

**Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені
Тараса Шевченка**

ПАСТИРЯ АННА СЕРГІЇВНА

УДК: 575.52+616-079.4

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ВИЯВЛЕНИХ В УКРАЇНІ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ
ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ**

03.00.06 – вірусологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Будзанівська Ірина Генадіївна
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса Шевченка,
завідувач кафедри вірусології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Матвієнко Наталія Миколаївна,
Інститут рибного господарства НААН,
завідувач відділу іхтіопатології

кандидат біологічних наук, старший дослідник
Загородня Світлана Дмитрівна,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України,
завідувач відділу репродукції вірусів

Захист відбудеться 15 жовтня 2019 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03127, м. Київ, проспект академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, спеціалізована вчена рада Д 26.001.14.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий «13» вересня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

 В.В. Джаган

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вірус інфекційної бурсальної хвороби (ВІБХ) поширений у більшості країн, що спеціалізуються на промисловому вирощуванні курей. Вірус ІБХ належить до родини *Birnaviridae*, роду *Avibirnavirus* (Berg et. al., 2000). Він уражує курчат 2-7 тижневого віку та призводить до патологій, що коливаються від імуносупресивного стану до загибелі. Особливо актуальною проблема ІБХ стала в 90-х роках ХХ століття у зв'язку з появою в Європі та Азії високовірулентних штамів вірусу ІБХ, інфікування якими призводило до високої смертності птахів, що складала до 70% стада. На сьогодні ІБХ зареєстрована в усіх країнах світу. Дані досліджень Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин вказують на те, що зараженість стад коливається в межах 2-100%. Постійний імпорт птиці сприяє розповсюдженню вірусу в птахівництві промислового спрямування (ОІЕ, 2008).

В Україні появу високовірулентних штамів вірусу інфекційної бурсальної хвороби було зареєстровано в 1991 р. (Рула, 2012). Оскільки цільовим органом вірусу є bursa Фабріціуса (основний лімфоїдний орган птахів), окрім значної смертності, інфекційна бурсальна хвороба супроводжується тяжкою імуносупресією, внаслідок чого підвищується чутливість птахів до інших збудників (Sharma, 2000).

Вірус ІБХ характеризується значною штамовою різноманітністю, що пов'язана в першу чергу із мутаціями у гіперваріабельному регіоні гену VP2, що кодує основний капсидний білок вірусу. Протеїн VP2 містить антигенні детермінанти, які визначають серотип вірусу. Нині описано 2 серотипи вірусу ІБХ. До першого серотипу належать віруси, що викликають хворобу у курчат, а до другого - авірулентні штами. За рівнем вірулентності представників першого серотипу розподіляють на класичні, варіантні та високовірулентні штами (Jackwood et. al., 2007). Основним методом профілактики ІБХ є вакцинація за допомогою живих атенуєваних вакцин. Вакцинні штами відрізняються за рівнем залишкової вірулентності та розділяються на «м'які», «середні» та «середні-плюс». Ефективність вакцинації напряму залежить від ступеню генетичної спорідненості вакцинного штаму до польового ізоляту, що циркулює у птахів у господарстві (Muller et. al., 2012). Тому, зважаючи на велику різноманітність вакцинних штамів, для проведення ефективної вакцинації необхідно здійснювати молекулярний аналіз штамів вірусу ІБХ, поширених у місцях промислового вирощування птиці.

З огляду на високу варіабельність вірусу в останні роки було розроблено молекулярно-біологічні підходи до характеристики вірусу ІБХ, що включають рестрикційний аналіз та секвенування (Jackwood et. al., 2012). Втім, даних із приводу характеристики високовірулентних штамів вірусу, поширених на території України, опубліковано не було. Для забезпечення ефективних заходів профілактики захворювання необхідним є вивчення розповсюдження та молекулярно-біологічних особливостей вірусу ІБХ в Україні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах технічного завдання держбюджетної теми

№11БФ 036-02, «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо-, та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, № державної реєстрації 0111U00464.

Мета і завдання досліджень. Виявити та ідентифікувати ізоляти вірусу інфекційної бурсальної хвороби, поширені на території України та провести їх молекулярно-біологічний аналіз для розробки актуальних програм вакцинації.

Для вирішення поставленої мети було сформульовано такі завдання:

- 1) Здійснити серологічний скринінг вірусу інфекційної бурсальної хвороби в різних регіонах України.
- 2) Виявити вірус ІБХ у тканинах фабрицієвої сумки уражених курей та комерційних вакцинах інфекційної бурсальної хвороби, використовуючи підібрані праймери до гіперваріабельного регіону гену VP2, за допомогою ЗТ-ПЛР.
- 3) Провести гістологічний аналіз тканин бурс вакцинованих та інфікованих птахів для встановлення наявності патологічних змін, характерних для інфекційного процесу, викликаного вірусом ІБХ.
- 4) Диференціювати виявлені штами вірусу ІБХ за допомогою рестрикційного аналізу.
- 5) Визначити нуклеотидну послідовність ділянки гену VP2 виявлених ізолятів, що за рестрикційним профілем подібні до польових штамів вірусу.
- 6) Філогенетично проаналізувати нуклеотидні послідовності hvVP2 польових та вакцинних штамів вірусу ІБХ.
- 7) Провести аналіз амінокислотних послідовностей білку VP2 референтних штамів вірусу ІБХ та ізолятів виявлених на території України.

Об'єкт дослідження: ізоляти вірусу ІБХ, виділені зі зразків органів уражених курей, а також із комерційних вакцин, зареєстрованих в Україні.

Предмет дослідження: молекулярно-біологічна характеристика ізолятів вірусу ІБХ, що циркулюють в Україні, філогенетичний аналіз вірусу ІБХ.

Методи дослідження. У роботі застосовували вірусологічні, серологічні, молекулярно-біологічні, гістологічні, філогенетичні, статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. За результатами серологічного моніторингу вперше показано широке розповсюдження вірусу ІБХ в господарствах України. Проведений аналіз поширеності вірусу ІБХ серед птахофабрик України. Виявлено ізоляти вірусу ІБХ в зразках бурс уражених курей, досліджено молекулярно-біологічні властивості цих ізолятів, зроблений їх філогенетичний аналіз.

Завдяки проведенню валідації праймерів, підібраних для виявлення вірусу ІБХ в клінічних зразках, доведено їх чутливість та специфічність, що дозволяє використовувати їх в діагностичних цілях.

Охарактеризовано специфічні молекулярні маркери, що відрізняють польові штами вірусу від вакцинних, а саме, наявність сайту рестрикції *SspI* та відсутність сайту *BstEII* у високовірулентних штамів вірусу ІБХ. Вперше

доведено циркуляцію високовірулентних штамів вірусу ІБХ в Україні.

Встановлено філогенетичні зв'язки, а також проведено порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей гіперваріабельного регіону VP2 польових ізолятів та вакцинних штамів вірусу ІБХ, що розповсюджені в Україні. Отримані результати є науковим підґрунтям для вдосконалення впровадженої системи епідеміологічного та вірусологічного нагляду за інфекційною бурсальною хворобою в Україні.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати молекулярно-біологічної характеристики вірусу ІБХ, що циркулює в Україні, забезпечують необхідною інформацією для вдосконалення існуючих методів діагностики та впровадження комплексних підходів до профілактики захворювання.

Валідовані праймери для детекції гіперваріабельного регіону гену VP2 методом гніздової ПЛР забезпечать можливість сучасної та ефективної діагностики збудника. Крім цього, ампліфікований фрагмент містить діагностичні мутації, за якими можна здійснювати рестрикційний аналіз для типування штамів вірусу. Секвенування даного фрагменту дає можливість здійснювати філогенетичний аналіз в рутинній діагностиці ІБХ для впровадження ефективніших засобів профілактики та заходів біобезпеки, з метою покращення контролю ситуації з ІБХ в місцях промислового вирощування птиці.

Охарактеризовано зміни в тканинах бурси птахів, уражених вірусом ІБХ, та досліджені відмінності цих змін від таких, що відбуваються на фоні вакцинопрофілактики. Отримані дані дають можливість використовувати гістологічний методу для диференційної діагностики ІБХ та встановлення різниці між постінфекційними та поствакцинальними наслідками впливу вірусу на бурсу Фабріціуса.

Результати досліджень використані для розробки комплексного підходу до діагностики вірусу ІБХ та впроваджені в протокол роботи ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» (м. Київ), в якому проводиться діагностика вірусних та бактеріальних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці по всій території України.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Розробка плану експерименту та її реалізація, отримання експериментальних даних, їх узагальнення, інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом проф. І.Г. Будзанівської.

Автором проаналізовано поширення вірусу ІБХ на території України за період 2014 по 2016 рр.

