

# Идентификация вируса инфекционной бурсальной болезни с использованием молекулярно-биологического метода

Анна Николаевна Семина, Константин Юрьевич Дмитриев

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП»)

**Аннотация:** Вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ) вызывает одно из наиболее важных иммунодепрессивных заболеваний у цыплят, приводящее к высоким экономическим потерям в связи с увеличением смертности и выбраковки, нарастающей иммуносупрессией, на фоне которой развиваются вторичные вирусные и бактериальные инфекции. Особое внимание заслуживает диагностика данного заболевания, так как эффективность вакцинации зависит от быстрой и точной идентификации штамма вируса, циркулирующего в хозяйстве, поскольку вакцины, имеющие в своем составе классический штамм вируса ИББ, могут не защитить от заражения вариантным штаммом. Одним из таких способов диагностики является молекулярно-биологический метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Целью нашей работы была разработка уникальных образцов олигонуклеотидных последовательностей праймеров, специфичных к возбудителю ИББ, которые идентифицируют данного возбудителя в кратчайшие сроки. С использованием вакцинного штамма вируса ИББ были подобраны условия для проведения ПЦР по составу ПЦР-смеси и по температуре отжига праймеров. При проведении ПЦР мы регистрировали образующейся в геле фрагмент длиной 268 п.н., что свидетельствует о наличии кДНК вируса ИББ в исследуемом материале. Специфичность разработанных праймеров оценивали с помощью online-алгоритма BLAST, который показал отсутствие гомологии выбранных последовательностей с другими нецелевыми патогенами. Подобренные нами праймеры позволяют идентифицировать вирус ИББ в исследуемом материале.

**Ключевые слова:** вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ), птица, полимеразная цепная реакция (ПЦР), праймеры, олигонуклеотиды.

**Для цитирования:** Семина, А.Н. Идентификация вируса инфекционной бурсальной болезни с использованием молекулярно-биологического метода / А.Н. Семина, К.Ю. Дмитриев // Птицеводство. – 2023. – №11. – С. 88-92.

**doi:** 10.33845/0033-3239-2023-72-11-88-92

**Введение.** Особое место среди множества различных факторов, негативно влияющих на здоровье птицепоголовья, занимают инфекционные заболевания, вызывающие иммунодепрессивные состояния [1-4]. Одним из таких заболеваний является инфекционная бурсальная болезнь (ИББ). За последние годы исследовательский интерес к этому заболеванию значительно возрос и направлен, прежде всего, на совершенствование профилактических мер, а также методов диагностики.

Вирус инфекционной бурсальной болезни (IBDV) вызывает

острую и высококонтагиозную инфекционную болезнь, характеризующуюся тяжелой иммуносупрессией, что приводит к повышенной восприимчивости к другим патогенам или даже к гибели [5]. Хотя существует два серотипа IBDV, только серотип I вызывает заболевание у кур. Серотип II был выделен от индеек и не является патогенным для цыплят. В естественных условиях IBDV может заражать все породы кур, нанося огромный экономический ущерб птицеводству во всем мире [6].

Благодаря уникальной бисегментированной двухцепочечной

РНК и высокой частоте ошибок вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) IBDV естественным образом склонен к высокой степени геномной мутации или рекомбинации, что приводит к появлению и распространению новых мутантных или рекомбинантных штаммов у кур [7]. Было идентифицировано несколько основных патогенных штаммов IBDV, в т.ч. классический IBDV (cIBDV), вариантный IBDV (varIBDV), высоковирулентный IBDV (vvIBDV), низковирулентный IBDV и новый вариантный IBDV (nVarIBDV), которые различаются по патогенности



