

AVIBIRNAVIRUSŲ IDENTIFIKACIJA FABRICIJAUŠ MAIŠELIUOSE

Iłona Aleksėjūnienė¹, Almontas Aleksėjūnas¹, Julija Šilkūnaitė¹, Lidija Ščerbakova²

¹Lietuvos veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-4230 Kaišiadorys, tel. 60689

²Rusijos gyvūnų apsaugos mokslo tyrimų institutas, 600900, Vladimiras, Rusija, tel. (0922) 260614

Santrauka. Gamboro ligos (GL) virusų RNR nustatymui Fabricijaus maišeliuose panaudota polimerazės grandininė reakcija. Kintamos geno VP2 dalies nukleotidų sekos nustatymas bei amplifikuotų kDNR fragmentų tiesioginis sekvenavimas leido nustatyti dviejuose Lietuvos paukštynuose cirkuliuojančius GL virusus. Broilerių Fabricijaus maišeliuose aptiktos vakcininės GL virusų padermės “Gumboral” ir “MB”, kurios naudojamos vakcinacijos programose.

Raktažodžiai: Gamboro liga, polimerazės grandininė reakcija, virusai.

IDENTIFICATION AVIBIRNAVIRUSES IN BURSA OF FABRICIUS

Summary. The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect infectious bursal disease virus (IBDV) in bursa of Fabricius. After investigation of six samples, it was found four positive samples. By comparative analysis of the VP2 variable region of the gene and direct amplification sequence comparison was detected IBDV in two Lithuanian poultry farms. IBDV were found in bursa of Fabricius and were homological with vaccine strains “Gumboral” and “MB”. These vaccines were used in poultry vaccination programs.

Keywords: infectious bursal disease virus, polymerase chain reaction, bursa of Fabricius.

Įvadas. Viena iš aktualiausių paukštininkystės problemų išlieka užkrečiamų ligų gydymas ir profilaktika. Prieš daugelį virusinių ligų sukurtos ir naudojamos efektyvios specifinės profilaktikos priemonės, tačiau nuostolių nepavyksta išvengti. Dėl subklinikinės GL netenkama apie 10% produkcijos [McIlroy S.G. ir kt., 1992]. Pradėjus naudoti vakcinas, pavyko sumažinti patiriamus dėl šios ligos nuostolius [Giambone J.J., 1990; Haddad E.E. ir kt., 1997; Tsukamoto K. ir kt., 1995]. Šiuo metu GL epizootijų nepasitaiko. Tačiau visuose ūkiuose, kur buvo užregistruoti GL atvejai, paukščiai yra vakcinuojami.

GL virusui bei antikūnams nustatyti laboratorijose yra naudojami įvairūs virusologijos metodai: neutralizacijos, difuzinės precipitacijos, netiesioginės hemaglutinacijos reakcijos, imunofluorescencija, imunofermentinė analizė (IFA) ir kt. Sudėtinga epizootinė situacija nulėmė būtinumą tobulinti jau esamus ir išbandyti naujus, efektyvesnius GL diagnozavimo ir profilaktikos metodus. Reikėjo ne tik išskirti virusą, bet ir jį identifikuoti. Viena iš perspektyviausių krypčių, leidžiančių išspręsti šiuos uždavinius yra polimerazės grandininė reakcija (PGR) [Giambone J.J. ir kt., 1994; Jackwood D.J. ir kt., 1994; Tham K.M. ir kt., 1995]. Šiam metodui būdingas didelis jautrumas bei specifiskumas. Panaudojant specifinius pradmenis, nustatomas GL virusas, o atliekant kintamos geno VP2 dalies nukleotidų sekvenavimą - tikslus viruso genomus bei padermę [Heine H.G. ir kt., 1991; Vakharia V.N. ir kt., 1994].