Валідація праймерів для виявлення гіперваріабельного регіону гену VP2 вірусу ІБХ, лабораторна диференційна діагностика ІБХ методом ПЛР, рестрикційного аналізу та гістологічне дослідження були проведені у Центрі ветеринарної діагностики самостійно під керівництвом директора Собко І.О. Аналіз отриманих даних здійснювався під керівництвом д.б.н., професора Поліщука В.П.

Філогенетичний аналіз вірусів, що циркулюють в Україні, проведений автором особисто на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом наукового керівника д.б.н., професора Будзанівської І.Г.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на засіданні кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (що півроку); XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Шевченківська весна: Біологічні науки» (Київ, 6-8 квітня 2016); VIII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, 10-13 вересня 2016); Конгресі всесвітньої ветеринарної асоціації птахівників - WVPA Congress 2017 (Единбург, 4-8 вересня 2017); XV з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (ТМУ) (Одеса, 11-15 вересня 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 наукових праць у фахових наукових виданнях (2 мають індекс цитування) та 4 тез наукових конференцій (2 – міжнародні).

Структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 142 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, 4 розділів власних досліджень та їх обговорення, узагальнень результатів та висновків. Список літератури включає 166 джерел. Дисертація ілюстрована 27 рисунками та 10 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури складається з 7-ми підрозділів, де наведено найбільш актуальні відомості про вірус ІБХ, особливості його структурної та геномної організації, генетичні передумови штамового різноманіття, механізми патогенезу та поширення в світі. Крім того, охарактеризовано клінічні прояви інфекційної бурсальної хвороби, сучасні методи її діагностики та описано різноманітність вакцин проти вірусу ІБХ. Огляд літератури обґрунтовує доцільність виконання роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були ізоляти вірусу ІБХ, виділені зі зразків органів курей, отримані з 16 спеціалізованих господарств та 10 областей України.

Робота виконувалась у лабораторії молекулярної діагностики, гістології, та патанатомії ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» та на кафедрі вірусології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для виявлення вірусу використовували матеріал від птахів віком від 5 до 48 днів з клінічними ознаками інфекційної бурсальної хвороби. Як об'єкт порівняння використовували вакцинні референс-штами вірусу інфекційної бурсальної хвороби, що входять до складу вакцин проти ІБХ, зареєстрованих в Україні, а саме «Поліmun ІБХ», «Поліmun ІБХ+», «Поліmun ІБХ Лайт» (Біотестлаб, Україна), «Хіпрагамборо» (Hipra, Іспанія), «Avipro Precise» (Lohmann Animal Health GmbH, Німеччина).

Аналіз морфолого-патологічного стану птахів, взятих для дослідження, проводили у лабораторії патолого-анатомії Центру Ветеринарної Діагностики з

метою виявлення і опису зовнішніх ознак захворювання. Для детекції антитіл до вірусу ІБХ використовували метод непрямого імуноферментного аналізу, який здійснювали за допомогою комерційного тест-набору IDEXX IBD Ab Test (IDEEEX, США) відповідно до інструкції виробника.

Для виявлення генетичного матеріалу вірусу інфекційної бурсальної хвороби у зразках тканин відібраних органів, проводили підбір праймерів до консервативних ділянок гену VP2 із використанням пакету програм Vector NTI Advanced 11 (Invitrogen, США). За допомогою вказаних комп'ютерних програм проводили аналіз та вирівнювання доступних у GenBank нуклеотидних послідовностей геномів штамів вірусу інфекційної бурсальної хвороби. Праймери підбирали до послідовностей гену VP2, аналізуючи їх положення та рівень гомології до матриці, для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Виділення нуклеїнових кислот здійснювали за допомогою двох наборів реагентів для ручного «Рибо-сорб» (Амплісенс, Росія) та автоматичного виділення ДНК та РНК «MagVet Universal Isolation Kit», (VetMax, США).

Для отримання комплементарної ДНК на матриці вірусної геномної РНК після виділення нуклеїнових кислот із патологічного матеріалу проводили реакцію зворотної транскрипції. Для цього використовували набір реагентів «Реверта-L», (Амплісенс, Росія).

Рестрикційний аналіз ампліконів кДНК гену VP2 проводили із використанням ендонуклеаз рестрикції *BstEII*, *MboI*, *SacI*, *BspMI*, *MvaI*, *SspI*, сайти розпізнавання яких та їх положення у геномі вірусу ІБХ визначали із використанням пакету програм Vector NTI Advanced 11 (Invitrogen, США).

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації та аналіз рестрикційних фрагментів здійснювали у 1,5 % агарозному гелі.

Для секвенування 552-нуклеотидного фрагменту гену VP2 продукт другого етапу ампліфікації очищували з агарозного гелю за допомогою набору реагентів «mi-Gel Extraction Kit» (Thermo, США).

Секвенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на приладі Applied Biosystems 3730x 1 DNA Analyzer із використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, США).

Для гістологічного дослідження відбирали зразки бурс Фабріціуса без ознак автолізу, що не підлягали замороженню. Відібрані зразки тканин поміщали у 10% розчин формальдегіду з подальшою фіксацією у серії розчинів спиртів. Гістологічні препарати виготовляли за стандартною методикою (Горальський, 2005). Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Зміни виявляли аналізуючи препарати під світловим мікроскопом за збільшення в 100, 200 та 400 разів.

Пошук та вибірку необхідних послідовностей здійснювали використовуючи BLAST (Basic Local Aligment Search Tool). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою алгоритму ClustalW, а філогенетичний аналіз – за допомогою програмних пакетів MEGA 6.0. Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп аналіз (bootstrep) із 1000 бутстреп реплікаціями. Філогенетичні дерева конструювали методом NJ (найближчих сусідів). Філогенетичні дерева були візуалізовані за допомогою

TREEVIEW.

Статистичну обробку результатів здійснювали, використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Excel 2010 із врахуванням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серологічний моніторинг поширення вірусу ІБХ. Впродовж дослідження з 2014 по 2016 рр. нами було проаналізовано 20126 зразків сироватки крові відібраних від курей, вік яких становив від 1 до 506 днів. Антитіла до вірусу ІБХ були виявлені у 19236 зразках із усіх проаналізованих господарств та областей України. Ці дані вказують на значне поширення вірусу ІБХ в Україні та неблагополучну епізоотичну ситуацію за цим захворюванням у більшості регіонах (табл. 1).

Таблиця 1

Результати виявлення антитіл до вірусу ІБХ у зразках сироватки крові курей (за даними лабораторії серології ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики»)

Область	Кількість обстежених господарств	Кількість досліджених сироваток крові			Відсоток позитивних зразків
		всього	негативні	позитивні	
Вінницька	5	447	3	444	99,33
Волинська	1	20	0	20	100
Дніпропетровська	4	472	60	412	87,29
Донецька	2	179	0	179	100
Житомирська	1	20	0	20	100
Запорізька	4	474	14	460	94,05
Київська	21	10321	577	9744	94,4
Кіровоградська	1	24	1	23	95,83
Львівська	7	1975	39	1936	98,03
Одеська	5	126	1	125	99,21
Полтавська	1	12	0	12	100
Рівненська	2	548	7	541	98,72
Сумська	1	100	0	100	100
Тернопільська	3	639	5	634	99,22
Харківська	3	150	9	141	94
Херсонська	2	80	14	66	82,5
Хмельницька	4	617	40	577	93,52
Черкаська	9	3442	120	3322	96,51
Чернігівська	5	244	0	244	100
АР Крим	2	236	0	236	100
Всього	83	20126	890	19236	96,78

Значення титрів антитіл в позитивних зразках складали від 415 до 15576. Середнє значення титрів становило 5952. Відсоток позитивних зразків у різних областях коливався від 82,5% у Херсонській області до 100% у Чернігівській,

Полтавській та інших областях.

Отримані дані доповнюють загальноєвропейську та загальносвітову картину поширення збудника, а також вказують на необхідність запровадження програм контролю епізоотичної ситуації в господарствах України, зокрема, здійснення серологічного моніторингу перед застосуванням вакцинопрофілактики інфекційної бурсальної хвороби.

Виявлення та ідентифікація вірусу ІБХ за допомогою молекулярно-генетичних та гістологічних методів. Для виявлення вірусу нами було обрано дві пари праймерів для ампліфікації hVP2 (рис. 1). Праймери Bur1F та Bur1R були описані Bayliss та співавт. Продукт ампліфікації із використанням згаданої пари праймерів має довжину 643 п.н. Для підвищення чутливості реакції використовували інший набір праймерів Bur2F та Bur2R. Останній був розроблений для ампліфікації внутрішнього регіону амплікону, отриманого за допомогою праймерів Bur1F та Bur1R. Унаслідок другого етапу ПЛР із застосуванням праймерів Bur2F та Bur2R утворювався продукт довжиною 552 п.н. Обрані нами праймери для проведення ПЛР аналізували *in silico* за допомогою програми VectorNTIAdvanced 11 (Invitrogen, США).