**Таблица 1. Последовательности праймеров IBDV**

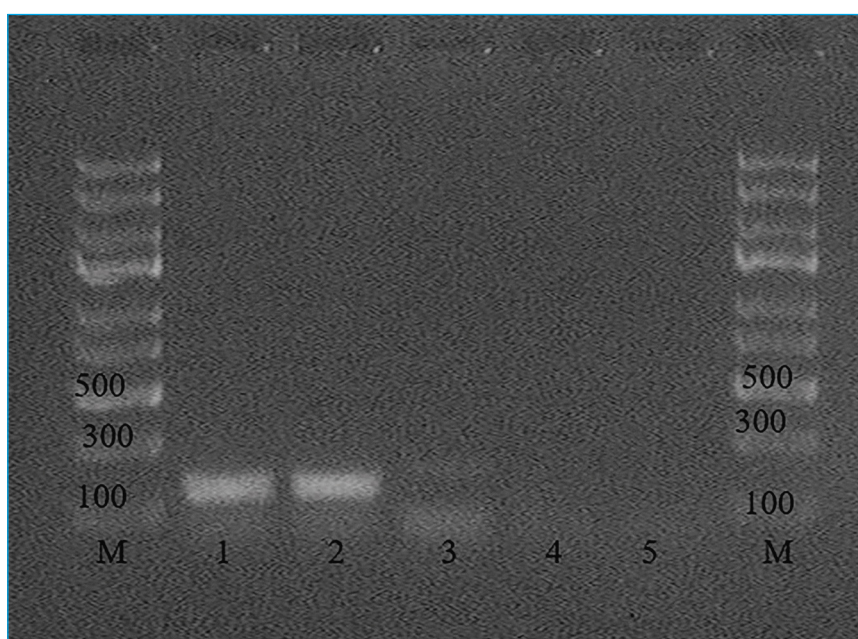
Название праймера	Последовательность	Размер ампликона, п.н.
Burs F	CCTTCTGATGCCAACACCG	268
BursRpraviln	AGCACCCACAATTGAGCCAG	

**Таблица 2. Режим амплификации со специфическими праймерами для IBDV**

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	5 мин	1
95	20 сек	39
58	35 сек	
72	20 сек	
72	3 мин	1

и антигенности [8]. Недавно было предложено несколько усовершенствованных схем генотипирования, которые значительно облегчили бы молекулярно-генетическое исследование IBDV [8-10]. В качестве генетических маркеров вируса ИББ могут выступать фрагменты гена IBDV из сегмента А и сегмента В. VP2 является вирусным капсидным белком и основным защитным антигеном IBDV. Гипервариабельная область (HVR) VP2 (аминокислоты 206-350) представляет собой фрагмент, характеризующий генный сегмент А, который широко используется в анализе генетической эволюции IBDV. Сегмент В кодирует только белок VP1 с активностью RdRp. Подобно HVR VP2, В-маркер VP1 (аминокислоты 110-252) является фрагментом, представляющим генные характеристики сегмента В [11].

Целью наших исследований явилась подборка и разработка высокоспецифичных олигонуклеотидных последовательностей, которые позволяют выявлять вирус ИББ из различного биологического материала с помощью молекулярно-биологического метода. Разработка данных праймеров проводилась с учетом возможных генетических модификаций



**Рис. 1.** Результаты электрофореза продуктов амплификации фрагмента генома вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV). 1, 2 – пробы, содержащие кДНК IBDV; 3, 4 – отрицательные пробы; 5 – отрицательный контроль выделения; М – маркер молекулярной массы.

вируса и была направлена на поиск наиболее видоспецифичного детектируемого участка.

**Материал и методика исследований.** Работа выполнялась в 2023 г. в отделе диагностики и эпизоотологического анализа ВНИВИП.

Для визуализации и множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей из базы данных NCBI были получены сиквенсы генов для возбудителя ИББ. С помощью программы

MEGA 7.0 проведено выравнивание сиквенсов идентичных фрагментов.

При проведении анализа вторичных структур и возможной неспецифической гибридизации использовали PrimerBlast. Специфичность выбранных олигонуклеотидов оценивали путем сравнения их последовательностей с последовательностями ДНК, представленными в базе данных GenBank. Подобранные олигонуклеотиды для IBDV синтезировали на ЗАО Евроген.



Для первичных испытаний олигонуклеотидных последовательностей был использован вакцинный штамм «ВНИВИП» против ИББ. Выделение нуклеиновых кислот из вакцинного штамма проводили с помощью коммерческих наборов «РИБО-сорб» (Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе «ТЕРЦИК». Для проведения реакции в отдельной пробирке емкостью 0,6 см<sup>3</sup> вносили 5 мкл ПЦР-смеси ScreenMix с Taq ДНК-полимеразой, по 1 мкл прямого и обратного праймера и 13 мкл деионизованной воды. Затем в одну пробирку вносили 10 мкл отрицательного контрольного образца, в остальные – по 10 мкл ДНК исследуемых образцов. На поверхность водной фазы наносили по капле минерального масла. Образцы помещали в термоциклер, в котором устанавливался соответствующий температурный режим.

