

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПАСТИРЯ АННА СЕРГІЙВНА

УДК: 575.52+616-079.4

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.06 – вірусологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А.С. Пастиря

Науковий керівник: Будзанівська Ірина Геннадіївна, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Пастиря А.С. Молекулярно-біологічна характеристика виявлених в Україні ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 «Вірусологія». - Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України, Київ, 2019.

Дисертаційну роботу присвячено виявленню 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 охарактеризовано поширення вірусу ІБХ на території України шляхом серологічного скринінгу сироваток крові відібраних від курей із господарств у 20 регіонах країни. Для проведення серологічного скринінгу було відібрано 20126 сироваток крові від курей із 83 господарств та 20 областей України. У результаті роботи антитіла до вірусу ІБХ були виявлені у 19236 зразках із усіх досліджуваних господарств, що дає підставу робити висновок про значне поширення вірусу ІБХ на території України. Дані наших досліджень доповнюють загальноєвропейську та загальносвітову картину поширення збудника.

З метою диференційної діагностики вірусу ІБХ виявляли вірус у тканинах бурси Фабріціуса за допомогою методу ПЛР та проводили гістологічний аналіз змін викликаних вірусом ІБХ в тканинах бурси для визначення особливостей впливу вакцинних та польових штамів вірусу. Результати гістологічного аналізу вказують, що за інфікування курей високовірулентними ізолятами спостерігалось значне виснаження фолікулів бурси, крововиливи та лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярний простір. Натомість таких ознак не спостерігали за впливу вакцинних штамів. Так вакцинні штами із високим рівнем залишкової вірулентності викликали лише

виснаження бурси, при цьому жодних крововиливів та інфільтратів виявлено не було. За впливу штамів із низьким та середнім рівнем залишкової вірулентності також відмічали виснаження фолікулів, але його рівень був значно нижчим і відповідно становив 40% для м'яких та 60% для середніх вакцинних штамів. Отже, такі ознаки, як крововиливи та лімфоцитарні інфільтрати ми вважаємо діагностичними для інфекційного процесу, викликаного високовірулентними ізолятами вірусу.

Для ПЛР-дослідження було відібрано 120 зразків із 16 господарств та 10 областей України. Генетичний матеріал вірусу було виявлено у 75 зразках. З метою диференціювання польових ізолятів вірусу від вакцинних штамів позитивні зразки піддавали рестрикції. Також було здійснено рестрикційний аналіз послідовності гену VP2 9 вакцинних штамів вірусу ІБХ, зареєстрованих в Україні, а саме: 228E, GM97, MB/20, D78, Winterfield-2512, V877, MB/5, MB та MB/3. У дослідженні використовували 6 рестриктаз: *Eco911 (BstEII)*, *MboI*, *SacI*, *BspMI*, *MvaI (BstNI)*, та *SspI*. Було показано, що у штамів 228E, GM97, MB/20, D78 були наявними сайти рестрикції для рестриктаз *SacI*, *MvaI* та *MboI*. Штами V877 та MB/5 характеризувалися наявністю сайтів рестрикції для ендонуклеаз рестрикції *BstEII*, *MboI*, *SacI* та *MvaI*. На відміну від вищезазначених 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*. Також у штамів MB та MB/3 було встановлено наявність сайту для рестриктази *BspMI*, чого не було показано для інших вакцинних штамів.

На відміну від усіх проаналізованих вакцинних штамів, 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 (BstNI)* та *SspI*.

Нами було показано, що польові штами вірусу мають унікальний рестрикційний профіль, що відрізняється від усіх вакцинних штамів. Від

вакцинних вони відрізнялися наявністю унікального сайту рестрикції *SspI* та відсутністю сайту *BstEII*. Отримані результати дають можливість диференціювання різних видів вакцинних штамів та польових ізолятів вірусу ІБХ.