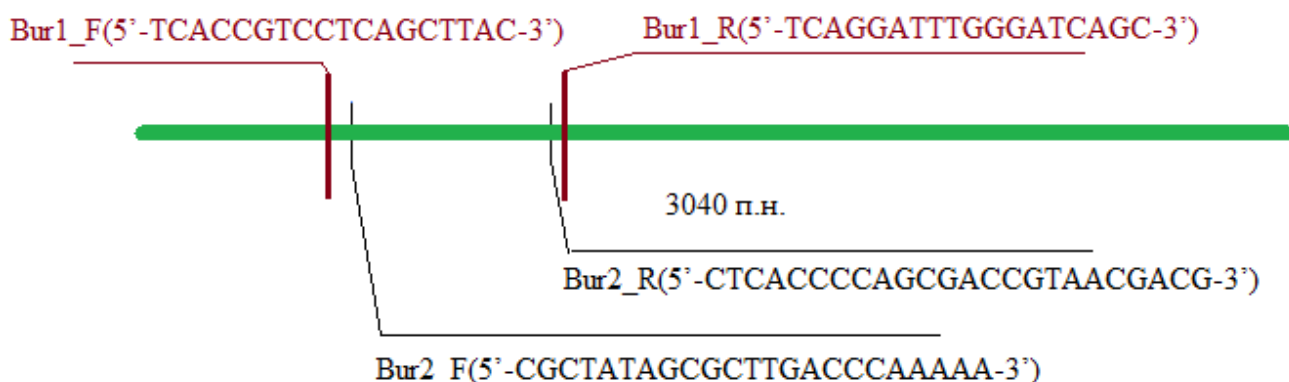


Рис. 1. Схема положення праймерів, підібраних до геному ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби, на основі нуклеотидної послідовності сегменту А.

Надалі здійснювали валідацію праймерів у міжлабораторних дослідженнях, після чого їх використовували для виявлення вірусу ІБХ в клінічних зразках.

У результаті проведених нами досліджень РНК вірусу інфекційної бурсальної хвороби було виявлено у 90% проаналізованих зразків органів, відібраних від уражених птахів.

Для встановлення характерних паталого-морфологічних змін в бурсі фіксували тканини, готували препарати та здійснювали мікроскопію отриманих зразків та визначали ступінь виснаження фолікул клоакальної сумки птахів. Рівень виснаження фолікулів бурси порівнювали з негативним контролем – бурсою відібраною від курча, що не підлягало вакцинації та не мало клінічних ознак інфікування вірусом ІБХ (рис. 2А).

Ступінь виснаження фолікул бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамами вірусу ІБХ варіював від 90 до 100 %. Окрім виснаження фолікул бурси, у всіх зразках також виявляли множинні крововиливи у міжфолікулярній стромі та точкові крововиливи у фолікулах фабрицієвої сумки. Також було виявлено

лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярній стромі. За 100% виснаження фолікул бурс спостерігали повну відсутність В-лімфоцитів у фолікулах клоакальної сумки (рис. 2Б).

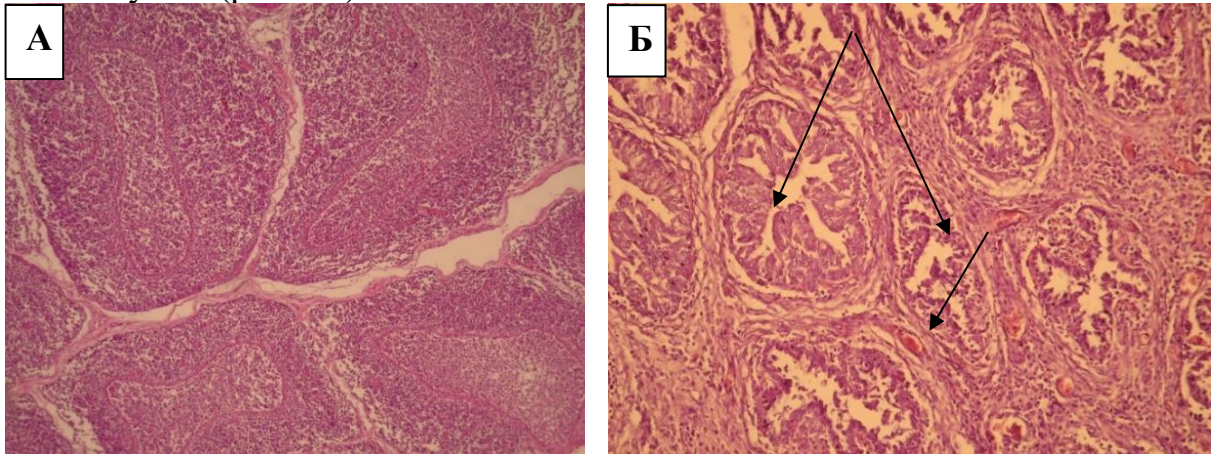


Рис. 2. Лімфоїдна тканина фолікулів бурси фабриціуса за відсутності вірусного інфікування та вакцинації (негативний контроль) (А) Виснаження фолікул бурс птахів на 100%, викликані польовими штамами вірусу, крововиливи та інфільтрати у міжфолікулярній стромі (позначені стрілками) (Б) Забарвлення еозином та гематоксиліном. Збільшення в 400 разів.

З метою визначення патологічних змін, викликаних у тканинах бурси за вакцинування живими штамами вірусу ІБХ, було проаналізовано характерні зміни, викликані вакцинними штамами. При вакцинуванні птахів за допомогою вакцин на основі «м'яких» штамів, таких як GM97, 228E та MB/20 спостерігали ступінь виснаження фолікул бурс, що складав 40 – 50 % (рис. 3А). Слід наголосити, що в фолікулах та міжфолікулярній стромі бурс ми не виявили крововиливів та лімфоцитарних інфільтратів, на відміну від бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамами.

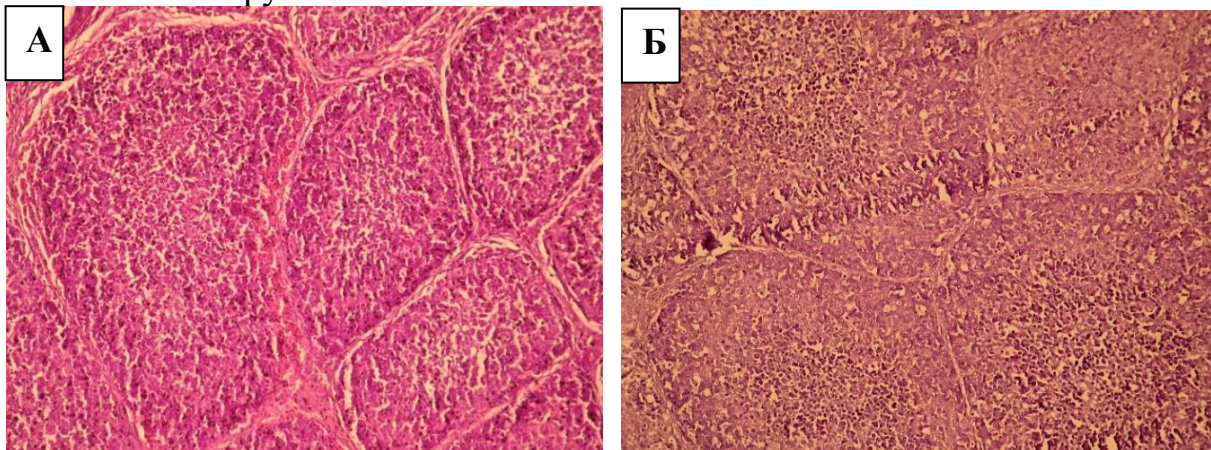


Рис. 3. Вплив «м'яких» (А) та «середніх» (Б) вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси збільшення у 400 разів. Забарвлення еозином та гематоксиліном.

На відміну від «м'яких» штамів, для «середніх» вакцинних штамів (V877, MB/5) було показано вищий ступінь виснаження фолікул бурс, який становив від 60 до 70 % (рис. 3Б). У міжфолікулярній стромі бурс також не було виявлено лімфоцитарних інфільтратів, на відміну від бурс птиці, інфікованої високовірулентним штамом. «Середні плюс» вакцинні штами (MB та MB/3) спричиняють найтяжче серед вакцинних штамів виснаження бурси. Рівень

виснаження при цьому складає 80 %, а інколи досягає 90 % (рис. 4). Втім відмінністю від високовірулентних штамів залишалась відсутність крововиливів у фолікулах та інфільтратів лімфоцитів у міжфолікулярний простір.