С целью дальнейшего диагностирования образовавшихся в процессе амплификации фрагментов кДНК IBDV использовали метод электрофореза. Учет результатов, полученных в ходе электрофореза, проводился с помощью специальной гельдокументирующей системы. Чтобы определить размер фрагмента ДНК, полученного в ходе реакции, применялись стандартные маркеры. Ис-

пользование данных маркеров позволяет определить количество пар нуклеотидных последовательностей, содержащихся в исследуемом образце.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для дизайна видоспецифичных праймеров были использованы нуклеотидные последовательности, депонированные в банке данных NCBI. С целью выявления внутривидового полиморфизма в области расположения диагностических праймеров, с помощью программы FASTA и BLAST были созданы последовательности из групп олигонуклеотидных последовательностей, относящихся к определенному виду вируса. Затем был проведен сравнительный биоинформатический анализ полученных последовательностей между собой. При анализе полученных данных были выбраны наиболее консервативные для детектируемого вида участки. На их основе были подобраны видоспецифичные праймеры для проведения ПЦР (табл. 1).

Одним из этапов в процессе разработки ПЦР методики являлась экспериментальная оценка диапазона температуры отжига используемых праймеров. В качестве ДНК-матрицы использовали минимально детектируемую точку разведения экстракта ДНК. В резуль-

тате исследований была определена оптимальная температура для IBDV, равная 58°C (табл. 2).

Результаты амплификации показали, что о наличии кДНК IBDV в исследуемом материале свидетельствует образующаяся в геле фрагмент длиной 268 п.н. (рис. 1). С целью исключения ошибочного результата начиная с этапа выделения ДНК ставился отрицательный контроль реакции.

**Заключение.** Специфический, быстрый и простой метод обнаружения важен для ранней диагностики, профилактики и контроля IBDV. В этом исследовании были разработаны образцы уникальных олигонуклеотидных последовательностей праймеров, специфичных к возбудителю ИББ. Мы использовали ПЦР для выявления IBDV, так как она является одним из наиболее современных и точных методов диагностики. ПЦР представляет большой потенциал для достоверной молекулярной диагностики IBDV у птицы. Подобранные нами праймеры позволяют идентифицировать возбудителя ИББ в любом биологическом материале и могут использоваться в ветеринарных лабораториях с целью диагностики данного заболевания.

**Исследования проведены по госзаданию №122031400-337-6.**

### Литература / References

1. Абгарян, С.Р. Диагностика метапневмовирусной инфекции птиц с применением мультиплексной ПЦР / С.Р. Абгарян, С.В. Панкратов, А.Н. Семина // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. - 2022. - №4. - С. 42-45. doi: 10.52419/issn2782-6252.2022.4.42
2. Панкратов, С.В. Метапневмовирусная инфекция птиц / С.В. Панкратов, С.Р. Абгарян // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. - 2022. - №3. - С. 36-39. doi: 10.52419/issn2782-6252.2022.3.36
3. Панкратов, С.В. Современные подходы в диагностике пастереллеза птиц / С.В. Панкратов, С.Р. Абгарян // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. - 2022. - №4. - С. 68-71. doi: 10.52419/issn2782-6252.2022.4.68