Для детального аналізу ізолятів вірусу ІБХ здійснювали секвенування продукту ПЛР із подальшим аналізом отриманих послідовностей. 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%. Для повноти аналізу нами були підібрані польові та вакцинні штами вірусу ІБХ із бази GenBank з різних країн. За результатами філогенетичного аналізу 8 штамів вірус ІБХ групувались із високовірулентними штамми (Великобританія, UK661 (AJ878898); Єгипет, K406/89 (AF159218); Китай, HK46 (AF051838); Нідерланди, 1986 (Z25482); Іспанія, SP/31/02 (AY 770593). Високовірулентні штами формували два субкластери (VV-1 та VV-2). Рівень гомології між штамми коливався від 99,8% (між 934 та 964) до 94,4% (між 1517 та 964). 8 штамів були споріднені із класичними штамми вірусу ІБХ. Штами 760_45_5, 691_24 та 1147 були близько споріднені із референс-штамами CU-1 (AF62771), Cro-Pa/98 (EU184689) та вакцинними штамми. 4 штами (58, 43_1943, 38_1943, 2045 та 1853) сформували окремий кластер із вакцинними штамми V877 та MB/5.

Для розуміння генетичної різноманітності вакцинних штамів, що входять до складу вакцин проти інфекційної бурсальної хвороби, зареєстрованих в Україні, нами було проведено філогенетичний аналіз. 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. 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 штам належав до кластеру II та 5 класичних штамів належали до кластеру V.

Для розуміння антигенної природи білку VP2 польових ізолятів нами було здійснено аналіз консенсусних амінокислотних послідовностей. Аналізований регіон включав 142 амінокислоти (з 206 по 347 сайти). В результаті дослідження було визначено, що всі 16 ізолятів вірусу ІБХ виявлені в Україні не мали амінокислотних замін, характерних до атенуєваних 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 МВ та високовірулентних ізолятів показали високий рівень гомології між ними. Критичні сайти, що відповідають за вірулентність також збігаються у «середнього-плюс» штаму МВ 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 у дисертації було досліджено розповсюдження та охарактеризовано молекулярно-біологічні особливості ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби на території України, що дозволить здійснювати правильний підбір схеми вакцинації для попередження захворювання у місцях промислового вирощування птиці.

Підтверджено високовірулентну природу 8 польових ізолятів вірусу ІБХ та вперше показано їх циркуляцію в Україні. Результати амінокислотного аналізу збігаються із даними філогенетичного аналізу та дозволяють використовувати його для підбору актуальних схем вакцинації у господарствах України.

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

SUMMARY

Pastyria A.S. Molecular and biological characterization of infectious bursal disease virus identified in Ukraine. — Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences on specialty 03.00.06 — virology. — Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the identification of isolates of infectious bursal disease virus in Ukraine, as well as their molecular-biological analysis for the development of further relevant vaccination programs. We have established the spread of IBDV in Ukraine through serological screening of blood serums from chickens from farms in 20 regions of the country. For serological screening 20126 blood serum from chickens from 83 farms and 20 regions of Ukraine was selected. Antibodies to IBDV were identified in 19236 samples from all investigated farms, which gives rise to the conclusion about the significant spread of IBDV in Ukraine. Our research complements the pan-European and global picture of the spread of the pathogen.

In order to differentiate IBDV, the virus was detected in the tissues of the bursa of Fabricius using the PCR method. Also, histological analysis of changes caused by virus in the tissues of the bursa was performed to determine the characteristics of the vaccine and field strains of the virus. The results of the histological analysis indicate that for the infection of hens with very virulent isolates, significant depletion of bourses, hemorrhages and lymphocytic infiltrates in the interphollicular space was observed. Instead, such signs were not observed for the influence of vaccine strains. So, vaccine strains with a high level of residual virulence caused only the bursa exhaustion, and no hemorrhages and infiltrates were detected. The effects of strains with low and intermediate levels of residual virulence also indicated the depletion of the follicles, but its level was significantly lower and accordingly was 40% for mild and 60% for medium vaccine strains. Consequently, we consider such signs as hemorrhages and lymphocytic infiltrates to be diagnostic for the infectious process caused by the very virulent isolates of IBDV.