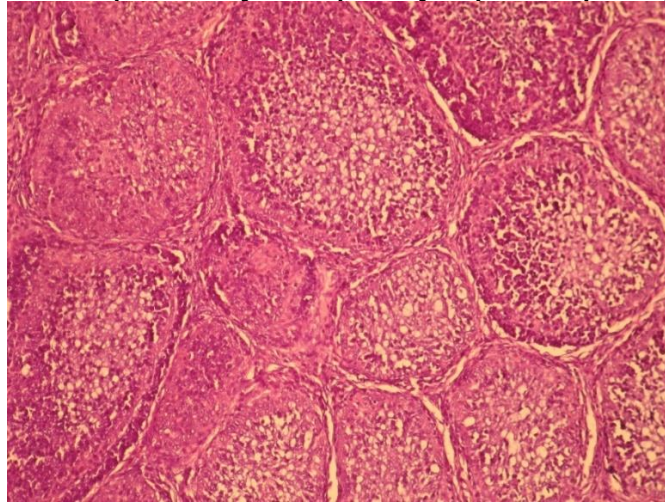


Рис. 4. Вплив «середніх-плюс» вакцинних штамів вірусу ІВХ на фолікули бурси (виснаження бурси 90 %): збільшення у 400 разів. Забарвлення еозином та гематоксиліном.

Таким чином, у результаті гістологічного дослідження було визначено специфічні зміни притаманні інфекційному процесу, викликаному високовірулентними штамми вірусу ІВХ. Отримані нами результати можуть бути використані для аналізу поствакцинальної реакції при проведенні профілактичних заходів на птахофабриках та диференціювання впливу вакцинних та польових штамів вірусу ІВХ.

Визначення штамового різноманіття вірусу ІВХ методом рестрикційного аналізу. Для визначення рестрикційного профілю ізолятів вірусу ІВХ, ПЛР-продукти, довжиною 552 п.н., піддавали рестрикції ферментами *BstEII*, *MboI*, *SacI*, *BspMI*, *MvaI* та *SspI*. Було показано, що штамми, які належали до однієї групи за рівнем залишкової вірулентності, мають однаковий рестрикційний профіль. У штамів 228E, GM97, MB/20, D78 були наявними сайти рестрикції для рестриктаз *SacI*, *MvaI* та *MboI*. Внаслідок дії ендонуклеази *SacI* утворювалися фрагменти розміром 368 та 184 п.н. Рестриктаза *MvaI* розрізала ПЛР-продукт з утворенням фрагментів 475 та 77 п.н., тоді як після рестрикції *MboI* виявляли фрагменти розміром 413 та 62 п.н. (рис. 5 А).

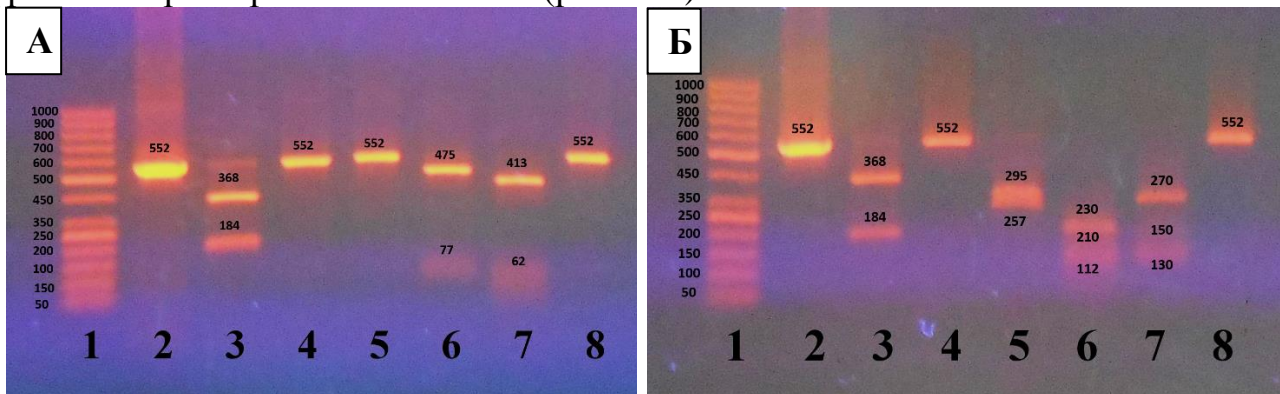


Рис. 5. Рестрикційний профіль «м'яких» (А) та «середніх» (Б) вакцинних штамів: 1- маркер молекулярних мас; 2 - амплікон до рестрикції; 3 - фрагменти після рестрикції *SacI*; 4 -

фрагменти після рестрикції *SspI*; 5 - фрагменти після рестрикції *BstEII*; 6 - фрагменти після рестрикції *MvaI*; 7 - фрагменти після рестрикції *MboI*; 8 - фрагменти після рестрикції *BspMI*.

Штами V877 та MB/5, що належали до групи із середнім рівнем залишкової вірулентності, характеризувалися наявністю сайтів рестрикції для ендонуклеаз рестрикції *BstEII*, *MboI*, *SacI* та *MvaI* (рис. 5Б).

На відміну від двох вищезазначених груп вакцинних штамів, у штамів MB та MB/3 із високим рівнем залишкової вірулентності не було виявлено сайт рестрикції *SacI*. Натомість їм був властивий сайт для ферменту *SspI*. Внаслідок рестрикції ПЛР-продукту ендонуклеазою *SspI* утворювались фрагменти розміром 326 та 226 п.н. Також у штамів MB та MB/3 було встановлено наявність сайту для рестриктази *BspMI*, чого не було показано для інших вакцинних штамів (рис. 6А).

На відміну від вакцинних штамів із високим рівнем залишкової вірулентності, у послідовності гіперваріабельного регіону гену VP2 високовірулентних ізолятів був відсутній сайт рестрикції *BstEII* (рис. 6 Б).

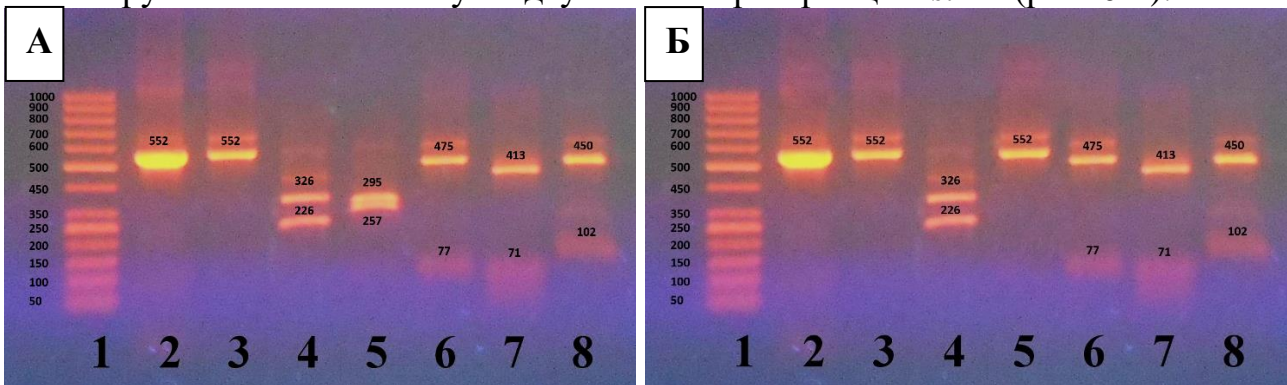


Рис. 6. Рестрикційний профіль вакцинних штамів MB та MB/3 (А) та польових високовірулентних штамів вірусу ІБХ (Б) 1- маркер молекулярних мас; 2 - амплікон до рестрикції; 3 -фрагменти після рестрикції *SacI*; 4 - фрагменти після рестрикції *SspI*; 5 - фрагменти після рестрикції *BstEII*; 6 - фрагменти після рестрикції *MvaI*; 7 - фрагменти після рестрикції *MboI*; 8 - фрагменти після рестрикції *BspMI*.

Штам Winterfield-2512 характеризувався унікальним набором сайтів рестрикції, не притаманним іншим дослідженим штамам. Зокрема, у послідовності гену VP2 було виявлено сайти рестрикції для ендонуклеаз рестрикції *MboI*, *SacI*, *MvaI* та *SspI* (рис. 7).

