

INFEKČINIO BURSITO SUKĖLĖJO PADERMIŲ FILOGENETINĖ ANALIZĖ

Ilona Aleksėjūnienė, Almontas Aleksėjūnas

LVA Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56128 Kaišiadorys; tel. (8-346) 60 689; el. paštas: IlonaAl@one.lt

Santrauka. Polimerazės grandininės reakcijos ir amplifikuotų kDNR fragmentų tiesioginio sekvenavimo metodais ištyrus broilerių Fabricijaus maišelius, nustatytos keturios infekcinio bursito viruso padermės: *IBV-1*, *IBV-2*, *IBV-3* ir *IBV-4*. Šių ir kitose šalyse išskirtų IBV padermių palyginamoji filogenetinė analizė leido nustatyti, kad Lietuvoje cirkuliuoja IBV padermės (*IBV-1*, *IBV-2*, *IBV-3*) ne tik homologiškos vakcininėms padermėms, bet ir savo kintamosios geno VP2 dalies nukleotidų seka unikali, paplitusi tik mūsų šalyje padermė *IBV-4*.

Raktažodžiai: infekcinio bursito virusas, proteinas VP2, filogenetinė analizė.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF INFECTION BURSAL DISEASE VIRUS STRAINS

Summary. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction procedure was used to amplify a VP2 gene fragment from infectious bursal disease virus (IBDV) in Fabricius bursae of broiler chickens. In the samples were found four isolates (*IBV-1*, *IBV-2*, *IBV-3* and *IBV-4*) of IBDV. The isolates *IBV-1*, *IBV-2* and *IBV-3* were of vaccine origin. i. e. homologous to the vaccine strain "Gumboral" and "MB". However, isolate *IBV-4* distinctly differed from the antigen varieties of classical vaccine pathogenic IBDV strains isolated in USA and in geographically close to Lithuania countries – different areas of Russia and Byelorussia. The results of phylogenetic analysis have shown that isolate *IBV-4* is endemic.

Keywords: infectious bursal disease virus, VP2, phylogenetic analysis.

Įvadas. Infekcinis bursitas (IB) – imunosupresinis susirgimas, kuriuo dažniausiai serga jauni naminiai paukščiai (Sharma et al., 2000; van den Berg, 2000). Susirgimą sukelia RNR turintis, *Birnaviridae* šeimos *Avibirnavirus* genčiai priklausantis virusas (Manual of standards, 2000). Šiuo metu nustatyti du infekcinio bursito viruso (IBV) serotipai, kuriuose identifikuota keletas subtipinių antigeninių variantų (Mahadrika I. G. N. K., 1995). Abu serotipai gali būti patogeniški tiek viščiukams, tiek kalakučiukams, tačiau viščiukams klinikiniai ligos požymiai pasireiškia užsikrėtus tik I serotipo IBV (Cao et al., 1998; Sapats, Ignjatovic, 2000). Patekęs į organizmą, IBV lokalizuojasi Fabricijaus maišelyje, replikuojasi ir suardo subrendusius B-limfocitus, kurių paviršiuje yra M klasės imunoglobulinai ir makrofagai (Luktert, Saif, 1997; Vervelde, Davison, 1997). Užsikrėtę paukščiai tampa imlesni mikrobinei infekcijai, susilpnėja jų imuninis atsakas vakcinoms (van den Berg, 2000).

Viruso genomą sudaro du dvigubos RNR segmentai – A ir B. Segmentas A koduoja keturis proteinus – VP2, VP3, VP4 ir VP5, o segmentas B vieną – VP1. Struktūrinis proteinas VP2 turi labai svarbius epitopus virusus neutralizuojantiems antikūnams (Mundt et al., 1995; Kataria et al., 2001). Kintamos proteino VP2 dalies (nuo 750 iki 1180 nukleotidų), koduojančios konformacinių epitopų, pirminės struktūros palyginamoji analizė yra IBV padermės diferenciacijos pagrindas (Jackwood, Sommer, 1998; Wang et al., 2003). Kaip teigia K. M. Tham ir kiti mokslininkai (1995), nustatytos nukleotidų sekos leidžia identifikuoti virusą jo neišskiriant ir nekultivuojant ląstelių kultūrose.

