



Вирус инфекционной бурсальной болезни: выявление новой генетической группы и реассортантов

Л. О. Щербакова¹, Е. В. Овчинникова², Т. Н. Зыбина³, С. Н. Колосов⁴, Н. Г. Зиняков⁵, З. Б. Никонова⁶, Д. Б. Андрейчук⁷, И. А. Чвала⁸

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-5434-6179>, e-mail: scherbakova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-9434-6680>, e-mail: zybina@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-8467-180X>, e-mail: kolosov@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>, e-mail: nikonova@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты филогенетического анализа изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни по нуклеотидным последовательностям фрагментов геномных сегментов А и В. Традиционно изоляты вируса инфекционной бурсальной болезни классифицируют на основе филогенетического анализа гипервариабельной области гена VP2. Анализ фрагмента гена VP2 изолятов, выявленных на территории Российской Федерации, показал, что большинство из них относятся к генетической группе, объединяющей высоковирулентные изоляты вируса инфекционной бурсальной болезни. Но не все изоляты, относящиеся к одной генетической группе, обладают одинаковыми фенотипическими свойствами. Это связано, в частности, с тем, что вирулентность определяется генетическими особенностями не только гена VP2 (сегмент А), но и гена VP1 (сегмент В). Сегментированная природа генома вируса инфекционной бурсальной болезни делает возможным образование реассортантов, которые можно выявить в результате анализа обоих геномных сегментов. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов VP2 и VP1 28 изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни, выявленных в птицеводческих хозяйствах РФ, Украины и Казахстана в 2007–2019 гг., показал, что 15 из них являются реассортантами. Среди реассортантов выявлены различные комбинации геномных сегментов. Выявление разнообразия комбинаций геномных сегментов вируса инфекционной бурсальной болезни свидетельствует о том, что в птицеводческих хозяйствах циркулирует гетерогенная вирусная популяция. Изучение степени патогенности трех изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни показало, что наиболее вирулентным был изолят, имеющий оба геномных сегмента, характерных для высоковирулентного вируса. Два реассортанта, имеющих только по одному геномному сегменту А или В, характерному для высоковирулентного вируса инфекционной бурсальной болезни, обладали менее выраженными вирулентными свойствами.

Ключевые слова: вирус инфекционной бурсальной болезни, филогенетический анализ

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Щербакова Л. О., Овчинникова Е. В., Зыбина Т. Н., Колосов С. Н., Зиняков Н. Г., Никонова З. Б., Андрейчук Д. Б., Чвала И. А. Вирус инфекционной бурсальной болезни: выявление новой генетической группы и реассортантов. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 77–84. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-77-84.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Щербакова Лидия Олеговна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: scherbakova@arriah.ru.

Infectious bursal disease virus: identification of the novel genetic group and reassortant viruses

L. O. Scherbakova¹, Ye. V. Ovchinnikova², T. N. Zyбина³, S. N. Kolosov⁴, N. G. Zinyakov⁵, Z. B. Nikonova⁶, D. B. Andreychuk⁷, I. A. Chvala⁸

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-5434-6179>, e-mail: scherbakova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-9434-6680>, e-mail: zybina@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-8467-180X>, e-mail: kolosov@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>, e-mail: nikonova@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

SUMMARY

The results of the phylogenetic analysis of the nucleotide sequence of the IBDV A and B genome segments have been presented. Traditionally the IBDV isolates are classified based on the phylogenetic analysis of the hypervariable region of the VP2 gene. The analysis of the VP2 gene segments of the isolates detected in the Russian Federation demonstrated that most of them belong to the genetic group comprising highly virulent IBDV isolates. However, not all isolates belonging to one genetic group have the same phenotypic characteristics. This is related to the fact that the virulence is determined not only based on the characteristics of the VP2 gene (A segment) but on the characteristics of the VP1 gene (B segment) as well. The IBDV genome segmentation allows formation of reassortant viruses which can be identified as a result of the genome segment analysis. The phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of VP2 and VP1 genes of 28 IBDV isolates detected at RF, Ukrainian and Kazakh poultry establishments in 2007 and 2019 showed that 15 of them are reassortant viruses. Different combinations of the genome segments have been identified among these reassortant viruses. Detection of different combinations of IBDV genome segments is indicative of the fact that the heterogeneous virus population circulates on the poultry farms. Pathogenicity studies of the three IBDV isolates showed that the most virulent was an isolate having two genome segments characteristic of the highly virulent virus. Two reassortant viruses having only one genome segment A or B, characteristic of the infectious bursal disease, demonstrated less pronounced virulent properties.