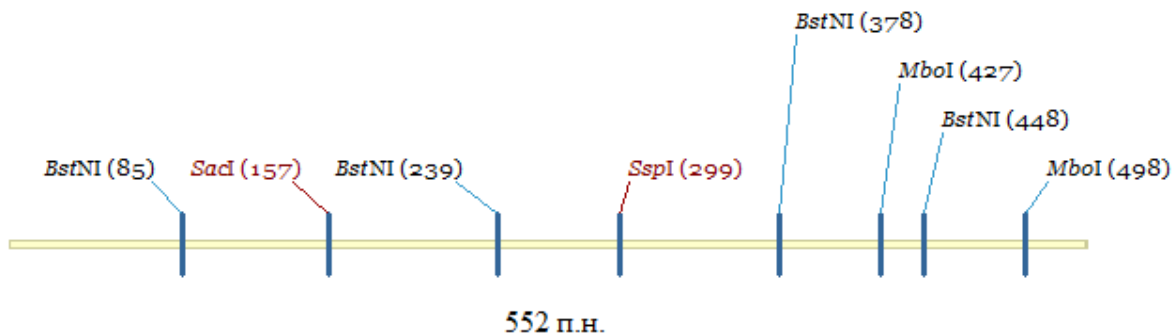


Рис. 7. Схема положення сайтів рестрикції, визначених у послідовності гену VP2 вакцинного штаму Winterfield-2512.

На підставі порівняльного аналізу рестрикційних профілів вакцинних штамів охарактеризували ізоляти вірусу ІБХ, виявлені у органах уражених птахів. Рестрикційний аналіз вказаних ізолятів засвідчив, що більшість із них походили від вакцинних штамів. Так, було показано, що 51% ізолятів вірусу характеризувались рестрикційним профілем подібним до вакцинних штамів V877 та MB/5. 33% виявлених ізолятів були подібними до штамів GM97, 228E і MB/20, тоді як 11% мали такі ж сайти рестрикції як у штамів MB та MB/3. Серед усіх досліджених ізолятів було також виявлено 5%, сайти рестрикції яких співпадали із референтним високовірулентним штамом UK661.

Таким чином, у результаті порівняльного аналізу рестрикційного профілю вакцинних штамів із різним ступенем залишкової вірулентності та високовірулентних ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби було показано, що вакцинним штамам, які належать до однієї групи, властиві однакові сайти рестрикції. У штаму Winterfield-2512 було описано унікальний рестрикційний профіль, який відрізнявся від усіх проаналізованих вакцинних штамів. За даними рестрикційного аналізу 95% ізолятів вірусу ІБХ походили від вакцинних штамів, тоді як 5% ізолятів володіли сайтами рестрикції, подібними до референтного високовірулентного штаму UK661. Це вказує на те, що ці ізоляти не походили від вакцинних штамів, натомість були високовірулентними.

Для детального аналізу ізолятів вірусу ІБХ здійснювали секвенування продукту ПЛР із подальшим аналізом отриманих послідовностей.

Філогенетичний аналіз штамів вірусу ІБХ поширених в Україні. Зважаючи на велику різноманітність штамів вірусу ІБХ та недостатню кількість описаних штамів вірусу в Україні, було доцільно встановити нуклеотидну послідовність гіперваріабельного регіону гену VP2 (VP2 HVR) різних ізолятів вірусу ІБХ виявлених в птахофабриках України та порівняти отримані послідовності із охарактеризованими штамми вірусу, послідовності геномів яких доступні в базі GenBank. Нуклеотидну послідовність VP2 HVR визначали за методом Сенгера. В результаті роботи здійснили секвенування VP2 HVR 16 ізолятів вірусу. Рівень гомології між різними штамми становив від 87,2% до 99,8%.

Ізоляти вірусу ІБХ, виявлені в Україні, формували 2 окремих кластери: до першого кластеру належали високовірулентні штами (VV), до другого – класичні вірулентні штами (CV). До першого та другого кластерів належали по 8 досліджуваних ізолятів (рис. 8).

Виявлені в Україні високовірулентні штами групувались в один кластер із високовірулентними штамми вірусу ІБХ охарактеризованими в інших країнах, таких як: Великобританія - UK661 (AJ878898); Єгипет - K406/89 (AF159218); Китай - HK46 (AF051838); Нідерланди 1986 (Z25482); Іспанія - SP/31/02 (AY770593). Досліджувані ізоляти були також філогенетично споріднені із атенуйованими штамми вірусу ІБХ із високим рівнем залишкової вірулентності, такими як MB та MB/3. Високовірулентні ізоляти вірусу ІБХ формували два субкластери (VV-1 та VV-2), що може вказувати на їх різне походження. Для встановлення кореляції між філогенетичною відстанню та географічним поширенням штамів вірусу ІБХ в Україні недостатньо даних, оскільки

високовірулентні ізоляти були виявлені лише у Київській та Львівській областях. Рівень гомології між високовірулентними ізолятами вірусу ІБХ, виявленими в Україні, варіював від 99,8% (між штамми Ukraine_934 та Ukraine_964) до 94,4% (між штамми Ukraine_1517 та Ukraine_964). Решта аналізованих ізолятів вірусу ІБХ, виявлених в Україні, за результатами філогенетичного аналізу були віднесені до класичних вірулентних штамів (рис. 8).

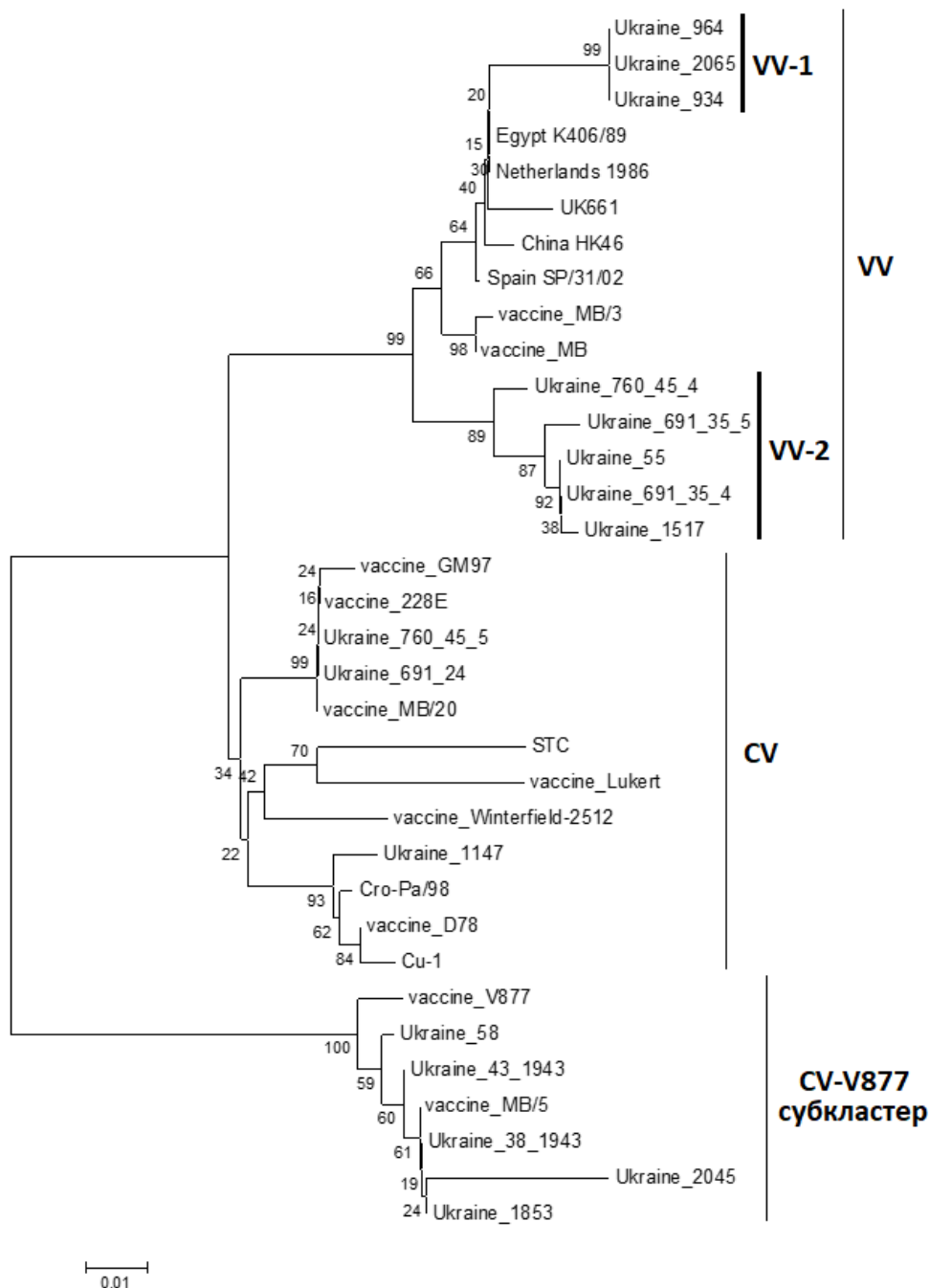


Рис. 8. Філогенетичне дерево 34 послідовностей гіперваріабельного регіону гену VP2 різних ізолятів вірусу ІБХ, побудоване за допомогою методу NJ. Результати бустреп реплікації вказані під гілками (бустреп – 1000). Масштабне позначення вказує на 0,01 нуклеотидних змін на сайт.