For the PCR study, 120 samples from 16 farms and 10 regions of Ukraine were selected. The genetic material of the virus was detected in 75 samples. In order to differentiate the virus isolates from the vaccine strains, positive samples were

subjected to restriction. Restriction analysis of the VP2 gene sequence of 9 IBDV vaccine strains registered in Ukraine was also performed, namely: 228E, GM97, MB/20, D78, Winterfield-2512, V877, MB/5, MB and MB/3. Six restriction enzymes were used in the study: Eco911 (BstEII), MboI, SacI, BspMI, MvaI (BstNI), and SspI. It was shown that strains 228E, GM97, MB/20, D78 had restriction sites for SacI, MvaI, and MboI. Strains V877 and MB/5 were characterized by the presence of restriction sites for restriction endonucleases BstEII, MboI, SacI and MvaI. Unlike the above vaccine strains, the SacI restriction site was not detected in MB and MB / 3 strains with high residual virulence. Instead, they had a site for the SspI enzyme. Also, strains of MB and MB/3 were found to have a BspMI restriction site, which was not shown for other vaccine strains.

Unlike all the vaccine strains analyzed, the Winterfield-2512 strain was characterized by a unique set of restriction sites not unique to the other strains tested. In particular, restriction sites for restriction endonuclease MboI, SacI, MvaI (BstNI) and SspI restriction sites were detected in the VP2 gene sequence.

We have been shown that field virus strains have a unique restriction profile that is different from all vaccine strains. Vaccines were distinguished by the presence of a unique SspI restriction site and the absence of the BstEII site. The results obtained make it possible to differentiate between different types of vaccine strains and IBDV field isolates.

Sequencing of PCR product was performed for detailed analysis of IBD virus isolates, followed by analysis of the sequences obtained. The nucleotide sequence of VP2 HVR was determined by the Sanger method. As a result, sequencing of VP2 HVR of 16 virus isolates was performed. The level of homology between the different strains ranged from 87.2% to 99.8%. For completeness, we selected field and vaccine strains of IBH from GenBank from different countries. According to the results of phylogenetic analysis of 8 strains, the IBD virus was grouped with highly virulent strains (UK, UK661 (AJ878898); Egypt, K406 / 89 (AF159218); China, NK46 (AF051838); The Netherlands, 1986 (Z25482); (AY 770593) Very virulence strains formed two subclusters (VV-1 and VV-2), with homology between the

strains ranging from 99.8% (between 934 and 964) to 94.4% (between 1517 and 964). Strains 760_45_5, 691_24 and 1147 were closely related to the reference strains SU-1 (AF62771), Cro-Ra/98 (EU184689) and vaccine strains. 4 strains (58, 43_1943, 38_19, 38_19, 38_19 and 1853) formed a separate cluster with vaccine strains V877 and MB/5.

In order to understand the genetic diversity of vaccine strains included in the vaccines against infectious bursal disease registered in Ukraine, we conducted a phylogenetic analysis. As a result, the vaccine strains formed 5 clusters. Cluster I was formed by "mild" strain GM97, 228E and MB/20. The average level of homology in the cluster was 99.7%. The second cluster included other "mild" strains - LC-75 and D78. The level of homology between them was 99.3%. Strains with a mean residual virulence rate Winterfield-2512 and Lukert formed cluster III (94.5% homology). Medium-plus strains of MB and MB / 3 formed cluster IV. The level of homology between them was 99.5%. Cluster V included "medium" vaccine strains MB / 5 and V877 (98.9% homology).

To determine the phylogenetic affinity between the field and vaccine strains of the virus, VP2 HRV sequences of 16 Ukrainian field strains of IBD belonging to the classical (Ukraine 1853, Ukraine 38_1943, Ukraine 43_1943, Ukraine 2045, Ukraine 58, Ukraine 691_24, Ukraine 760_45, Ukraine) were added to the initial analysis. , Ukraine 1147) and highly virulent strains (Ukraine 1517, Ukraine 55, Ukraine 691_35_4, Ukraine 691_35_5, Ukraine 760_45_4, Ukraine 2065, Ukraine 934, Ukraine 964), respectively (Fig. 10). It was shown that after the addition of the field strains to the analysis, the structure of the initial tree remained unchanged and a new phylogenetic tree was also formed from 5 clusters. Eight highly virulent strains belonged to cluster IV with "medium-plus" vaccine strains. 3 classic strains were related to soft strains in cluster I, one classic strain belonged to cluster II and 5 classic strains belonged to cluster V.