C. D. Bayliss su kitais tyrėjais (1990) palygino IBV I serotipo keturių padermių genominių segmentų A sekas ir nustatė, kad maksimalus skirtumas tarp dviejų padermių pagal nukleotidų seką yra 7,7%, o pagal aminorūgščių seką – 2,7%. Šie mokslininkai išskyrė VP2 geno kintamąją sritį, kurioje ir yra užkoduoti didžiausi

padermių aminorūgščių skirtumai. Tokio dydžio virusui kaip IBV gali užtekti vieno dviejų genomo srities pakitimų, kad pakistų jo virulentiškumas (Yamaguchi et al., 1995; Yehuda et al., 1999).

Darbo tikslas – nustatyti Fabricijaus maišeliuose IBV, sekvenuoti IB virusų VP2 geno kintamąsias sritis ir atlikti gautų nukleotidų sekų filogenetinę analizę.

Medžiagos ir metodai. Moksliniai tyrimai atlikti laikantis 1997 11 06 Lietuvos Respublikos gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymo Nr. 8-500 („Valstybės žinios“, 1997 11 28, Nr. 108) bei poįstatyminių aktų – LR valstybinės veterinarinės tarnybos įsakymų „Dėl laboratorinių gyvūnų veisimo, dauginimo, priežiūros ir transportavimo veterinarijos reikalavimų“ (1998 12 31, Nr. 4-361) ir „Dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams bandymams“ (1999 01 18, Nr. 4-16).

Vištų Fabricijaus maišeliai IBV izoliuoti buvo renkami iš priverstinai paskerstų paukštynų ir privačių gyventojų paukščių. Maišelių suspensijose IBV buvo nustatomi PGR metodu, o kintama geno VP2 dalies nukleotidų seka nustatyta tiesioginio sekvenavimo metodu. Nuoseklią tyrimų metodiką I. Aleksėjūnienė ir kiti tyrėjai aprašė 2002 metais. Tyrimų metu gautos sekos buvo lyginamos su jau žinomomis IB virusų nukleotidų sekomis.

PGR, lizdinės PGR ir tiesioginio sekvenavimo metodais ištirti suminiai mėginiai:

„A“ paukštyno I mėginys (16 vnt.), II mėginys (12 vnt.);

„B“ paukštyno I mėginys (9 vnt.), II mėginys (11 vnt.);

„C“ paukštyno I mėginys (10 vnt.), II mėginys (14 vnt.);

privačių ūkių I mėginys (9 vnt.) ir II mėginys (4 vnt.).

Tyrimų rezultatai. Virusinę RNR, kurią naudojome atlikdami PGR, išskyrėme iš 200 μl 50% tiriamų

Fabricijaus maišelių suspensijos. Pirmosios komplimentarios DNR grandinės sintezę atlikome naudodami išorinius pradmenis PR1 ir PR4 (pradmenų sekos parodytos 1 lentelėje). Atlikę amplifikaciją, GLV specifinį kDNR fragmentą (656 nukleotidų poros) nustatėme dviejuose Fabricijaus maišelių mėginiuose. Atlikus lizdinę PGR, naudojant vidinius pradmenis PR2 ir PR3 (1 lentelėje), specifiškas IB virusui kDNR fragmentas (484 nukleotidų poros) nustatytas dar dviejuose mėginiuose. Iš viso rasti keturi mėginiai, kuriuose buvo IBV genomas. Likusiuose keturiuose Fabricijaus maišelių suspensijos mėginiuose specifinės IBV kDNR nerasta.

Taikydami PGR metodą nustatome tik IB virusinio genomo fragmentą, tačiau negalime jo tipizuoti, t. y. nustatyti, ar jis vakcininio, ar lauko viruso. Norint identifikuoti viruso padermę, teko amplifikuotus PGR

produktus tiesiogiai sekvenuoti ir nustatyti kintamosios geno VP2 dalies nukleotidų seką.