Ізоляти Ukraine_760_45_5, Ukraine_691_24 та Ukraine_1147 були близькоспорідненими із референтними класичними штамми, такими як CU-1

(AF362771), Croatia. Cro-Pa/98 (EU184689), а також класичними атенуйованими штамми. Ізоляти Ukraine_58, Ukraine_43_1943, 38_1943, Ukraine_2045 та Ukraine_1853 формували окремий субкластер із класичними атенуйованими штамми вірусу V877 та MB/5 (рис. 8). Це може свідчити, що тварини, в яких були виявлені дані ізоляти вірусу ІБХ, були вакциновані одним із вищезгаданих штамів вірусу.

Надалі нами було здійснено порівняння послідовності VP2 HRV різних вакцинних штамів, зареєстрованих в Україні. В дослідженні використовували 11 вакцинних штамів, що входять до складу найбільш розповсюджених вакцин проти ІБХ в Україні. Послідовності деяких вакцинних штамів були отримані із баз GenBank, а саме: D78 (AJ586963), 228E (AF457204), Lukert (AY918948), V877 (AJ878882), MB (AY739669), Winterfield-2512 (DQ355819). Послідовності п'яти вакцинних штамів були недоступні в базах GenBank, тому були секвеновані для доповнення бази вакцинних штамів. До них належали вакцинні штами: MB/20 (Біотестлаб, Україна), MB/5 (Біотестлаб, Україна), MB/3 (Біотестлаб, Україна), LC-75 (Lohmann Animal Health GmbH, Німеччина), GM97 (Hipra, Іспанія). Для філогенетичного аналізу було використано нуклеотидну послідовність VP2 HRV розміром 426 нуклеотидів (рис. 9).

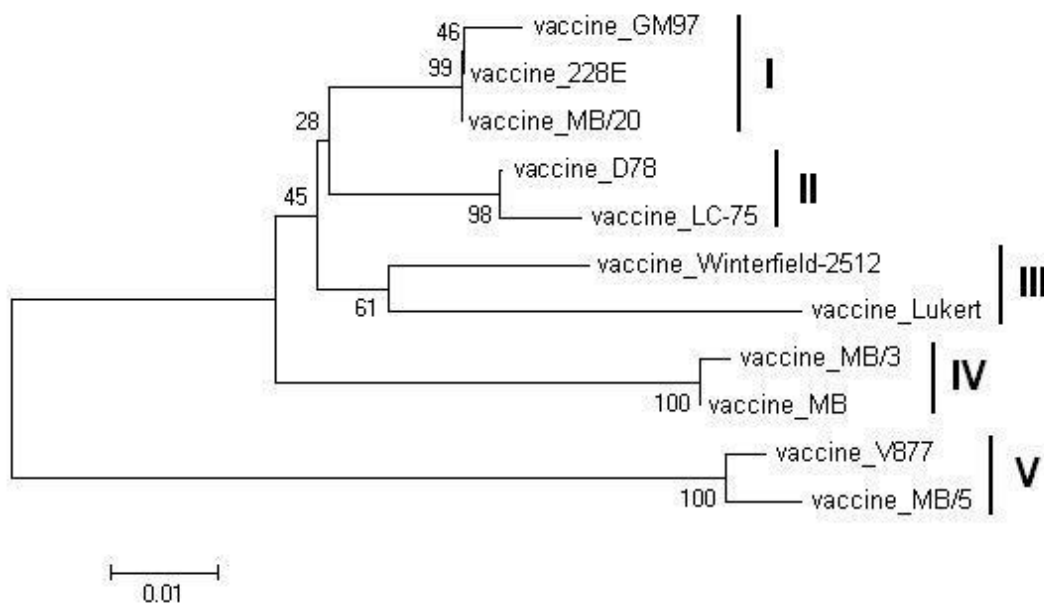


Рис. 9. Філогенетичне дерево VP2(HRV) 11 розповсюджених в Україні вакцинних штамів, побудоване за допомогою методу NJ. Результати бустреп реплікації вказані під гілками (бустреп – 1000). Масштабне позначення вказує на 0,01 нуклеотидних замін на сайт.

У результаті вакцинні штами формували 5 кластерів. До кластеру I належали «м'які» штами GM97, 228E та MB/20. Середній рівень гомології в кластері становив 99,7%. До другого кластеру належали інші «м'які» штами - LC-75 та D78. Рівень гомології між ними складав 99,3%. Штами із середнім рівнем залишкової вірулентності Winterfield-2512 та Lukert формували кластер III (94,5% гомології). «Середні-плюс» штами MB та MB/3 формували кластер IV. Рівень гомології між ними складав 99,5%. До складу кластеру V входили «середні» вакцинні штами MB/5 та V877 (98,9% гомології).

Для визначення філогенетичної спорідненості між польовими та вакцинними штамми вірусу до початкового аналізу було додано послідовності VP2 HRV 16 українських польових штамів вірусу ІБХ, що належали до класичних (Ukraine 1853, Ukraine 38_1943, Ukraine 43_1943, Ukraine 2045, Ukraine 58, Ukraine 691_24, Ukraine 760_45_5, Ukraine 1147) та високовірулентних штамів (Ukraine 1517, Ukraine 55, Ukraine 691_35_4, Ukraine 691_35_5, Ukraine 760_45_4, Ukraine 2065, Ukraine 934, Ukraine 964) відповідно (рис. 10). Було показано, що після додавання до аналізу польових штамів структура початкового дерева лишилась незмінною і нове філогенетичне дерево також формувалось із 5 кластерів. 8 високовірулентних штамів належали до кластеру IV із «середніми-плюс» вакцинними штамми. 3 класичних штами були споріднені із м'якими штамми в кластері I, один класичний штама належав до кластеру II та 5 класичних штамів належали до кластеру V.