Keywords: infectious bursal disease virus, phylogenetic analysis

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Scherbakova L. O., Ovchinnikova Ye. V., Zybina T. N., Kolosov S. N., Zinyakov N. G., Nikonova Z. B., Andreychuk D. B., Chvala I. A. Infectious bursal disease virus: identification of the novel genetic group and reassortant viruses. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 77–84. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-77-84.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Lidia O. Scherbakova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: scherbakova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус инфекционной бурсальной болезни (ВИББ) является возбудителем острого высококонтагиозного заболевания, широко распространенного в странах с промышленным птицеводством. Вирус ИББ поражает лимфоциты фабрициевой сумки, тимуса, селезенки, пейеровых бляшек кишечника. Последствиями иммуносупрессии, вызванной ВИББ, являются снижение эффективности вакцинации, в том числе против других болезней, а также увеличение восприимчивости цыплят к условно-патогенным микроорганизмам. Высоковирулентный вирус ИББ (ВВ ВИББ) может вызывать повышенную смертность птицы. Высокая контагиозность и устойчивость вируса к действию факторов внешней среды и дезинфектантов, а также значимый экономический ущерб от болезни делает ИББ серьезной проблемой для птицеводства многих стран мира.

Вирус ИББ относится к семейству *Birnaviridae*, роду *Avibirnavirus* [1]. Геном ВИББ представлен двумя сегментами двухцепочечной РНК. Сегмент А содержит две частично перекрывающиеся открытые рамки считывания (ОРС). Меньшая ОРС1 кодирует неструктурный вирусный белок VP5, который способствует высвобождению зрелых вирионов. Более крупная ОРС2 кодирует полипротеин, из которого в результате автопротеолиза образуются предшественники VP2 (pVP2), VP4 и VP3 [2]. Белок VP2 участвует в формировании внешней поверхности вириона. Это главный иммуноген, несущий антигенные сайты, отвечающие за нейтрализацию вируса антителами. Белок VP2 от-

вечает за антигенную изменчивость и вирулентность вируса. Белок VP3 взаимодействует со всеми другими компонентами вириона, поэтому он играет критическую роль в морфогенезе вириона, инкапсидации и репликации вируса. Белок VP4 представляет собой сериновую протеазу, которая играет важную роль в созревании VP2, а также участвует в протеолизе полипротеина. Геномный сегмент В содержит одну ОРС, кодирующую РНК-зависимую РНК-полимеразу VP1, отвечающую за репликацию вирусного генома и синтез мРНК [3, 4].

В настоящее время выявлено 2 серотипа ВИББ. Штаммы ВИББ серотипа 1 классифицируются в зависимости от тяжести вызываемого заболевания на 3 типа: субклинический, классический вирулентный и высоковирулентный [5]. Вирус серотипа 2 выделен у индеек и авирулентен для цыплят.

Традиционно изоляты ВИББ классифицируют на основе филогенетического анализа фрагмента гена VP2, включающего гипервариабельную область. Классификация, предложенная Т. Р. Van den Berg et al. [6], подразделяет штаммы серотипа 1 на генотипы: аттенуированные, классические вирулентные, высоковирулентные, антигенные варианты и австралийские.

Высоковирулентный ВИББ впервые был обнаружен у бройлеров в Европе в конце 1980-х гг. [7] и быстро распространился в Африке, Азии и Латинской Америке, вызывая высокую заболеваемость и смертность более 30% [8]. Антигенные варианты стали преобладающими на Американском континенте. Они обычно вызывают субклиническую инфекцию, характеризу-

ющуюся быстрой атрофией фабрициевой сумки без значительного воспаления, что может привести к иммуносупрессии. В 2019 г. появилось сообщение о выявлении в Китае нового, отличающегося от американских вариантов, антигенного варианта ВИББ, который вызывал сильную иммунодепрессию у цыплят [9].

Антигенный фенотип ВИББ определяется гипервариабельной областью VP2, в частности, аминокислотами, расположенными на вершине петлевых структур, обозначенных PBC, PDE, PFG и PHI [10]. Установлено, что даже точечные мутации в этих областях могут привести к антигенному дрейфу ВИББ [10, 11] и сделать вакцинацию против ИББ неэффективной.

Michel L. O. and Jackwood D. J. [12] предложили использовать новую классификацию ВИББ, разделив идентифицированные штаммы вируса на 7 геногрупп. Большинство ВИББ формируют 3 геногруппы: 1 – классическая, 2 – вариантная и 3 – ВВ ВИББ или реассортантные ВИББ. Оставшиеся 4 геногруппы включают ВИББ, выявленные в разных регионах мира.

Изоляты ВИББ, принадлежащие к одной из геногрупп, имеют ряд общих генотипических и фенотипических свойств. Но не всегда все изоляты, относящиеся к одной и той же геногруппе, обладают одинаковыми фенотипическими свойствами. Это связано, в частности, с тем, что вирулентность определяется генетическими различиями не только в гене VP2, но и в гене VP1 [13–15].

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена VP1 показывает, что все штаммы ВИББ делятся на две большие генетические группы: одна из них содержит ВВ ВИББ, в другую входят все остальные геногруппы ВИББ [16].