Buvo ištirti keturi PGR teigiami amplifikavimo produktai (2 lentelė). Kintamosios geno VP2 dalies amplifikuoto kDNR fragmento tiesioginį sekvenavimą atlikome naudodami vidinius pradmenis PR2 ir PR3 (1 lentelė). Gautas nukleotidines sekas palyginome tarpusavyje ir su sekomis, esančiomis informaciniame banke (EMBL). Palyginome mūsų nustatytas viruso padermes su vakcininėmis IBV padermėmis (1 dendrograma). Kadangi padermės *IBV-1*, *IBV-2*, ir *IBV-3* buvo artimos vakcininėms padermėms, toliau tyrėme tik *IBV-4*. Palyginome ją su IBV klasikinėmis patogeninėmis padermėmis 52–70 ir STC, JAV išskirtais antigeniniais variantais bei virulentiniais IBV izoliatais, išskirtais kitose šalyse (2 dendrograma).

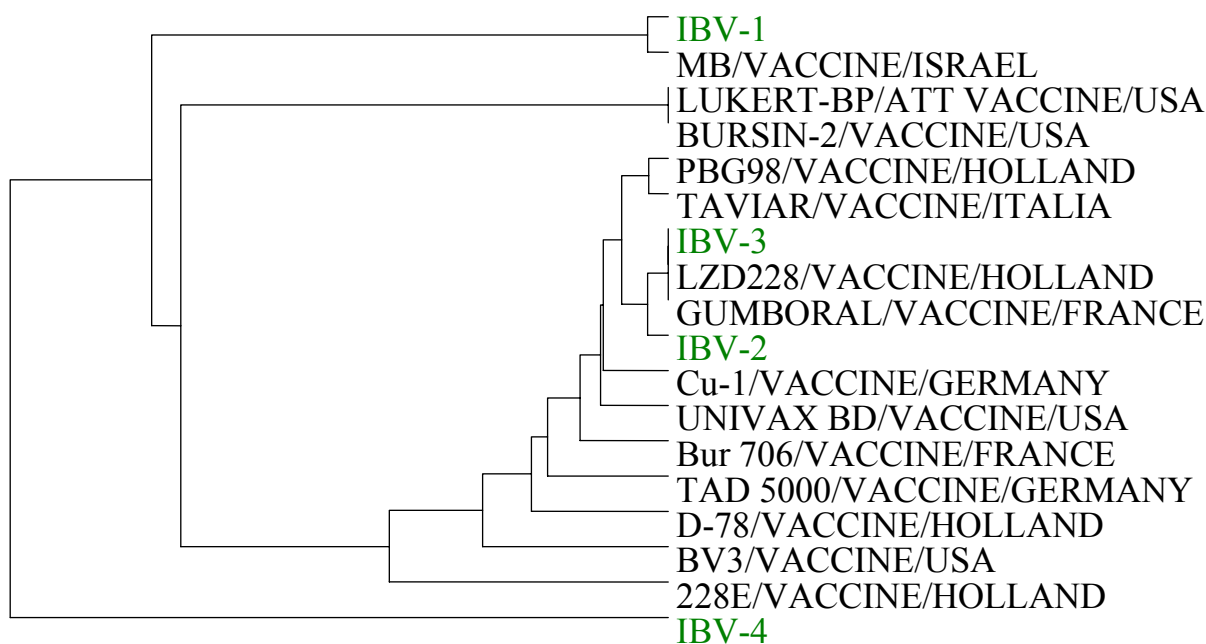
1 lentelė. Pradmenų struktūra kintamosios VP2 geno dalies amplifikacijai