To understand the antigenic nature of the VP2 protein of the field isolates, we performed an analysis of consensus amino acid sequences. The analyzed region included 142 amino acids (from 206 to 347 sites). The study found that all 16 isolates

of IBD found in Ukraine had no amino acid substitutions characteristic of attenuated virus strains, such as 253-histidine and 284-threonine. Eight strains (Ukraine 1517, Ukraine 55, Ukraine 691_35_4, Ukraine 691_35_5, Ukraine 760_45_4, Ukraine 2065, Ukraine 934, Ukraine 964) had characteristic amino acid sites characterized by highly virulent strains of the IBH virus, namely: 222A, 242I (except strain Ukraine) 760_45, 256I, 294I and 299S (except Ukraine strain 691_35_5). They also contained the serine-enriched heptapeptide SWSASGS near the second hydrophilic region at position 326-332. The presence of this heptapeptide also indicates the highly virulent nature of these isolates.

Five of the strains tested (Ukraine 1517, Ukraine 55, Ukraine 691_35_4, Ukraine 691_35_5, Ukraine 760_45_4) were found to replace aspartate with asparagine at position 212 (D - N212). This substitution has not been described in the literature, so its effect on virus virulence should be investigated in future studies.

Comparisons of the amino acid sequences of the MB vaccine strain and the highly virulent isolates showed a high level of homology between them. The critical sites responsible for virulence also coincide with the "middle-plus" strain of CF and the viral isolates under study.

Amino acid analysis of classical virulent strains and medium and soft vaccine strains also correlated with phylogenetic analysis.

Thus, in the dissertation the distribution and characterization of molecular and biological features of isolates of the virus of infectious bursal disease in the territory of Ukraine were investigated, which will allow to carry out the correct selection of the vaccination scheme for preventing the disease in the places of industrial breeding of poultry.

The highly virulent nature of 8 field isolates of IBD was confirmed and their circulation in Ukraine was shown for the first time. The results of amino acid analysis coincide with the data of phylogenetic analysis and allow it to be used for selection of current vaccination schemes in Ukrainian farms.

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
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. Пастиря 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.

ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКРОЧЕНЬ _____	16
ВСТУП _____	18
РОЗДІЛ 1.ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ _____	25
1.1. Систематичне положення, структура та генетична організація вірусу інфекційної бурсальної хвороби _____	25
1.2. Характеристика білків вірусу інфекційної бурсальної хвороби _____	27
1.3. Особливості патологічного впливу вірусу ІБХ _____	31
1.3.1. Молекулярно-генетичні детермінанти вірулентності вірусу ІБХ _	31
1.3.2. Механізми патогенезу та імуносупресивний ефект вірусу ІБХ _____	33
1.3.3. Клінічні ознаки інфекційної бурсальної хвороби _____	36
1.3.4. Патотипи вірусу інфекційної бурсальної хвороби та характеристика уражень, які вони викликають _____	37
1.4. Особливості імунної відповіді на вірус ІБХ _____	39
1.5. Генетичні передумови штамового різноманіття вірусу ІБХ _____	40
1.6. Методи діагностики вірусу ІБХ _____	42
1.7. Загальна характеристика вакцин проти вірусу інфекційної бурсальної хвороби _____	46
1.7.1. Особливості живих атенуйованих та інактивованих вакцин _____	46
1.7.2. Характеристика субдиничних вакцин _____	48
1.7.3. Властивості імунокомплексних вакцин _____	49
1.7.4. Характеристика ДНК-вакцин _____	50
1.7.5. Особливості векторних вакцин _____	51
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	53
2.1. Об'єкт дослідження та його характеристика _____	53
2.1.1. Загальна характеристика об'єкту дослідження _____	53

