPIZOOTIC STRAIN OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS AND COMPARING IT WITH CLASSICAL AND HIGHLY VIRULENT STRAINS

Veretennikov V.V., Assistant of the Department of Epizootology named after V.P. Urban; Rummyantsev A.M. candidate of biology sciences (FSBEI HE SPbSU), Javadov E.D., Doctor of Veterinary Sci-

ences, Professor of the Department of Epizootology named after V.P. Urban, Tarlavin N.V., Assistant of the Department of Epizootology named after V.P. Urban (FSBEI HE SPbSUVM), Veretennikov M.V. 3rd year student (FSBEI HE MSU).
ABSTRACT

Infectious bursal disease (IBD) virus is the causative agent of a severe immunosuppressive disease in young birds. Although the disease was first discovered more than 60 years ago, it continues to pose a significant threat to the poultry industry worldwide [4]. The causative agent is RNA-containing virus, which belongs to the genus *Avibirnavirus* of the family *Birnaviridae* [17].

The virion includes five viral proteins, designated VP1, VP2, VP3, VP4, and VP5 [15] with an approximate molecular weight of 97 kDa, 41 kDa, 32 kDa, 28 kDa, and 21 kDa, respectively. Additional proteins such as VPX or pVP2 are also noted [12].

The capsid protein VP2 has long been a focus of recombinant subunit vaccine development because it is responsible for eliciting a protective immune response against IBD. However, reports of many authors [2,3,6] point to the antigenic heterogeneity of IBD virus strains isolated in Russia and other countries, which is associated with the failure of existing vaccines in preventing the disease; therefore, to create and successfully use recombinant vaccines, it is necessary to study epizootic strains isolated in the Russian Federation as well.

Therefore, the purpose of this work was to perform genetic analysis of the VP2 gene of the epizootic strain "Sinyavinsky" and compare it with the classical strains of IBD virus serotypes 1 and 2 isolated in Europe and highly virulent strains isolated in the Russian Federation

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

Алиева, А. К. К вопросу антигенной идентичности полевых изолятов и эталонного штамма "52/70-м" вируса болезни Гамборо / А. К. Алиева, Г. Р. Юсупова, А. С. Алиев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т. 206. – С. 3-8.

Бирман Б.Я. и др. Оценка эффективности

живых вакцин против инфекционного бурсита (Болезни Гамборо) // Ветеринарная наука — производству. Минск: 1996. — Вып. 32. — С. 56

Борисов А.В. Профилактика бурсальной болезни птиц. // Уральские Нивы. — 1995. — № 4–6. — С. 23–26.

Веретенников В. В. Использование рекомбинантного белка VP2 в качестве субъединичной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / Э. Д. Джавадов, А. М. Румянцев, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 3. – С. 9-14. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.3.9.

Щербакова Л. О. Молекулярная эпизоотология ИББ в России / Л. О. Щербакова, А. В. Борисов, Ю. А. Бочков, В. В. Дрыгин // *Аграрная Россия*. – 2002. – № 2. – С. 16-19.

Щербакова Л.О. и др. Сравнительный анализ варибельной области гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни // Мол. Генетика, вирусология и микробиология. – 1998. -№1. – С.35 - 40.

Azad AA, Fahey KJ, Barrett SA, Emy KM, Hudaon PJ. Expression in *Escherichia coli* of cDNA fragments encoding the gene for the host-protective antigen of infectious bursal disease virus. *Virology* 1986;149:190–8.

Bygrave A.C. Faragher J.T. Mortality associated with Gumboro disease // *Veter. Rec.*, 1970, – Vol. 86. -№ 25, – P. 758–759.

Chettle, N. J., J. C. Stuart, and P. J. Wyeth. Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.* 125:271–272. 1989.

Etteradossi, N., C. Gauthier, I. Reda, S. Comte, G. Rivallan, D. Toquin, C. de Boisse'son, J. Lamande', V. Jestin, Y. Morin, C. Cazaban, and P. M. Borne. Extensive antigenic changes in an atypical isolate of very virulent infectious bursal disease virus and experimental clinical control of this virus with an antigenically classical live vaccine. *Av. Pathol.* 33:423–431. 2004.

Huang Z, Elankumaran S, Yunus AS, Samal SK. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol* 2004;78:10054–63

- Kasanga, C.J., T. Yamaguchi, P.N. Wambura, H.M. Munang'andu, K. Ohya, and H. Fukushi. 2008. Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) genome in free-living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. *Virus Genes*. 36:521–529.
- Li L, Fang WH, Fan YJ, Xu J, Fang L, Li JR, et al. Expression of the infectious bursal disease virus polyprotein in vero cells using attenuate *Salmonella typhimurium* as transgenic carrier. *Chin J Biotechnol* 2004;20:437–40.
- Lu MJ, Li JR, Wang YF, Jin YF, Yu L. Expression of polyprotein of infectious bursal disease virus in *Bombyx mori*. *Chin J Biotechnol* 2002;18:472–6.
- Mundt, E., B. Köllner, and D. Kretschmar. 1997. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol*. 71:5647–5651.
- Shaw I, Davison TF. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine* 2000;18:3230–41.
- Van den Berg TP, Etteradossi N, Toquin D, Meulemans G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech*. 2000 Aug;19(2):509-43. English, French. PMID: 10935278.
- Vinayagamurthy, Balamurugan & Kataria, J. (2006). Economically Important Non-oncogenic Immunosuppressive Viral Diseases of Chicken—Current Status. *Veterinary research communications*. 30. 541-66. 10.1007/s11259-006-3278-4.
- Wang XM, Wang MP, Gao HL, Fu ZY, Zeng XW, Zhang SF. High efficiency expression of the major antigen gene VP2 of infectious bursal disease virus in yeast and rudimentary immunization test. *Sci Agric Sinica* 2003;36:443–7.