Pradmuo*	Seka	Ilgis	Pradmens sekos vieta IBV genome**
PR1 (-)	5'-GTATGTGAGGCTTGGTGACCC-3'	21	659-679
PR2 (-)	5'-GTGACAGGCCAGAGTCTAC-3'	20	730-749
PR3 (+)	5'-GATCCTGTTGCCACTCTTTC-3'	20	1194-1213
PR4 (+)	5'-CATGGCTCCTGGGTCAAATCG-3'	21	1295-1315

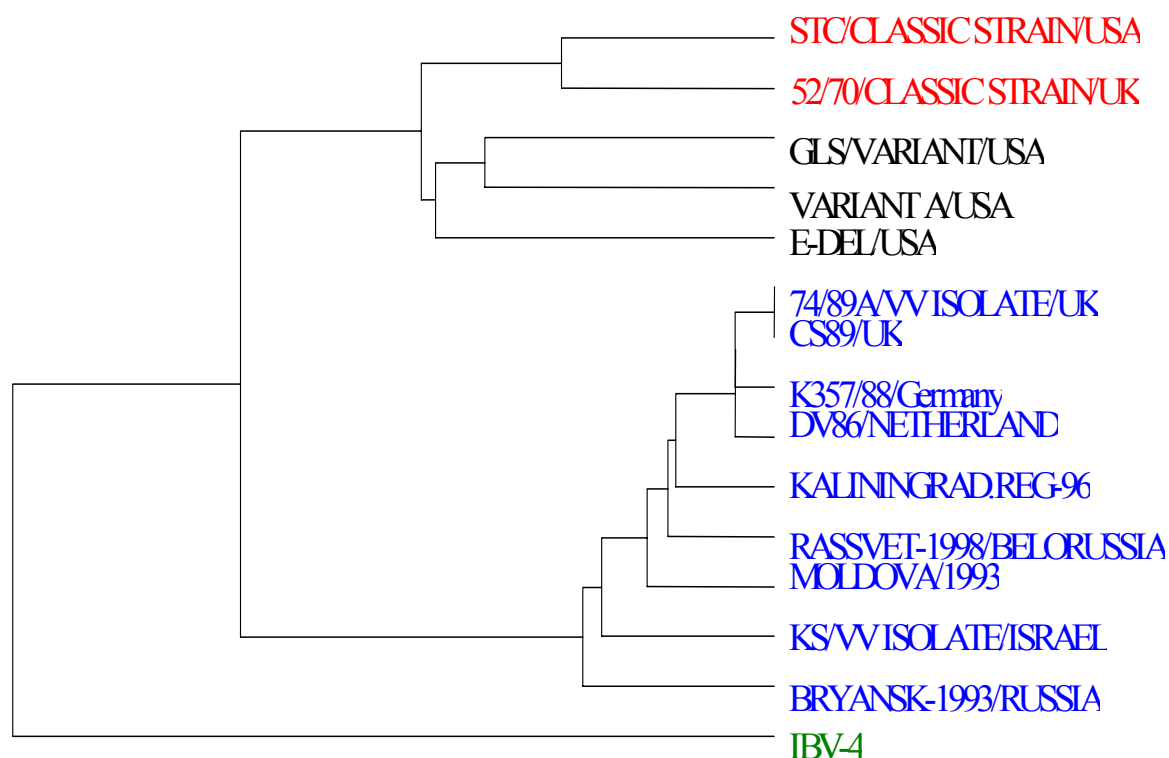
Pastaba. * Skliausteliuose nurodyta, kaip kiekvienas pradmuo atitinka IBV kDNR seką; ** nukleotidų numeracija pateikta pagal visą IBV genomino segmento A nukleotidinę seką (Bayliss C. D. et al., 1990).