Сегментированная природа генома ВИББ делает возможным образование реассортантов в случае коинфицирования клетки хозяина разными штаммами вируса. Были опубликованы работы о выявлении реассортации между штаммами серотипа 1 [17–22]. Реассортантные вирусы, у которых сегмент А характерен для ВВ ВИББ, а сегмент В относится к другой, не высоковирулентной группе, часто имеют патогенность ниже, чем у ВВ родительских штаммов [23]. С другой стороны, в Польше был выявлен реассортант Врор/03, который имел сегмент А, происходящий от ВВ ВИББ, а сегмент В – от классического аттенуированного штамма D78 [24]. Несмотря на мозаичный генетический состав, вирус вызвал высокую смертность (80%) у экспериментально инфицированных SPF-цыплят и поражения, типичные для острой формы ИББ. Эти данные противоречат предыдущим экспериментальным исследованиям, в которых естественные реассортанты демонстрировали промежуточный патотип [23].

Анализ фрагмента гена VP2 изолятов ВИББ, выявленных на территории Российской Федерации в период с 1993 по 2020 г., показал, что большинство из них относятся к группе ВВ ВИББ. Анализ двух геномных сегментов является более информативным и позволяет выявлять реассортанты вируса. В данной работе приведены молекулярные характеристики изолятов ВИББ, выявленных в 2007–2019 гг., на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей гипервариабельной области гена VP2 (сегмент А) и фрагмента гена VP1, несущего филогенетический маркер (сегмент В).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 26 изолятов ВИББ, выявленных в пробах патологического материала, полученных из птицеводческих хозяйств РФ, а также 2 изолята ВИББ – с Украины и из Казахстана (табл. 1).

Выделение РНК. Суммарную РНК выделяли из осветленной суспензии, приготовленной из фабрициевых сумок кур, с использованием коммерческого набора SV 96 Total RNA Isolation System (Promega, США).

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили в одну стадию. Для постановки реакции использовали обратную транскриптазу

Таблица 1
Изоляты вируса инфекционной бурсальной болезни

Table 1
IBDV isolates

№	Дата получения проб	Регион отбора проб	Название изолята
1	25.06.2007	Красноярский край	IBDVRF02-2007
2	11.10.2007	Республика Дагестан	IBDVRF03-2007
3	29.10.2007	Украина	IBDVUkr04-2007
4	12.11.2007	Приморский край	IBDVRF05-2007
5	04.06.2014	Новгородская область	IBDVRF02-2014
6	28.07.2014	Республика Казахстан	IBDVKaz03-2014
7	11.08.2014	Республика Татарстан	IBDVRF04-2014
8	16.10.2014	Оренбургская область	IBDVRF05-2014
9	08.04.2015	Владимирская область	IBDVRF02-2015
10	11.10.2015	Ярославская область	IBDVRF06-2015
11	27.10.2016	Новгородская область	IBDVRF02-2016
12	09.11.2016	Челябинская область	IBDVRF03-2016
13	04.04.2017	Новгородская область	IBDVRF01-2017
14	02.08.2017	Чувашская Республика	IBDVRF02-2017
15	05.10.2017	Курская область	IBDVRF03-2017
16	24.11.2017	Кировская область	IBDVRF06-2017
17	28.11.2017	Республика Марий Эл	IBDVRF08-2017
18	21.08.2018	Ленинградская область	IBDVRF01-2018
19	03.08.2018	Курская область	IBDVRF02-2018
20	16.01.2019	Новгородская область	IBDVRF01-2019
21	16.01.2019	Новгородская область	IBDVRF02-2019
22	27.02.2019	Свердловская область	IBDVRF03-2019
23	07.03.2019	Ленинградская область	IBDVRF04-2019
24	06.05.2019	Ивановская область	IBDVRF05-2019
25	06.06.2019	Новгородская область	IBDVRF06-2019
26	24.06.2019	Владимирская область	IBDVRF07-2019
27	02.07.2019	Владимирская область	IBDVRF09-2019
28	18.10.2019	Ярославская область	IBDVRF10-2019

вируса миелобластога птиц (AMV-RT) и Taq-ДНК-полимеразу (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для расчета праймеров были использованы консервативные области VP1 и VP2. Реакционная смесь для ОТ-ПЦР в конечном объеме 25 мкл содержала: 10 мкл деионизованной воды; 5 мкл 5x буфера для ОТ-ПЦР; 2 мкл 25 мМ раствора MgCl₂; 1 мкл раствора дНТФ 10 мМ; по 1 мкл раствора прямого и обратного праймеров в концентрации 10 пмоль/мкл; 0,13 мкл обратной транскриптазы и 0,25 мкл полимеразы; 5 мкл раствора суммарной РНК. Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 50 °С. Для амплификации применяли следующие температурно-временные параметры: 95 °С – 10 мин (активация полимеразы), далее 40 циклов, каждый из которых состоял из трех шагов: 95 °С – 50 сек., 55 °С – 50 сек., 72 °С – 60 сек. Для увеличения чувствительности использовали nested-ПЦР с внутренней парой праймеров. Для визуализации результатов реакции использовали электрофорез в 2%-м агарозном геле с бромистым этидием.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ. Очищенные ПЦР-продукты использовали для определения нуклеотидных последовательностей фрагментов генов VP1 и VP2, которое осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism® 3100 (США) с помощью наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Для анализа использовали нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВИББ, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (табл. 2). Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы множественного выравнивания ClustalW. Построение филогенетического дерева проводили

с помощью алгоритма UPGMA в реализации пакета MEGA, версия 6.06.

Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с базой данных последовательностей и вычисление статистической значимости осуществляли с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов VP2 и VP1 для 28 изолятов ВИББ, выявленных в птицеводческих хозяйствах РФ, Украины и Казахстана в период с 2007 по 2019 г. Для сравнительного анализа использовали опубликованные нуклеотидные последовательности штаммов ВИББ, относящиеся к разным генотипам по классификации L. O. Michel and D. J. Jackwood [12] (табл. 2).

Филогенетический анализ фрагмента гена VP2.

В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP2 изолятов ВИББ было установлено, что 22 изолята относятся к генотипу 3 (ВВ ВИББ), изолят IBDVRF07-2019 – к генотипу 1, 2 изолята IBDVRF03-2017 и IBDVRF02-2018 являются вариантами, 3 изолята IBDVRF05-2014, IBDVRF03-2016 и IBDVRF03-2019 отличаются от всех изолятов более чем на 5% и формируют новую генотипу 8 (рис.).

Генотипу 3 включает ВВ ВИББ и является наиболее многочисленной. Принадлежащие к этой генотипу штаммы ВИББ были выявлены во время острых вспышек инфекционной бурсальной болезни в птицеводческих хозяйствах во всем мире. В последние годы значительно возросло количество опубликованных нуклеотидных последовательностей гена VP2 штаммов, относящихся к генотипу 3.

Анализ последовательностей показывает, что в гипервариабельной области VP2 накапливаются мутации внутри группы, что позволяет выделять в ней подгруппы 3-1, 3-2, 3-3 [12]. Относящиеся к этим под-

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни, использованные для анализа

Table 2
Nucleotide sequences of the IBDV isolates used for analysis

№	Штамм	Номер в GenBank VP2	Номер в GenBank VP1	Страна	Генотип
1	D78	AF499929	EU162090	Люксембург	1
2	228E	AF457104	AJ878657	Нидерланды	1
3	52/70	HG974565	HG974566	Великобритания	1
4	STC	D00499	JQ619639	США	1
5	Variant E	AF133904	AF133905	США	2
6	UK661	X92760	X92761	Великобритания	3
7	624Russia	MF142552	MF142481	Россия	3-2
8	593Russia	MF142550	MF142479	Россия	3-3
9	MG4	JN982252	–	Бразилия	4
10	Mexico04M101	DQ916210	–	Мексика	5
11	ITA-02	JN852986	–	Италия	6
12	002-73	AJ878908	AJ878639	Австралия	7