2.1.2. Аналіз морфолого-патологічного стану уражених курей та відбір зразків для молекулярно-біологічних та гістологічних досліджень _____	54
2.2 Реактиви, матеріали та обладнання, що були використані у роботі __	56
2.3. Серологічні методи дослідження. Імуноферментний аналіз _____	59
2.3.1. Приготування реагентів та зразків _____	59
2.4. Молекулярно-біологічні методи дослідження вірусу інфекційної бурсальної хворо _____	61
2.4.1. Підбір праймерів для проведення ПЛР _____	61
2.4.2. Виділення РНК та ДНК з патологічного матеріалу _____	61
2.4.3. Проведення реакції зворотної транскрипції _____	63
2.4.4. Проведення гніздової полімеразної ланцюгової реакції _____	64
2.4.5. Проведення рестрикційного аналізу ампліфікованих послідовностей кДНК _____	66
2.4.6. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів реакцій в агарозному гелі _____	67
2.4.7. Очищення ампліфікатів з агарозного гелю _____	67
2.5. Секвенування нуклеїнової кислоти та філогенетичний аналіз _____	68
2.5.1. Побудова філогенетичних дерев з використанням нуклеотидних послідовностей за допомогою програми MEGA 6 _____	68
2.6. Гістологічні методи дослідження змін, викликаних вірусом інфекційної бурсальної хвороби _____	69
2.6.1. Виготовлення гістологічних зразків тканин бурс _____	69
2.6.2. Мікроскопічний аналіз гістологічних препаратів _____	71
2.7. Статистична обробка даних _____	71
РОЗДІЛ 3. СЕРОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ В ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ В ПЕРІОД З 2014 ДО 2016 РОКІВ _____	72

РОЗДІЛ 4. ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ ІБХ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТА ГІСТОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ _____	76
4.1. Характеристика праймерів, які застосовували для проведення ПЛР метою виявлення вірусу ІБХ _____	76
4.2. Виявлення РНК вірусу ІБХ методом гніздової ПЛР _____	81
4.3. Виявлення патоморфологічних змін у лімфоїдній тканинній бурсі курей викликаних різними вакцинними та польовими штамми вірусу ІБХ _____	82
РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ШТАМОВОГО РІЗНОМАНІТТЯ ВІРУСУ ІБХ МЕТОДОМ РЕСТРИКЦІЙНОГО АНАЛІЗУ _____	89
РОЗДІЛ 6. ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМІВ ВІРУСУ ІБХ ПОШИРЕНИХ В УКРАЇНІ _____	97
6.1. Аналіз філогенетичних зв'язків різних штамів вірусу ІБХ _____	97
6.2. Філогенетичний аналіз вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ _____	101
6.3. Дослідження амінокислотних послідовностей гіперваріабельного регіону гену VP2 вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ _____	105
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ _____	109
ВИСНОВКИ _____	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	121
ДОДАТОК А _____	139

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Gzm A	- гранзим А;
h _v VP2	- гіперваріабельний регіон гену VP2;
IBDV	- Infectious Bursal Disease Virus – вірус інфекційної бурсальної хвороби;
IL-2	- інтерлейкін-2;
iNOS	- NO – синтаза;
NF-κB	- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells (ядерний фактор транскрипції);
NO	- оксид азоту;
PFN	- перфорин;
PP	- поліпротеїн;
PRRs	- pathogen recognition receptor (патоген-впізнавальні рецептори);
pVP2	- прекапсидний білок VP2;
RFLP	- Restriction fragment length polymorphism (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів);
SPF	- specific pathogen free (вільні від специфічних патогенів);
TLRs	- Toll-like receptors (толл подібні рецептори);
TNF-α	- Tumor necrosis factor-α (фактор некрозу пухлин α);
VLPs	- virus like particles (вірус-подібні частинки);
VP2	- вірусний протеї 2
VP2 HVR	- гіперваріабельний регіон гену VP2;
а.к.з.	- амінокислотні залишки;
АГ	- антиген;
АТ	- антитіло;
ВРЗ	- відкрита рамка зчитування;
длРНК	- дволанцюгова РНК;
ДНК	- дизоксирибонуклеїнова кислота;

ЕІД	- ефективна інфікувальна доза;
ЗТ	- зворотня транскрипція;
ЗТ-ПЛР	- зворотньотранскрипційна ПЛР
ІБХ	- інфекційна бурсальна хвороба;
ІФА	- імуноферментний аналіз;
кДНК	- комплементарна дизоксирибонуклеїнова кислота;
кЗТ-ПЛР	- кількісна зворотньотранскрипційна ПЛР
мРНК	- матрична РНК
п.о.	- пари основ;
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція;
РНК	- рибонуклеїнова кислота.