2 lentelė. Nustatytos IBV padermės

Eil. Nr.	Sąlyginis pavadinimas	Paukštynas	Pastabos
1.	<i>IBV-1</i>	A	Paukščiai vakcinuoti <i>MB</i> vakcina
2.	<i>IBV-2</i>	B	Paukščiai vakcinuoti <i>Gumboral</i> vakcina
3.	<i>IBV-3</i>	A	Paukščiai vakcinuoti <i>Gumboral</i> vakcina
4.	<i>IBV-4</i>	Privatūs ūkiai	Nevakcinuoti paukščiai



1 dendrograma. Lietuvoje nustatytų infekcinio bursito viruso padermių kintamosios geno VP2 dalies nukleotidų sekų ir IBV vakcininių padermių homologijos palyginamoji filogenetinė analizė



2 dendrograma. IBV padermės *IBV-4*, klasikinių patogeninių padermių *52/70* ir *STC*, virulentinių IBV izoliatų, antigeninių variantų, išskirtų JAV ir kitose šalyse, palyginamoji filogenetinė analizė

Aptarimas ir išvados. Vienas iš perspektyviausių IBV nustatymo metodų, taikomų daugelyje pasaulio šalių – JAV, Japonijos, Anglijos – laboratorijose yra PGR (Cao, et al., 1998; Jackwood, Sommer, 1998; Sellers et al., 1999). Duomenys apie IBV padermių sekas, besiskiriančias savo savybėmis (didelio ir mažo virulentiškumo, atenuotos vakcininės padermės, antigeniniai variantai), leidžia palyginti ir identifikuoti naujai išskirtus viruso izoliatus. Kintamosios geno VP2 dalies palyginamoji analizė leidžia plačiau suprasti filogenetinius įvairių IBV padermių ryšius. Lietuvoje nustatytų IBV padermių *IBV-1*, *IBV-2*, *IBV-3*, *IBV-4* ir kitose šalyse išskirtų IBV padermių filogenetinė analizė leido nustatyti platų genetinių grupių spektrą (1 ir 2 dendrogramos). Apibendrinę pirmosios dendrogramos rezultatus matome, kad padermė *IBV-1* ir vakcininė padermė MB (Izraelis) yra labai artimos. Tuo tarpu padermės *IBV-2* ir *IBV-3* priklauso kitai genetinei grupei, kurią sudaro tokios atenuotos vakcininės padermės kaip *BUR 706* (Prancūzija), *Gumboral* (Prancūzija), *D-78* (Olandija), *Tad 5000* (Vokietija) ir kitos joms genetiškai artimos. Šiai grupei priklausančius nepatogeninius izoliatus išskiria daugelio šalių tyrinėtojai. Manoma todėl, kad šios grupės vakcinės yra plačiai naudojamos paukštynuose.

Padermės *IBV-4* nukleotidų seka nebuvo homologiška vakcininių IBV padermių kintamosios geno VP2 dalies nukleotidų sekoms (1 dendrograma). Lygindami šią padermę su klasikinėmis patogeninėmis padermėmis *52/70* (išskirta D. Britanijoje) ir *STC* (išskirta JAV) antigeniniais variantais, išskirtais JAV, virulentiniais IBV izoliatais, išskirtais Izraelyje, Baltarusijoje, Kaliningrado srityje, Rusijoje ir kitose

šalyse, matome, kad padermės *IBV-4* nukleotidų seka ryškiai skiriasi nuo minėtų IBV padermių. Kaip teigia A. A. van Loon ir bendraautoriai (2002), padermių antigeninius skirtumus apsprendžia aminorūgščių pakitimai kintamojoje geno VP2 dalyje.

Apibendrinami tyrimų duomenis galime daryti tokias išvadas:

1. Palyginę IBV padermių *IBDV-1*, *IBDV-2*, *IBDV-3* ir *IBDV-4* kDNR kintamosios geno VP2 dalies nukleotidų sekas tarpusavyje ir su informaciniame banke esančiomis sekomis nustatėme, kad paukštynuose persistuojančios padermės *IBDV-2* ir *IBDV-3* yra homologiškos Lietuvoje naudotai vakcinai „Gumboral“, o *IBDV-1* – vakcinai „MB“.