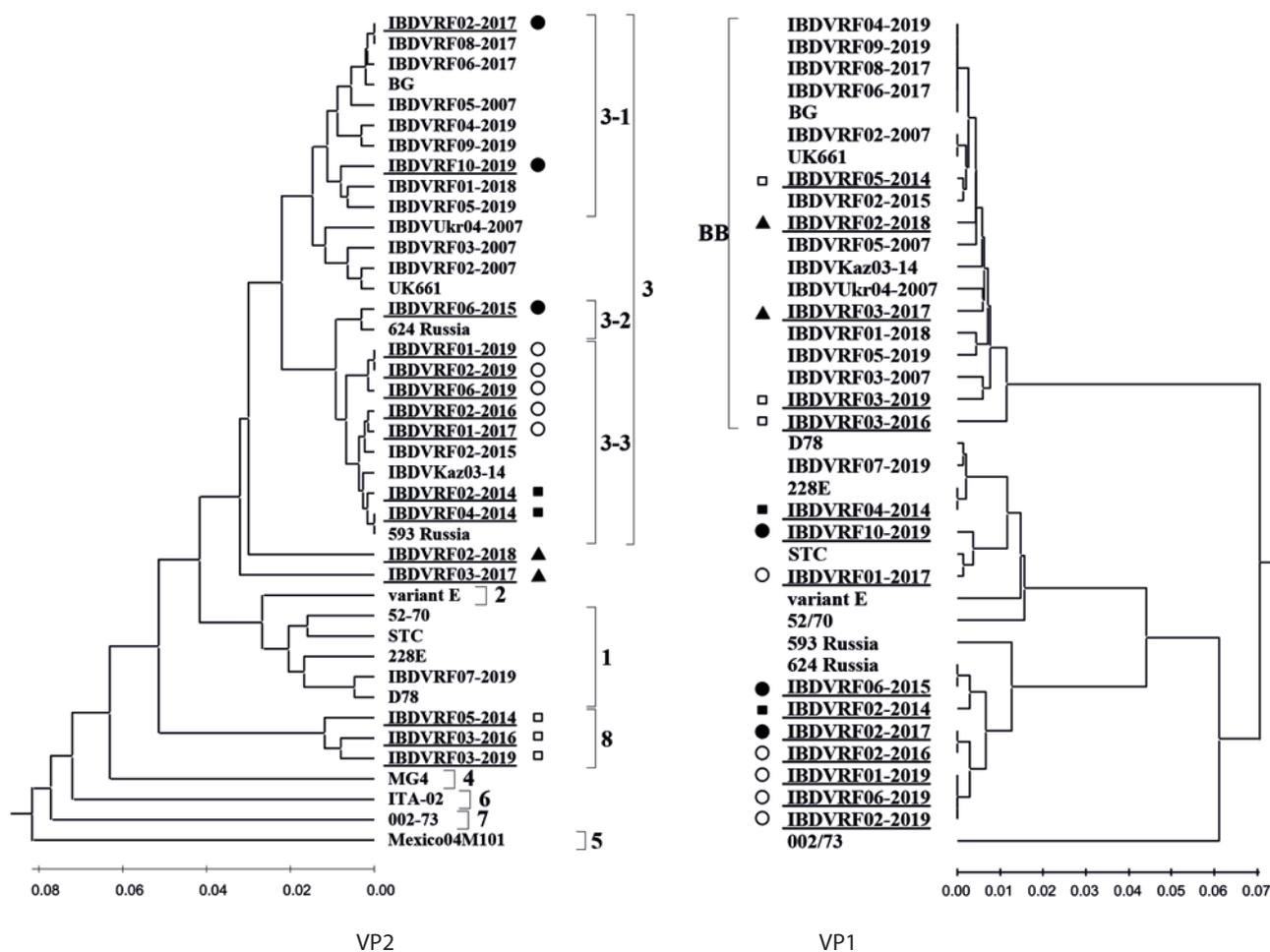


Рис. Филогенетические деревья, построенные на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей гиперварибельной области гена VP2 и фрагмента гена VP1. Цифрами указаны генотипы, подчеркиванием и геометрическими фигурами обозначены реассортантные изоляты

Fig. Phylogenetic trees built on the basis of the alignment of the nucleotide sequences of the VP2 gene hypervariable region and VP1 gene segment. Numerals represent genotypes, underlining and geometric figures represent reassortant isolates.

группам изоляты имеют отличия в аминокислотном составе в позициях 212, 222, 254, входящих в состав петлевых структур) и отвечающих за антигенные свойства ВИББ (табл. 3).

Изолят IBDVRF07-2019, принадлежащий к геногруппе 1, является дериватом вакцинного штамма D78. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов VP1 и VP2 этого изолята имеют 99,36% гомологии со штаммом D78. Атенуированная вакцина на основе данного штамма широко используется в птицеводческих хозяйствах РФ более 20 лет.

Два вариантных изолята IBDVRF03-2017 и IBDVRF02-2018 были выявлены в пробах, полученных из одного птицеводческого хозяйства Курской области. Нуклеотидные последовательности гена VP2 этих изолятов отличаются друг от друга и от изолятов других геногрупп.

Три изолята IBDVRF05-2014, IBDVRF03-2016, IBDVRF03-2019, выявленные в Оренбургской, Челябинской и Свердловской областях, отличаются от всех исследованных и опубликованных штаммов и, по-видимому, формируют новую геногруппу 8. Нукле-

отидные последовательности гена VP2 штаммов и изолятов ВИББ, содержащиеся в GenBank, отличались от последовательностей данной группы изолятов более чем на 5%. Изоляты геногруппы 8 имеют в гиперварибельной области VP2 (табл. 3) аминокислотные остатки, характерные для ВВ ВИББ (242I, 256I, 294I, 299S), а также ряд собственных только для них аминокислотных остатков: 213E, 220F, 222V, 269S, 280T, 317R, 324P. Стоит отметить, что изменение аминокислоты в положении 222 имеет важное значение, поскольку этот остаток расположен в петле РВС. Считается, что переход от Pro к Thr в позиции 222 сыграл существенную роль в значительном изменении антигенных свойств вариантных штаммов ВИББ в 1980-х гг. [25], что привело к неэффективности вакцинации.

Филогенетический анализ фрагмента гена VP1.

В результате анализа опубликованных нуклеотидных последовательностей гена VP1 штаммы ВИББ делятся на 2 большие группы. Первая включает ВВ ВИББ, вторая – все остальные генетические группы: аттенуированные, классические вариантные, антигенные и австралийские варианты, а также серотип 2 [26].

Таблица 3

Отличия аминокислотных последовательностей в гипервариабельной области VP2 и маркерной последовательности VP1

Table 3

Difference between the amino acid sequences in the hypervariable VP2 region and VP1 marker sequence