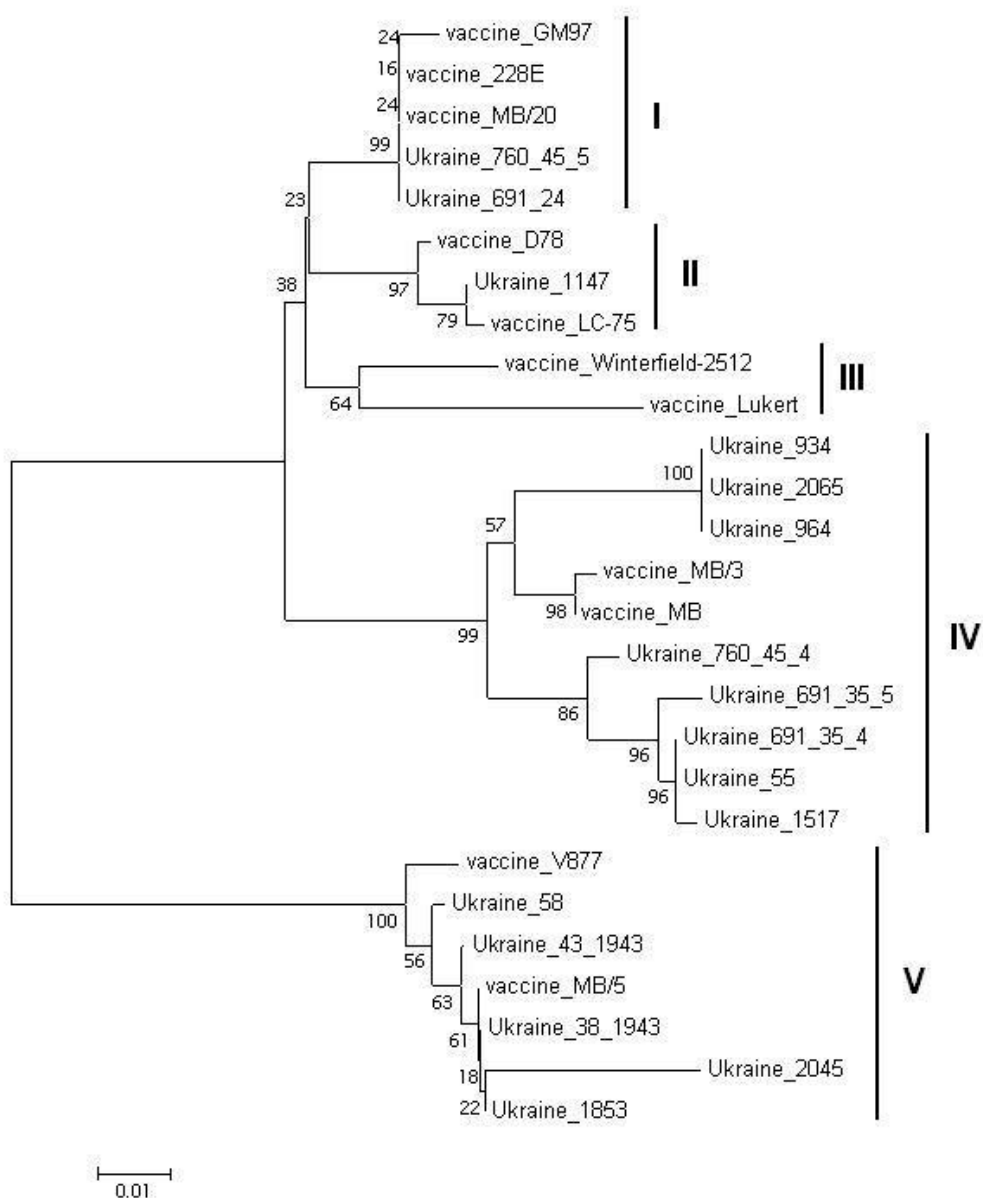


Рис. 10. Філогенетичне дерево VP2(HRV) вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ, виявлених в Україні. Методи аналізу – NJ. Результати бустреп реплікації вказані під гілками (бустреп – 1000). Масштабне позначення вказує на 0,01 нуклеотидних замін на сайт.

Таким чином, було показано, що польові штами із різним рівнем

вірулентності групуються у відповідності до генетичної спорідненості із різними вакцинними штамми. Ці результати дають можливість використовувати метод філогенетичного аналізу для підбору найбільш ефективних схем вакцинації в господарствах України.

На завершальному етапі роботи доцільним було здійснити аналіз консенсусних послідовностей амінокислот в гіперваріабельному регіоні білку VP2 різних вакцинних та польових штамів, щоб оцінити гомологію амінокислотних послідовностей між польовими та вакцинними штамми, а також остаточно підтвердити приналежність виявлених в Україні ізолятів до високовірулентного або класичного патотипу за відповідними амінокислотними маркерами описаними в літературі.

Для аналізу використовували набір референтних послідовностей. Послідовності гену VP2 референтного високовірулентного штаму UK661 (номер GenBank AJ878898) та «середнього-плюс» штаму MB (номер GenBank AY739669) були використані для порівняння із високовірулентними ізолятами. Послідовності вакцинних штамів D78 (AJ586963), 228E (AF457204), V877 (AJ878882) були використані для порівняння із класичними вірулентними штамми вірусу ІБХ.

Для здійснення амінокислотного аналізу нуклеотидні послідовності гену VP2 всіх досліджуваних штамів було трансльовано в амінокислотну за допомогою програми MEGA 6. Далі проводили вирівнювання консенсусних амінокислотних послідовностей. Розмір аналізованого фрагменту складав 142 амінокислоти в позиціях з 206 по 347. Для нумерації в якості референс-штаму був використаний повний сиквенс штаму 52/70 (номер GenBank - D00869).

В результаті дослідження було визначено, що всі 16 ізолятів вірусу ІБХ виявлені в Україні не мали амінокислотних замін, характерних до атенуйованих штамів вірусу, таких як 253-Гістидин та 284-треонін. Вісім штамів (Ukraine 1517, Ukraine 55, Ukraine 691_35_4, Ukraine 691_35_5, Ukraine 760_45_4, Ukraine 2065, Ukraine 934, Ukraine 964) мали характерні амінокислотні сайти, притаманні високовірулентним штамам вірусу ІБХ, а саме: 222A, 242I (окрім штаму Ukraine 760_45_4), 256I, 294I і 299S (окрім штаму Ukraine 691_35_5). Вони також містили серин-збагачений гептапептид SWSASGS біля другого гідрофільного регіону у положенні 326–332. Наявність цього гептапептиду також вказує на високовірулентну природу вказаних ізолятів. У п'яти досліджених штамів (Ukraine 1517, Ukraine 55, Ukraine 691_35_4, Ukraine 691_35_5, Ukraine 760_45_4) була виявлена заміна аспартату на аспарагін в положенні 212 (D – N212). Така заміна не описана в літературі, тому її вплив на вірулентність вірусу необхідно вивчати в майбутніх дослідженнях.

Порівняння амінокислотних послідовностей вакцинного штаму MB та високовірулентних ізолятів показали високий рівень гомології між ними. Критичні сайти, що відповідають за вірулентність також збігаються у «середнього-плюс» штаму MB та досліджуваних вірусних ізолятів.

Результати амінокислотного аналізу класичних вірулентних штамів та «середніх» і «м'яких» вакцинних штамів також корелювали із результатами філогенетичного аналізу.

Таким чином, в результаті аналізу амінокислотних послідовностей

гіперваріабельного регіону білку VP2 було доведено високовірулентну природу восьми досліджених вірусних ізолятів. Порівняння польових та вакцинних штамів корелювало із результатами філогенетичного аналізу та свідчить, що цей метод можна використовувати для підбору найбільш спорідненого вакцинного штаму до польового ізоляту, що циркулює в господарстві. Такі дослідження дозволяють оптимізувати схему вакцинації, для захисту птахів від інфекційної бурсальної хвороби.

ВИСНОВКИ

На основі проведених досліджень охарактеризовано молекулярно-біологічні особливості ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) на території України, що дозволить здійснювати правильний підбір схеми вакцинації для профілактики захворювання у місцях промислового вирощування птиці.

1. Вперше показано широке розповсюдження вірусу ІБХ на території України. Згідно з даними серологічного скринінгу сироваток крові, відібраних від курей із 83 спеціалізованих господарств, 96,78% зразків були позитивними на антитіла до вірусу ІБХ.

2. Показано, що польові високовірулентні ізоляти вірусу ІБХ, виявлені в Україні, спричиняють специфічні зміни в тканинах бурси, які супроводжуються крововиливами та лімфоцитарними інфільтратами у міжфолікулярний простір, що дозволяє диференціювати поствакцинальну та постінфекційну реакцію, викликану вірусом ІБХ.

3. Встановлено, що високовірулентні ізоляти вірусу інфекційної бурсальної хвороби характеризувались наявністю унікального сайту рестрикції *SspI* та відсутністю сайту *BstEII*. Це дає можливість диференціювати їх від вакцинних штамів вірусу ІБХ.

4. У ході дослідження було розшифровано нуклеотидну послідовність гіперваріабельного регіону гену VP2 ізолятів вірусу ІБХ, виявлених в Україні, а також вакцинних штамів вірусу, що розширило базу для порівняння генетичних особливостей вірусу ІБХ, виявленого в різних регіонах.

5. За результатами філогенетичного аналізу доведено гетерогенність ізолятів вірусу ІБХ. 50% польових ізолятів вірусу ІБХ були філогенетично спорідненими із високовірулентними штамми, тоді як решта 50% були близькі до класичних вірулентних штамів вірусу ІБХ.

6. Показано, що польові штамми із різним ступенем вірулентності групуються у відповідності до генетичної спорідненості із вакцинними штамми, які належать до різних груп за ступенем залишкової вірулентності, що дає можливість використовувати метод філогенетичного аналізу для підбору найбільш ефективних схем вакцинації в господарствах України.

7. Результати аналізу консенсусних амінокислотних послідовностей співпадають із даними філогенетичного аналізу та підтверджують високовірулентну природу польових ізолятів вірусу ІБХ, виявлених в Україні.

**Список
наукових праць, опублікованих за темою дисертації**

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Pastyria A., Sobko I., Polischuk V. Genetic characterization of infectious bursal disease virus isolates in Ukraine // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія Біологія. – 2016. – 2 (72). -ст. 24-27. *(Дисертантом проведено збір матеріалів, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).*
2. Пастиря А.С., Собко І.О., Шайхет Є.О., Поліщук В.П. Серологічний моніторинг поширення вірусу інфекційної бурсальної хвороби в господарствах України в період з 2014 по 2016 роки // Мікробіологія і біотехнологія – 2017. - №2, ст. 33-39. *(Дисертантом проведено збір матеріалів, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).*
3. Пастиря А.С., Іващенко О.А., Нечипуренко О.О., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Патоморфологічні зміни у лімфоїдній тканині бурси Фабріціуса курей, викликані різними вакцинними та польовими штамами вірусу хвороби Гамборо // Науковий вісник НУБІП Україна, Серія: Біологія, Біотехнологія, Екологія. – 2018. - т.287, с.199-207 *(Дисертантом проведено збір матеріалів, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).*

Статті у наукових фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз даних

4. Pastyria A., Sobko I., Polischuk V. Restriction analysis and differentiation of Ukrainian strains of infectious bursal disease virus // Biopolymers and cell. – 2017. - 33 (1), p. 58-63. *(Дисертантом проведено збір матеріалів, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).*
5. Pastyria A., Budzanivska I., Polischuk V. Characterization of vaccine and field IBDV strains in Ukraine for proper vaccine selection for disease prevention // Biopolymers and cell. – 2018. - 34 (1), P. 24-31. *(Дисертантом проведено збір матеріалів, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).*

Тези наукових доповідей

6. Пастиря А. Рестрикційний аналіз гену VP2 вакцинних та польових ізолятів вірусу хвороби Гамборо виявлених в Україні. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Шевченківська весна: Біологічні науки». 6-8 квітня 2016 року, м. Київ.
7. Pastyria A., Polischuk V. Genetic characterization of infectious bursal disease virus isolates in Ukraine VIII International conference “Bioresources and viruses”, 12-14 September, 2016, Kyiv, Ukraine.