GL sukelia RNR turintis virusas ir priklausantis *Birnaviridae* šeimai, *Avibirnavirus* genčiai [Dobos P. ir kt., 1995; Manual of standards, 2000]. Šio viruso prototipas yra žuvų nekrozinio pankreatito virusas. Kitų šios šeimos virusų galima rasti pas vabzdžius (drosofilų X virusas), bei moliuskus (*tellina* ir *oyster* virusai). GL virusas neturi išorinio lipoproteidinio apvalkalo. Ikosoedrinės formos kapsidė yra nuo 60 iki 70 nm diametro ir sudaryta maždaug iš 132 morfologinių

baltyminių subvienetų [Comps M. ir kt., 1991; Thierry P., 2000]. Virusų genomą sudaro dvigubos RNR du segmentai (A ir B), ir tai yra 9-10% virusinės dalelės masės. A segmentas sudarytas iš 3129 porų nukleotidų, o B segmentas - iš 2795 porų nukleotidų. [Morgan M.M. ir kt., 1988]. Virionas sudarytas iš keturių polipeptidų: VP1 (94 kDa), kuris yra RNR polimerazė; pagrindinis struktūrinis baltymas VP2 (54 kDa), turintis epitopus virusus neutralizuojantiems antikūnams; struktūrinis baltymas VP3 (30 kDa), turintis grupę specifinių antigenų ir VP4 (29 kDa), kuris yra virusinė proteazė. Taip pat yra duomenų apie polipeptidą VP5, kurio funkcija dar nežinoma [Morgan M.M. ir kt., 1988; Kibenge F.S.B. ir kt., 1997; Mundt E. ir kt., 1995]. Kintamos geno VP2 (nuo 750 iki 1180 nukleotidų) dalies, koduojančios konformacinį epitopą, pirminės struktūros palyginamoji analizė yra GL viruso padermės diferenciacijos pagrindas [Jackwood D.J. ir kt., 1998].

Darbo tikslas - PGR metodu nustatyti broilerių Fabricijaus maišeliuose GL virusus; amplifikuotų kDNR fragmentų tiesioginio sekvenavimo metodu nustatyti šių virusų kintamos geno VP2 dalies nukleotidų sekas bei palyginti su jau žinomomis GL virusų padermėmis.

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 veterinarijų reikalavimų” [1998 12 31, Nr. 4-361] ir “Dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams bandymams [1999 01 18, Nr. 4-16]. Tyrimui, iš dviejų Lietuvos paukštynų, buvo atrinkta 20-42 dienų amžiaus broilerių Fabricijaus maišeliai su būdingais GL pakitimais. Maišelių suspensijose GL virusai buvo nustatomi PGR metodu, o kintamai geno VP2 dalies nukleotidų sekai nustatyti buvo naudojamas tiesioginio

sekvenavimo metodas. Tyrimų metu gautos sekos buvo lyginamos su jau žinomomis GL virusų nukleotidų sekomis.

Bendrąją RNR išskyrinėjome iš 200 µl 50% tiriamų Fabricijaus maišelių suspensijos, panaudodami reagentų rinkinį "RNAagents Total RNA Isolation System" (Promega, JAV), pagal pridėdamą instrukciją.

Darbui naudojome šiuos fermentus: paukščių mioblastozės viruso RNR priklausomą DNR polimerazę (Omutninsko chemijos gamykla, Rusija), Taq DNR polimerazę (Promega, JAV), polinukleotidkinazę (Promega, JAV), DNR ligazę T4 (Biotex).

Komplimentarios DNR sintezė

Atvirkštinės transkriptazės reakcijai 10 µl bendrosios RNR tirpalo kaitinome 3 min 96 °C temperatūroje, po to ataušiname ant ledo ir pridėjome reakcijos mišinio, susidedančio iš 2 µl 10 mmol dNTP, 3 µl 10x praskiesto reakcijos buferio (0,5 M Tris-HCl, pH 8,3; 1,4 M KCl; 100 mM MgCl₂, 200 mM β-merkaptetoanolio), 10 vienetų nuo RNR-priklausomos DNR-polimerazės ir po 100 pM išorinių pradmenų (PR1 ir PR4), vandens iki 30 µl tūrio, išmaišėme ir inkubavome 40 min 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos kaitinome 4 min 96 °C temperatūroje ir greit atšaldėme ant ledo.