Штамм/изолят	Геногруппа	VP2													VP1
		212	213	220	222	242	254	256	269	280	294	299	317	324	145-146-147
228E	1	D	D	Y	S	V	G	I	T	N	L	N	S	Q	NEG
D78	1	D	D	Y	P	V	G	V	T	N	L	N	S	Q	NEG
52-70	1	D	D	Y	P	I	G	V	T	N	L	N	S	Q	NEG
STC	1	D	D	Y	P	V	G	V	T	N	L	N	S	Q	NED
Variant E	2	D	N	Y	T	V	S	V	T	N	L	N	S	E	NEG
UK661	3	D	D	Y	A	I	G	I	T	N	I	S	S	Q	TDN
IBDVRF02-2017	3-1	D	D	Y	A	I	G	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
IBDVRF06-2015	3-2	N	D	Y	T	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
IBDVRF02-2016	3-3	N	D	Y	A	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
IBDVRF04-2014	3-3	N	D	Y	A	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
MG4	4	–	D	Y	S	V	S	V	T	T	L	N	S	Q	–
Mexico04M101	5	–	N	Y	T	V	N	V	T	N	L	N	K	Q	–
ITA-02	6	–	-	H	Q	V	S	K	S	N	L	S	S	Q	–
002-73	7	D	D	Y	P	V	G	V	T	N	L	S	S	Q	TES
IBDVRF05-2014	8	D	E	F	V	I	D	I	S	T	I	S	R	P	TDN
IBDVRF03-2017	Вариантный изолят	D	D	Y	T	I	D	I	T	N	I	S	R	Q	TDS
IBDVRF02-2018	Вариантный изолят	N	D	Y	A	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	TDN

Было определено, что в VP1 в позициях 145/146/147 находится характерный для ВВ ВИББ маркерный триплет TDN [27, 28]. Среди ВВ ВИББ наблюдали низкую вариабельность этого триплета в VP1.

Филогенетический анализ фрагмента гена VP1 исследованных нами изолятов ВИББ показал, что они также разделяются на 2 группы: в группу с ВВ ВИББ-подобным сегментом вошли 17 изолятов, а в группу с не-ВВ ВИББ-подобным сегментом В – 11 изолятов. В первой группе, за исключением изолята IBDVRF03-2017, последовательность VP1 несет характерную для ВВ ВИББ маркерную последовательность TDN (табл. 3).

Филогенетический анализ фрагмента гена VP1 показывает, что группа с не-ВВ ВИББ-подобным сегментом делится на две подгруппы. Первая включает аттенуированные штаммы, классические вирулентные и антигенные варианты, и в нее входят 4 исследованных изолята: IBDVRF07-2019, IBDVRF04-2014, IBDVRF10-2019, IBDVRF01-2017. Вторая подгруппа состоит из 4 изолятов (IBDVRF02-2014, IBDVRF02-2016, IBDVRF01-2019, IBDVRF06-2019), выявленных в одном птицеводческом хозяйстве Новгородской области, и трех изолятов (IBDVRF02-2017, IBDVRF06-2015, IBDVRF02-2019), полученных из Чувашии, Ярославской и Новгородской областей. В эту же подгруппу также попадают изоляты 593 Russia и 624 Russia, выявленные в РФ. Интересен источник происхождения изолятов ВИББ, входящих в эту эндемичную

подгруппу, поскольку она включает изоляты, обнаруженные исключительно на территории РФ. Сравнение с опубликованными последовательностями VP1 показало, что нуклеотидные последовательности гена VP1 этих изолятов ВИББ отличались от всех остальных изолятов и штаммов более чем на 6%. Все изоляты в этой подгруппе имеют маркерный триплет NEG.

Выявление реассортантов. Десять изолятов, у которых ген VP2 относится к ВВ ВИББ (геногруппа 3), являются реассортантами. Кроме того, изоляты геногруппы 8 также являются реассортантами. Филогенетическое положение, полученное при анализе гена VP1, указывает, что все три изолята входят в группу ВВ ВИББ. Два вариантных изолята имеют VP1, также относящийся к ВВ ВИББ. Таким образом, 15 из 28 исследованных изолятов ВИББ являются реассортантами.

Среди изолятов, не относящихся по структуре гена VP1 к ВВ ВИББ, только изолят IBDVRF07-2019 (геногруппа 1) не является реассортантом и имеет 99,36% гомологии с вакцинным штаммом D78 в обоих генах.

Изолят IBDVRF04-2014 (подгруппа 3-3) имеет 100%-ю гомологию с вакцинным штаммом 228E по фрагменту гена VP1. Получение такого реассортанта можно объяснить использованием вакцины на основе штамма 228E.

Необычную группу реассортантов выявляли в птицеводческом хозяйстве Новгородской области в те-

чение 6 лет. По структуре фрагмента гена VP2 они являются близкородственными (имеют 99%-ю гомологию) и относятся к подгруппе 3-3. По структуре гена VP1, за исключением IBDVRF01-2017, они входят в эндемичную подгруппу. Фрагмент гена VP1 изолята IBDVRF01-2017 из Новгородской области имеет высокую степень гомологии со штаммом STC. Происхождение сегмента В данного изолята от вируса другой генетической подгруппы свидетельствует о том, что в данном птицеводческом хозяйстве существует гетерогенная вирусная популяция, включающая ВИББ из разных генетических групп.