8. Pastyria A., Sobko I., Andriichuk O., Polischuk V. Sequence analyses and comparison of VP2 gene of IBDV isolates and vaccine strains used in Ukraine //, WVPA Congress 4-8 September 2017, Edinburgh, Great Britain.
9. Пастыря А.С., Собко І.О., Шайхет Є.О., Поліщук В.П. Виявлення антитіл до вірусу інфекційної бурсальної хвороби в сироватках крові курей, відібраних в різних регіонах України // XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (ТМУ), м. Одеса, 11-15 вересня 2017 р.

АНОТАЦІЯ

Пастыря А.С. Молекулярно-біологічна характеристика виявлених в Україні ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2019.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню та ідентифікації ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби, поширених на території України, а також їх молекулярно-біологічному аналізу для розробки в подальшому актуальних програм вакцинації. Нами було вперше описано поширення вірусу ІБХ на території України шляхом серологічного скринінгу сироваток крові відібраних від курей із господарств у 20 регіонах країни. Відсоток позитивних зразків становив 96,78%.

В результаті гістологічного та рестрикційного аналізу охарактеризовано особливості різних штамів вірусу, що дає можливість диференціювати вакцинні та польові штами вірусу ІБХ.

Дослідження філогенетичних зв'язків між вакцинними та польовими штамми вірусу показало, що польові штами із різним ступенем вірулентності групуються у відповідності до генетичної спорідненості із вакцинними штамми, що належать до різних груп за ступенем залишкової вірулентності. Отримані результати дають можливість використовувати метод філогенетичного аналізу для підбору найбільш ефективних схем вакцинації в господарствах України.

Ключові слова: вірус інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ), філогенетичний аналіз, польові ізоляти, вакцинні штами.

АННОТАЦИЯ

Пастыря А.С. Молекулярно-биологическая характеристика выявленных в Украине изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни. – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2019.

Диссертационная работа посвящена исследованию и идентификации изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни, распространенных на территории Украины, а также их молекулярно-биологическому анализу для разработки актуальных программ вакцинации. Нами было впервые описано распространение вируса ИББ на территории Украины путем серологического

скрининга сывороток крови, отобранных от кур из хозяйств в 20 регионах страны. Процент положительных образцов составлял 96,78%.

В результате гистологического и рестрикционного анализа были описаны особенности разных штаммов вируса, что дает возможность дифференцировать вакцинные и полевые штаммы вируса ИББ.

Исследование филогенетических связей между вакцинными и полевыми штаммами вируса показано, что полевые штаммы с разной степенью вирулентности группируются в соответствии с генетическим родством с вакцинными штаммами, принадлежащими к разным группам по степени остаточной вирулентности. Эти результаты дают возможность использовать метод филогенетического анализа для подбора наиболее эффективных схем вакцинации в хозяйствах Украины.

Ключевые слова: вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ), филогенетический анализ, полевые изоляты, вакцинные штаммы.

SUMMARY

Pastyria A.S. Molecular and biological characterization of infectious bursal disease virus identified in Ukraine. – manuscript.

The thesis for a candidate's degree in biological sciences, specialty 03.00.06 "Virology". – Taras Schevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is dedicated to the detection and identification of isolates of infectious bursal disease virus (IBDV), distributed in the territory of Ukraine, as well as their molecular and biological analysis for development of up-to-date vaccination programs. We described the spread of IBDV in Ukraine by serological screening of blood sera from farm chickens in 20 regions of the country. The percentage of positive samples was 96.78%.

The results of histological analysis indicate that the infection of chickens with very virulent virus isolates showed a significant depletion of bursal follicles, hemorrhages and lymphocytic infiltrates into the inter-follicular space. Instead, such signs were not observed for the influence of vaccine strains.

For molecular analyses IBDV isolates were detected by PCR method in bursa tissues of vaccinated and infected chickens. Out of 120 analyzed samples, the genetic material of the IBDV was identified in 75 samples.

Restriction profile was analyzed using six endonucleases of restriction: *SacI*; *SspI*; *BstEII*; *MvaI*; *MboI*; *BspMI*. We have shown that the field strains of the virus have a unique restriction profile that differs them from all vaccine strains. From the vaccine, they differed by the presence of the unique *SspI* restriction site and the lack of the *BstEII* site. At the same time, *SacI* site, which has not been found in very virulent strains, was detected in "medium" and "mild" vaccine strains. "Hot" strains were characterized by the presence of the site *BstEII*, which distinguished them from the very virulent strains.

In general, the majority of IBDV isolates by restriction profile were similar to different vaccine strains. 5% of isolates had typical sites for very virulent strains.

Subsequently, we sequenced 16 field and 5 vaccine strains of the IBDV. For completeness of the analysis, we have selected field and vaccine strains of IBDV from the GenBank database from different countries. Based on the results of phylogenetic analysis 8 Ukrainian IBDV strains were grouped with very virulent strains (United Kingdom, UK661 (AJ878898), Egypt, K406/89 (AF159218), China, HK46 (AF051838), Netherlands, 1986 (Z25482), Spain SP/31/02 (AY770593). Two subclusters (VV-1 and VV-2) were formed by VV strains, and the homology level between the strains was from 99.8% (between 934 and 964) to 94.4% (between 1517 and 964). Other analyzed isolates were related to classic IBDV strains. Strains 760_45_5, 691_24 and 1147 were closely related to CU-1 strains (AF362771), Cro-Pa / 98 (EU184689) and vaccine strains. 4 strains (58, 43.1943, 38_1943, 2045 and 1853) formed a separate cluster with vaccine strains V877 and MB/5.

To understand the genetic diversity among vaccine strains of IBDV registered in Ukraine, phylogenetic analyses was performed. As a result, the vaccine strains formed 5 phylogenetic clusters. Cluster I and II included “mild” vaccine strains, cluster III and V included “medium”, and cluster IV - hot vaccine strains. To the phylogenetic tree of vaccine strains, 16 Ukrainian field isolates were added. As a result, tree structure did not change, and 5 phylogenetic clusters were obtained, while the field isolates were grouped with different vaccine strains, depending on their genetic affinity. 8 very virulent isolates were grouped with “hot” vaccine strains, and 8 classic virulent strains were grouped with “medium” and “mild” vaccine IBDV strains.

For understanding of the antigenic nature of VP2 protein, consensus amino acid sequences were analyzed. The analyzed region included 142 amino acids (from 206 to 347 sites). Results stated that none of the Ukrainian strains were vaccine-derived, since there were no mutations in sites 253-Histidine and 284-Threonine detected, which are commonly found in attenuated vaccine strains. Were noted typical for the high-risk strain replacement at sites 222A, 242I (except for the strain Ukraine 760_45_4), 256I, 294I, and 299S (except Ukraine 691_35_5). Also, in 8 strains, heptapeptide SWSASGS was found, which also confirms the osteoporotic nature of the strains detected.

The study of phylogenetic relationships between vaccine and field IBDV strains showed that field strains with different degrees of virulence are grouped according to genetic affinities with vaccine strains belonging to different groups by the degree of residual virulence. Obtained data from the analysis of consensus amino acid sequences coincide with the data of phylogenetic analysis. These results make it possible to use the phylogenetic analysis method to select the most effective vaccination programs in Ukrainian poultry farms.

Key words: infectious bursal disease virus (IBDV), phylogenetic analysis, field isolates, vaccine strains.

Державний реєстраційний номер особи – підприємця № 10000000800228

Підписано до друку 09.09.2019 р.

Формат 60 x 90^{1/16}. Папір офсетний №2. Друк цифровий.

Обсяг 0,9 ум.-друк. арк. Тираж 100 прим. Зам. № 681

Надруковано в міні-типографії ФОП Степенко Р.Д.

02660, м. Київ, вул. М. Приймаченко, буд. 1/27

Тел. (044) 223-81-79, E-mail 6724642@ukr.net, www.urb.com.ua