Komplimentarios DNR amplifikacija

PGR atlikome programuojamame amplifikatoriuje PTC-100 Mini Cycler (MJ Research Inc, JAV). Į 0,5 ml mėgintuvėlį įlašiname 5 µl vienos grandinės kDNR tirpalo, po 100 pM pradmenų, 5 µl 10x PGR buferio (570 mM Tris-HCL, pH 8,3; 160mM (NH₄)₂ SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,1% Tween-20), 3µl 10 mM dNTP, 2 vienetai Taq-polimerazės ir vandens iki galutinio tūrio 50µl, ant viršaus užpylėme 50µl aliejaus, kad neišgaruotų reakcijos mišinys. Reakciją atlikome 2 etapais. Amplifikacija su išorine pora pradmenų (PR1, PR4), 30 ciklų sekančiuose režimuose: 94 °C temperatūroje – 30 s, 55 °C temperatūroje – 30 s, 72 °C temperatūroje - 1 min. Amplifikacijos produktus įvertiname elektroforezės pagalba 2 % agare su 0,01% etidžio bromidu. Jeigu gelyje neišryškėdavo specifinė virusui DNR juosta, atlikdavome antrą amplifikacijos etapą su vidiniais pradmenimis (PR2 ir PR3) tuo pačiu režimu.

Neigiamai kontrolei naudojome sveikų vištų Fabricijaus maišelių suspensiją. Teigiamai kontrolei naudojome iš išgryninto ir koncentruoto GL viruso išskirtą RNR.

PGR produktus gryninome su "Magic™ PCR Preps DNA Purification Kit" reagentų rinkiniu (Promega, JAV).

kDNR sekvenavimas

Kintamos geno VP2 dalies nukleotidų seką nustatėme amplifikuotų segmentų tiesioginio sekvenavimo metodu, panaudojant *fmol* DNA Sequencing System (Promega, JAV) reagentų rinkinį. Nukleotidų analizę ir juos atitinkančių amino rūgščių seką nustatėme panaudojant kompiuterinę programą SeqProgs (Data handling for molecular epidemiology), versija 1.0 (Knowles N.J., IFAN, Didžioji Britanija, 1991).

Tyrimų rezultatai. Polimerazės grandininės reakcijos metodu buvo ištirti šeši broilerių Fabricijaus maišelių

suspensijos mėginiai gauti iš dviejų Lietuvos paukštynų (1 lentelė).

1 lentelė. Fabricijaus maišelių suspensijų tyrimų PGR rezultatai

Mėginio Nr.	Paukštynas	Paukščių amžius (dienomis)	PGR rezultatas
1	A	41	Teig.
2	A	20	Teig.
3	A	42	Neig.
4	B	41	Teig.
5	B	42	Neig.
6	B	43	Teig.

Pastaba: raidėmis A ir B sąlygiškai žymimi konkretūs paukštynai.

Tyrimo metu, agarų gelyje išryškėjo GL virusui specifinės kDNR fragmentai keturiuose mėginiuose, t. y. šiuose mėginiuose buvo nustatytas GL virusas. Dviejuose mėginiuose virusas nustatytas nebuvo. Kad tipizuoti kokiai padermei priklauso šie virusai, atlikome nukleotidų sekvenavimą. Atlikus amplifikuotų kDNR fragmentų tiesioginį sekvenavimą, nustatėme nukleotidų seką kintamoje GL viruso geno VP2 dalyje. Nustatytas nukleotidų sekas palyginome tarpusavyje bei su programos informaciniame banke esančiomis GLV vakcininių padermių nukleotidų sekomis. Palyginimui naudojome šių GLV vakcininių padermių nukleotidų sekas: *MB* (Izraelis), *Bursin* (JAV), *PBG98* (Olandija), *Taviar* (Italija), *LZD228* (Olandija), *Gumboral* (Prancūzija), *Bur706* (Prancūzija), *Tad5000* (Vokietija), *D-78* (Olandija).