Было показано, что в птицеводческих хозяйствах возможна длительная циркуляция определенных генетических форм ВИББ. С другой стороны, происходит смена изолятов вируса. Так, в одном из птицеводств Курской области в течение 2 лет были выявлены варианты изоляты IBDVRF03-2017, IBDVRF02-2018, отличающиеся друг от друга по нуклеотидной последовательности гипервариабельной области гена VP2 на 4,7%. По структуре фрагмента гена VP1 оба изолята относятся к ВВ ВИББ и отличаются друг от друга на 1,8%.

Два отличающихся изолята IBDVRF06-2015 (геногруппа 3-2) и IBDVRF10-2019 (геногруппа 3-1) были выявлены в птицеводческом хозяйстве Ярославской области. Оба они являются реассортантами. Ген VP1 этих изолятов относится к разным генетическим подгруппам: IBDVRF06-2015 относится к эндемичной подгруппе, а IBDVRF10-2019 имеет близкое родство со штаммом STC.

Ранее была изучена степень патогенного действия трех изолятов ВИББ [29]. В исследовании были использованы изолят IBDVRF08-2017, имеющий гены VP1 и VP2, относящиеся к ВВ ВИББ, и два реассортанта: IBDVRF06-2019 – характеризующийся ВВ VP2 и не-ВВ VP1; IBDVRF03-2017 – с вариантным VP2 и ВВ VP1. Установлено, что по отношению к контрольному штамму 52-70 наибольшую оценку вирулентности имел изолят IBDVRF08-17 (80,5%). Наименее вирулентными оказались изоляты IBDVRF06-19 (44,3%) и IBDVRF03-17 (43,9%).

Таким образом, наибольшую вирулентность показал изолят, оба геномных сегмента которого относились к ВВ ВИББ. В то время как реассортанты, имеющие только один сегмент, относящийся к ВВ ВИББ, проявляли меньшую степень патогенности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа гипервариабельной области гена VP2 большинство (22 из 28) исследованных изолятов ВИББ относятся к геногруппе 3 (ВВ ВИББ). Три изолята, выявленные в географически близких регионах, формируют новую геногруппу 8. Два изолята, обнаруженные в птицеводческом хозяйстве Курской области в 2017 и 2018 гг., являются вариантами. Один изолят представляет собой дериват вакцинного штамма D78.

Только часть изолятов 3-й группы обладает VP1, относящимся к ВВ ВИББ. С другой стороны, варианты изоляты и изоляты новой геногруппы 8 имеют VP1, характерный для ВВ ВИББ. Из 28 исследованных изолятов 15 являются реассортантами. Среди реассортантов выявлены различные комбинации геномных сегментов (сегмент В – сегмент А): ВВ – эндемичные, ВВ – классические вирулентные, ВВ – аттенуированные штаммы, варианты – ВВ, геногруппа 8 – ВВ. Выявление разнообразия комбинаций геномных сегментов ВИББ сви-

детельствует о том, что в птицеводческих хозяйствах циркулирует гетерогенная вирусная популяция.

Изучение степени патогенности изолятов ВИББ показало, что реассортантные вирусы менее патогенны, чем ВВ ВИББ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Delmas B., Kibenge F. S. B., Leong J. C., Mundt E., Vakharia V. N., Wu J. L. Family *Birnaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball. London: Academic Press; 2004; 561–569.
2. Kibenge F. S., Dhillon A. S., Russell R. G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 1988; 69 (Pt 8): 1757–1775. DOI: 10.1099/0022-1317-69-8-1757.
3. Macreadie I. G., Azad A. A. Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein bacteria and yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993; 30 (6): 1169–1178. PMID: 8220261.
4. Qin Y., Zheng S. J. Infectious bursal disease virus-host interactions: Multifunctional viral proteins that perform multiple and differing jobs. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (1):161. DOI: 10.3390/ijms18010161.
5. Jackwood D. J., Schat K. A., Michel L. O., de Wit S. A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathol.* 2018; 47 (6): 576–584. DOI: 10.1080/03079457.2018.1506092.
6. Van den Berg T. P., Etteradossi N., Toquin D., Meulemans G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.* 2000; 19 (2): 509–543. DOI: 10.20506/rst.19.2.1227.
7. Stuart J. C. Acute infectious bursal disease in poultry. *Vet. Rec.* 1989; 125 (10):281. DOI: 10.1136/vr.125.10.281-a.
8. Etteradossi N., Saif Y. M. Infectious bursal disease. In: *Diseases of Poultry*. Eds. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, V. L. Nair. 13th ed. Wiley-Blackwell; 2013; 219–246.
9. Fan L., Wu T., Hussain A., Gao Y., Zeng X., Wang Y., et al. Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 212–220. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.01.023.
10. Letzel T., Coulibaly F., Rey F. A., Delmas B., Jagt E., van Loon A. A., Mundt E. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 2007; 81 (23): 12827–12835. DOI: 10.1128/JVI.01501-07.
11. Jackwood D. J., Sommer-Wagner S. E. Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease birnavirus (IBDV). *Virology.* 2011; 409 (1): 33–37. DOI: 10.1016/j.virol.2010.09.030.
12. Michel L. O., Jackwood D. J. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch. Virol.* 2017; 162 (12): 3661–3670. DOI: 10.1007/s00705-017-3500-4.
13. Liu M., Vakharia V. N. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology.* 2004; 330 (1): 62–73. DOI: 10.1016/j.virol.2004.09.009.
14. Boot H. J., Hoekman A. J., Gielkens A. L. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Arch. Virol.* 2005; 150 (1): 137–144. DOI: 10.1007/s00705-004-0405-9.
15. Escaffre O., Le Nouën C., Amelot M., Ambroggio X., Ogen K. M., Guionie O., et al. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 2013; 87 (5): 2767–2780. DOI: 10.1128/JVI.02360-12.
16. Le Nouën C., Rivallan G., Toquin D., Etteradossi N. Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Arch. Virol.* 2005; 150 (2): 313–325. DOI: 10.1007/s00705-004-0409-5.
17. Brown M. D., Skinner M. A. Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 1996; 40 (1): 1–15. DOI: 10.1016/0168-1702(95)01253-2.
18. Yamaguchi T., Ogawa M., Miyoshi M., Inoshima Y., Fukushi H., Hirai K. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 1997; 142 (7): 1441–1458. DOI: 10.1007/s007050050171.
19. Sun J. H., Lu P., Yan Y. X., Hua X. G., Jiang J., Zhao Y. Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent infectious bursal disease virus isolated from China. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2003; 50 (3): 148–154. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2003.00646.x.
20. Kong L. L., Omar A. R., Hair-Bejo M., Aini I., Seow H. F. Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. *Arch. Virol.* 2004; 149 (2): 425–434. DOI: 10.1007/s00705-003-0206-6.
21. Cui P., Ma S. J., Zhang Y. G., Li X. S., Gao X. Y., Cui B. A., Chen H. Y. Genomic sequence analysis of a new reassortant infectious bursal disease virus from commercial broiler flocks in Central China. *Arch. Virol.* 2013; 158 (9): 1973–1978. DOI: 10.1007/s00705-013-1682-y.