4. Дмитриева, М.Е. Молекулярно-генетическая диагностика инфекционного бронхита кур / М.Е. Дмитриева, С.П. Абгарян // Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве: Мат. XVII Междунар. конф. ВНАП, Сергиев Посад, 15-17 мая 2012 г. - Сергиев Посад, 2012. - С. 529-530.
5. Dmitrieva, M.E. Biological properties of infectious bursal disease virus / M.E. Dmitrieva, A.S. Dubovoi, V.A. Manuvera, V.N. Lazarev, D.A. Shirokov // Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. - 2018. - V. 9. - No 6. - P. 1891-1896.
6. Nooruzzaman, M. Comparative pathogenicity of infectious bursal disease viruses of three different genotypes / M. Nooruzzaman, I. Hossain, M.M. Rahman, A.J. Uddin, A. Mustari, R. Parvin, E.H. Chowdhury, M.R. Islam // Microb. Pathog. - 2022. - V. 169. - P. 105641. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105641
7. Mahgoub, H.A. An overview of infectious bursal disease / H.A. Mahgoub, M. Bailey, P. Kaiser // Arch. Virol. - 2012. - V. 157. - No 11. - P. 2047-2057. doi: 10.1007/s00705-012-1377-9
8. Islam, M.R. A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments / M.R. Islam, M. Nooruzzaman, T. Rahman, T.T. Mumu, M.M. Rahman, E.H. Chowdhury, N. Eterradossi, H. Myller // Avian Pathol. - 2021. - V. 50. - No 2. - P. 190-206. doi: 10.1080/03079457.2021.1873245
9. Shirokov, D.A. Complete genome sequence of a novel very virulent strain of infectious bursal disease virus circulating in Russia / D.A. Shirokov, A.S. Dubovoi, V.A. Manuvera, G.N. Samuseva, M.E. Dmitrieva, V.N. Lazarev // Microbiol. Resour. Announc. - 2018. - V. 7. - No 20. - P. e01084-e01118. doi: 10.1128/MRA.01084-18
10. Абгарян, С.П. Молекулярно-биологические методы диагностики болезней птиц / С.П. Абгарян // Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики: Мат. Междунар. науч.-практ. конф., посв. 100-летию со дня рожд. проф. В.В. Рудакова, Санкт-Петербург, 25-26 мая 2023 г. - Санкт-Петербургский гос. ун-т вет. медицины, 2023. - С. 3-5.
11. Shirokov, D.A. A new approach to the production of immunodominant epitopes of VP2 protein of infectious bursal disease virus / D.A. Shirokov, V.A. Manuvera, A.S. Dubovoi, O.A. Miroshina, G.N. Samuseva, M.E. Dmitrieva, V.N. Lazarev // FEBS J. - 2017. - V. 284. - Suppl. 1. - P. 129. doi: 10.1111/febs.14174

#### Сведения об авторах:

**Семина А.Н.:** кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник - зав. отделом диагностики и эпизоотологического анализа; anna14.05@mail.ru. **Дмитриев К.Ю.:** кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник отдела диагностики и эпизоотологического анализа; vniyip.dmitriev-18@yandex.ru. Статья поступила в редакцию 02.09.2023; одобрена после рецензирования 11.10.2023; принята к публикации 25.10.2023.

#### Research article

**Anna N. Semina, Konstantin Y. Dmitriev**

Ilya M. Biryukov, Ekaterina A. Simonova

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science - branch of the Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry"

**Abstract.** *Infectious bursal disease virus (IBDV) is a causative agent of one of the most important immunosuppressive diseases in young chicks resulting in substantial economic losses due to increased mortality + culling rates and increasing immunosuppression leading, in turn, to the activation of the secondary viral and bacterial infections. The effectiveness of vaccination against this disease depends on the rapid and accurate identification of the virus strain circulating in a farm since vaccines containing the "classic" strain of the IBDV may not protect against infection(s) with the variant strain(s). Therefore, the exact on-farm diagnostication of the circulating viral strain(s) plays an important role in the prevention of the disease, and polymerase chain reaction (PCR) can be an effective diagnostic instrument. Our study was aimed at the development of primers with oligonucleotide sequences highly specific to the IBDV allowing for the exact and prompt identification of the pathogen. Using a*



vaccine strain against the IBD the optimal conditions for PCR were developed (composition of the PCR mixture and the annealing temperature of the primers). PCR resulted in a 268 bp fragment identified in the gel which indicates the presence of IBDV cDNA. The specificity of the primers developed assessed by the online BLAST algorithm evidenced the absence of homology of the selected sequences with other non-target pathogens. It was concluded that the primers developed can be effectively used for the lab detection of IBDV.

**Keywords:** virus of infectious bursal disease (IBDV), poultry, polymerase chain reaction (PCR), primers, oligonucleotides.

**For Citation:** Semina A.N., Dmitriev K.Y. (2023) Identification of the infectious bursal disease virus by a molecular biological method. *Ptitsevodstvo*, 72(11): **88-92**. (in Russ.)

**doi:** 10.33845/0033-3239-2023-72-11-88-92

(For references see above)

#### Authors:

**Semina A.N.:** Cand. of Vet. Sci., Lead Research Officer, Head of Dept. of Diagnostics and Epizootological Analysis; anna14.05@mail.ru. **Dmitriev K.Y.:** Cand. of Vet. Sci., Junior Research Officer, Dept. of Diagnostics and Epizootological Analysis; vnivip.dmitriev-18@yandex.ru.

Submitted 02.09.2023; revised 11.10.2023; accepted 25.10.2023.

© Семина А.Н., Дмитриев К.Ю., 2023