"A" paukštyne nustatyta 99,75% homologija su vakcininėmis GL viruso padermėmis "*Gumboral CT*" (Prancūzija) ir "*LZD 228*" (Olandija). "B" paukštyne nustatytų GL virusų homologijos laipsnis, lyginant su vakcinine paderme "*MB*" (Izraelis) taip pat buvo 99,75%.

Rezultatų aptarimas. Lietuvoje GL mažai tyrinėta. Nustatinėjami tik antikūnų prieš GL virusą titrai kraujo serumuose [Aleksėjūnas A. ir kt., 1996; Kaluina V. ir kt., 1999]. Mes ištyrėme broilerių Fabricijaus maišelių suspensijas PGR metodu, nustatėme GL virusus. Nukleotidų sekos kintamojoje geno VR2 dalyje palyginamoji analizė leidžia tiksliai identifikuoti, kokiai padermei priklauso tiriamas virusas. Ši informacija svarbi tais atvejais, kada GL susergera vakcinuoti paukščiai [Tham K.M. ir kt., 1995].

GL viruso kintamojoje geno VP2 dalyje sukaupti didžiausi amino rūgščių skirtumai tarp padermių. Nustatyta, kad padermių antigeninius skirtumus apsprendžia amino rūgščių pakitimai būtent šioje kintamojoje geno VP2 dalyje [Heine H.G. ir kt., 1991; Vakharia V.N. ir kt., 1994]. Be to šiame fragmente yra išsidėstęs pagrindinis konformacinis epitopas virusus neutralizuojantiems antikūnams [Azad A.A. ir kt., 1987]. Vertindami PGR tyrimo rezultatus matome, kad keturiuose iš šešių Fabricijaus bursų suspensijų

mėginiuose buvo nustatyta GL virusui būtinga kDNR, t.y. nustatytas GL virusas. Palyginę nuoseklaus sekvenavimo metodu nustatytas nukleotidų sekas su informacinio banko duomenimis, nustatėme, kad pirmame paukštyne GL virusas pasižymi aukšto laipsnio homologija (99,75%) su vakcininėmis GL virusų padermėmis "Gumboral CT" ir "LZD 228". Šie vakcininiai virusai priklauso grupei giminingų padermių, tarp kurių yra "Bur 706", "PBG 98", "D78", "Tad5000" ir kt. [Scherbakova L.O. ir kt., 1998]. Antrame paukštyne nustatytas GL virusas, kurio homologijos laipsnis buvo 99,75% su vakcinine paderme "MB".

Apibendrinami PGR ir nuoseklaus sekvenavimo metodu nustatytas nukleotidų sekas, matome, kad broilerių Fabricijaus maišeliuose aptiktos vakcininės GL viruso padermės *Gumboral* ir *MB*, kurios buvo arba yra naudojamos vakcinacijos programose.

PGR metodas yra tikslus bei informatyvus nustatant bei tipizuojant GL virusus, tačiau gana brangus. Manome, kad vakcinacijos efektyvumui nustatyti pigiau ir paprasčiau yra naudoti kitus virusologijos metodus. Pvz. IFA metodas yra greitas, pakankamai tikslus bei ekonomiškai [Jackwood D.J. ir kt., 1999; Marquardt W.W. ir kt., 1980; Thayer S.G. ir kt., 1987].

Išvados. 1. PGR metodu keturiuose Fabricijaus maišelių suspensijų mėginiuose buvo nustatytas GL virusas.

2. Tiesioginio sekvenavimo metodu nustatyta tirtų GL virusų 99,75% homologija su vakcininėmis GL viruso padermėmis "Gumboral CT" ir "LZD 228" pirmame paukštyne, o antrame paukštyne – su vakcinine paderme "MB". Šios vakcininės GL virusų padermės yra naudojamos vakcinacijos programose.