22. Kasanga C. J., Yamaguchi T., Munang'andu H. M., Ohya K., Fukushi H. Genomic sequence of an infectious bursal disease virus isolate from Zambia: classical attenuated segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A. *Arch. Virol.* 2013; 158 (3): 685–689. DOI: 10.1007/s00705-012-1531-4.
23. Wei Y., Yu X., Zheng J., Chu W., Xu H., Yu X., Yu L. Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 2008; 131 (2): 279–282. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.08.013.
24. Piķula A., Lisowska A., Jasik A., Śmietanka K. Identification and assessment of virulence of a natural reassortant of infectious bursal disease virus. *Vet. Res.* 2018; 49 (1):89. DOI: 10.1186/s13567-018-0586-y.
25. Brown M. D., Green P., Skinner M. A. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J. Gen. Virol.* 1994; 75 (Pt 3): 675–680. DOI: 10.1099/0022-1317-75-3-675.
26. Islam M. R., Zierenberg K., Müller H. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch. Virol.* 2001; 146 (12): 2481–2492. DOI: 10.1007/s007050170018.
27. Gao L., Li K., Qi X., Gao H., Gao Y., Qin L., et al. Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J. Gen. Virol.* 2014; 95 (Pt 4): 888–897. DOI: 10.1099/vir.0.060194-0.
28. Alfonso-Morales A., Rios L., Martínez-Pérez O., Dolz R., Valle R., Perera C. L., et al. Evaluation of a phylogenetic marker based on genomic segment B of infectious bursal disease virus: facilitating a feasible incorporation of this segment to the molecular epidemiology studies for this viral agent. *PLoS One.* 2015; 10 (5):e0125853. DOI: 10.1371/journal.pone.0125853.
29. Зыбина Т. Н., Пяткина А. А., Мороз Н. В., Кулаков В. Ю., Щербакoва Л. О. Биологические свойства изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни, выделенных на территории РФ в период 2017–2019 гг. *Ветеринарная патология.* 2020; (3): 22–29. DOI: 10.25690/VET-PAT.2020.46.82.007.
- Zybina T. N., Pyatkina A. A., Moroz N. V., Kulakov V. Yu., Shcherbakova L. O. Biological properties of the infectious bursal disease virus isolates identified in Russian Federation in 2017–2019. *Veterinarnaya patologiya.* 2020; (3): 22–29. DOI: 10.25690/VETPAT.2020.46.82.007. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 25.10.2021

Доработана после рецензирования / Revised 01.11.2021

Принята к публикации / Accepted 02.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Щербакoва Лидия Олеговна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Овчинникова Евгения Валерьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Зыбина Татьяна Николаевна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Колосов Сергей Николаевич, кандидат биологических наук, сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Зиняков Николай Геннадьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Никонова Зоя Борисовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андрейчук Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Чвала Илья Александрович, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Lidia O. Scherbakova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Yevgeniya V. Ovchinnikova, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Tatyana N. Zybina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Sergey N. Kolosov, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Nikolay G. Zinyakov, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Zoya B. Nikonova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry B. Andreychuk, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ilya A. Chvala, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.