2. Tyrimų duomenys parodė, kad virusinė padermė *IBDV-4* pagal kintamosios geno VP2 dalies nukleotidų seką skiriasi nuo vakcininių, klasikinių patogeninių, didelio virulentiškumo IBV padermių, taip pat nuo IBV padermių, išskirtų šalyse, esančiose netoli Lietuvos. Ši padermė yra unikali ir paplitusi tik mūsų šalyje.

Literatūra

1. Aleksėjūnienė I., Aleksėjūnas A., Ščerbakova L., Šilkūnaitė J. Avibirnavirusų identifikacija Fabricijaus maišeliuose. Veterinarija ir zootechnika. Kaunas, 2002. T. 17 (39). 5–7 p.
2. Bayliss C. D., Spies U., Shaw K. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. Journal of General Virology. 1990. Vol. 71. P. 1303–1312.
3. Cao Y. C., Yeung W. S., Law M., Bi Y. Z., Leung F. C., Lim B. L. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical very virulent and variant strains. Avian Diseases. 1998. Vol. 42. P. 340–351.
4. Yamaguchi T., Ogawa M., Miyoshi M. et al. Nucleotide sequence analysis of highly virulent infectious bursal disease virus

genome: Abstract. 25th World Veterinary Congress. Yokohama, Japan, 1995. P. 262.

5. Yehuda H., Pitcowski J., Michael A. et al. Viral protein 1 sequence analysis of three infectious bursal disease virus strains: a very virulent virus, its attenuated form and an attenuated vaccine. *Avian Diseases*. 1999. Vol. 43. P. 55–64.

6. Jackwood D. J., Sommer S. E. Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens. *Avian Diseases*. 1998. Vol. 42. P. 321–339.

7. Kataria R. S., Tiwari A. K., Butchaiah G., Kataria J. M., Skinner M. A. Sequence analysis of the VP2 gene hypervariable region of infectious bursal disease viruses from India. *Avian Pathology*. 2001. Vol. 30. P. 501–507.

8. Lukert P. D., Saif Y. M. Infectious bursal disease. *Diseases of Poultry*. 10th ed. Calnek H.J. et al., Iowa State University Press, Ames, IA. 1997. P. 721–738.

9. Mahadrika I. G. N. K. Untersuchungen über die genetische Grundlage der Antigenverwandtschaft zwischen den beiden Serotypen des Virus der infektiösen Bursitis: Inaug. Diss. Giessen. 1995. S. 123.

10. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties, World Organisation for Animal Health, Paris. 2000. P. 649–655.

11. Mundt E., Beyer J., Müller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *Journal of General Virology*. 1995. Vol. 76. P. 437–443.

12. Sapats S. I., Ignjatovic J. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Archives of Virology*. 2000. Vol. 145. P. 773–783.

13. Sellers H. S., Villegas P. N., Seal B. S., Jackwood D. J. Antigenic and molecular characterization of three infectious bursal disease virus field isolates. *Avian Diseases*. 1999. Vol. 42. P. 198–206.

14. Sharma J. M., Kim I. J., Rautenschlein S., Yeh H. J. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Development and comparative immunology*. 2000. Vol. 24. P. 223–235.

15. Tham K. M., Young L. W., Moon C. D. Detection of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification of the virus segment A gene. *Journal of Virology Methods*. 1995. Vol. 53. P. 201–212.

16. Van den Berg T. P. Acute infectious bursal disease virus in poultry: a review. *Avian Pathology*. 2000. Vol. 29. P. 175–194.

17. Van Loon A. A., De Haas N., Zeyda I., Mundt E. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *Journal of General Virology*. 2002. Vol. 83. P. 121–129.

18. Vervelde L., Davison T. F. Comparison of the *in situ* changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. *Avian Pathology*. 1997. Vol. 26. P. 803–821.

19. Wang X. M., Fu C. Y., Gao H. L., Song X. L., Zeng X. W., Zhang M. F., Lim B. L. Molecular and antigenic characterization of very virulent infectious bursal disease virus strain Gx isolated in China. *Agriculture Science of China*. 2003. Vol. 2. P. 566–572.