Literatūra

- Aleksėjūnas A., Aleksėjūnienė I., Kaženiauskas E., Remeikis A. V. Aktualiausių paukščių virusinių ligų serologiniai tyrimai Lietuvoje. Lietuvos veterinarijos instituto biuletenis. Kaišiadorys. 1996. P. 18–22.
- Azad A.A., Jagadish M.N., Brown M.A., Hudson P.J. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*. 1987. V. 161. P. 145-152.
- Comps M., Mori J., Poisson F., Bonami J.R. Biophysical and biochemical properties of the RBV, and unusual birnavirus pathogenic for rotifers. *Journal of General Virology*. 1991. V. 72. P. 1229-1236.
- Dobos P., Berthiaume L., Leong J.A., Kibenge F.S.B., Muller H., Nicholson B.L. Family Birnaviridae. In *Virus Taxonomy*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. by Murphy F. A. et al. Vienna & New York. Springer-Verlag, 1995. P.240-244
- Giambone J.J., Liu H.J., Dormitorio T. Genetic variation in infectious bursal disease virus using restriction fragment length polymorphism and sequence comparisons of polymerase chain reaction generated cDNA. *Int. Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*. Rauschholzhausen, Germany, 1994. P. 71-82.
- Giambone J.J. Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*. 1990. V. 34. P. 7-11.
- Haddad E.E., Whitfill C.E., Avakian A.P., et. al. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Diseases*. 1997. V. 41. N. 4. P. 882-891.
- Heine H.G., Haritov M., Failla P., et al. *Journal of General Virology*. 1991. V. 72. P. 1835-1843.
- Jackwood D.J., Jackwood R.J. Infectious bursal disease viruses: Molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 virus. *Avian Diseases*. 1994. V. 38. P. 531- 537.
- Jackwood, D. J., S.E. Sommer, and E. Odor. Correlation of enzyme-linked immunosorbent assay titers with protection against infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*. 1999. V. 43. P. 189-197.
- Kaluina V., Tamošiūnas V., Ščerbavičius R., Kaženiauskas E., V. Remeikis V., J. Štugždaitė J., K. Lukauskas K., Milius J. Paukštyų epizootinės būklės tyrimai: įvairių rūšių virusų antikūnų vištų organizme analizė. *Veterinarija ir zootechnika*. Kaunas: Candela, 1999. T. 7 (29). P.12-21.
- Kibenge F. S. B., Qian B., Cleghorn J. R. & Martin C. K. Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Archives of Virology*. 1997. V. 142. P. 2401-2419.
- Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties, World Organisation for Animal Health. Paris. 2000. P. 723.
- Marquardt, W.W., Jonson R.B., Odenwald W.F and Schlotthober B.A. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*. 1980. V. 24. P. 375-385.
- McIlroy S.G., Goodall E.A., Bruce D.W., McCracken R.M., McNulty M.S. The cost benefit of vaccinating broiler flocks against subclinical infectious bursal disease. *Avian Pathology*. 1992. V. 21. P. 65–76.
- Morgan M.M., Macreadie I.G., Harley V.R., et. al. Sequence of the small double – stranded RNR genomic segment of infectious bursal disease virus and deduced 90- kD product. *Virology*. 1988. V. 163. P. 240-242.
- Mundt E., Beyer J., Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus – infected cells. *Journal of General Virology*. 1995. V. 76. P. 437-443.
- Scherbakova L.O., Lomakin A.I., Borisov A.V., Drygin V.V., Gusev A.A. Comparative analysis of the VP2 variable region of the gene from infectious bursal disease virus isolate. *Molecular Genetics, Mikrobiology and Virology*. 1998. N1. P. 35-40.
- 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 Virological Methods*. 1995. V. 53. P. 201-212.
- Thayer, S.G., Villegas, and Fletcher O.J. Comparison of two commercial enzyme-lined immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. *Avian Diseases*. 1987. V. 31. P. 120-124.
- Thierry P. van den Berg. Acute infectious bursal disease in poultry : a review. *Avian Pathology*. 2000. V. 29. P. 175-194.
- Tsukamoto K., Tanimura N., Kakita S., et. al. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. *Avian Diseases*. 1995. V. 39. N2. P. 218-247.
- Vakharia V. N., He J., Ahamed B., Snyder B.D. Molecular basis of antigenic variation in IBDV. *Virus Research*. 1994. V. 31. P. 265-273