ВСТУП

Актуальність. Вірус інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) поширений у більшості країн, що спеціалізуються на промисловому вирощуванні курей. Вірус ІБХ належить до родини *Birnaviridae*, роду *Avibirnavirus*. Він уражує курчат 2-7 тижневого віку та призводить до патологій, що коливаються від імуносупресивного стану до загибелі значних частин поголів'я. Вперше хвороба була зареєстрована в 1957 році в м. Гамборо, США, через що захворювання отримало також назву «хвороба Гамборо» [2, 6, 75]. 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 (ОІЕ) вказують на те, що зараженість стад коливається в межах 2-100%. Постійний імпорт птиці сприяє розповсюдженню вірусу в птахівництвах промислового спрямування [97].

У свою чергу, на території України ІБХ була зареєстрована співробітниками Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини в Одеській області в 1991 році. Інфекція супроводжувалась значною загибеллю птиці (від 30 до 80 %). Упродовж року спалахи даного захворювання вже були зареєстровані в усіх птахогосподарствах Одеської області [158, 166].

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 [114, 115].

Вірус ІБХ характеризується значною штамовою різноманітністю, що в першу чергу пов'язана із мутаціями у гіперваріабельному регіоні гену VP2, що кодує основний капсидний білок вірусу. Протеїн VP2 містить антигенні

детермінанти, які визначають серотип вірусу [47, 129]. 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 [51].

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» [88]. Ефективність вакцинації напряму залежить від ступеню генетичної спорідненості вакцинного штаму до польового ізоляту, що циркулює у птахів у господарстві [11, 87, 94]. Тому, зважаючи на велику різноманітність вакцинних штамів, для проведення ефективної вакцинації необхідно здійснювати молекулярний аналіз штамів вірусу ІБХ, поширених у місцях промислового вирощування птиці.

Після поширення високовірулентних штамів вірусу було розроблено декілька підходів до їх характеристики. Для аналізу змін, що викликали нові штами на органному та тканинному рівні використовують, зокрема, вільні від патогенів курчата, яких уражують вірусом із подальшим аналізом, патологічних змін у органах [118]. Також, зважаючи на високу варіабельність вірусу в останні роки було розроблено молекулярно-біологічні підходи до характеристики вірусу ІБХ, що включають рестрикційний аналіз та секвенування [40, 45, 46]. У 2007 році Borodavka зі співав. розробили метод діагностики хвороби ІБХ, заснований на ЗТ-ПЛР із використанням специфічних праймерів до гіперваріабельного регіону гену капсидного протеїну VP2. Втім даних із приводу характеристики високовірулентних штамів вірусу, поширених на території України опубліковано не було [10, 156].

Рівень розповсюдженості вірусу ІБХ, а також його молекулярно-біологічні особливості є недостатньо вивченими в Україні. Також зважаючи на велику різноманітність вакцинних штамів, для здійснення ефективної

вакцинації важливою є характеристика польових ізолятів вірусу, що циркулюють у птахів у місцях їх промислового вирощування.

Таким чином, зважаючи на варіабельність вірусу, значне розповсюдження нових штамів та необхідність диференціювання вакцинних штамів від польових варіантів, необхідним є удосконалення існуючих методів дослідження вірусу інфекційної бурсальної хвороби.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах технічного завдання держбюджетної теми №11БФ 036-02, 01.12.2015-19.02.2019 «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 та завдання дослідження. 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 відсутністю 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., д.б.н. 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, опису матеріалів і методів, огляду літератури, 4 розділів власних досліджень та їх обговорення, узагальнень результатів та висновків. Список літератури включає 166 джерел. Дисертація ілюстрована 27 рисунками та 10 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ

1.1. Систематичне положення, структура та генетична організація вірусу інфекційної бурсальної хвороби.

Вірус інфекційної бурсальної хвороби (**I**nfectious **B**ursal **D**isease **V**irus, IBDV), за міжнародною класифікацією належить до родини *Birnaviridae*, роду *Avibirnavirus* [134]. Вперше вірус інфекційної бурсальної хвороби було виявлено у 1957 році у м. Гамборо, США, тому хвороба, яку він викликає також носить назву «хвороба Гамборо». За будовою це простий безоболонковий вірус, що містить дволанцюгову сегментовану РНК. Йому властивий ікосаедричний тип симетрії з триангуляційним числом $T = 13$. Діаметр капсиду складає 70 нм (рис.1.1) [24, 25].

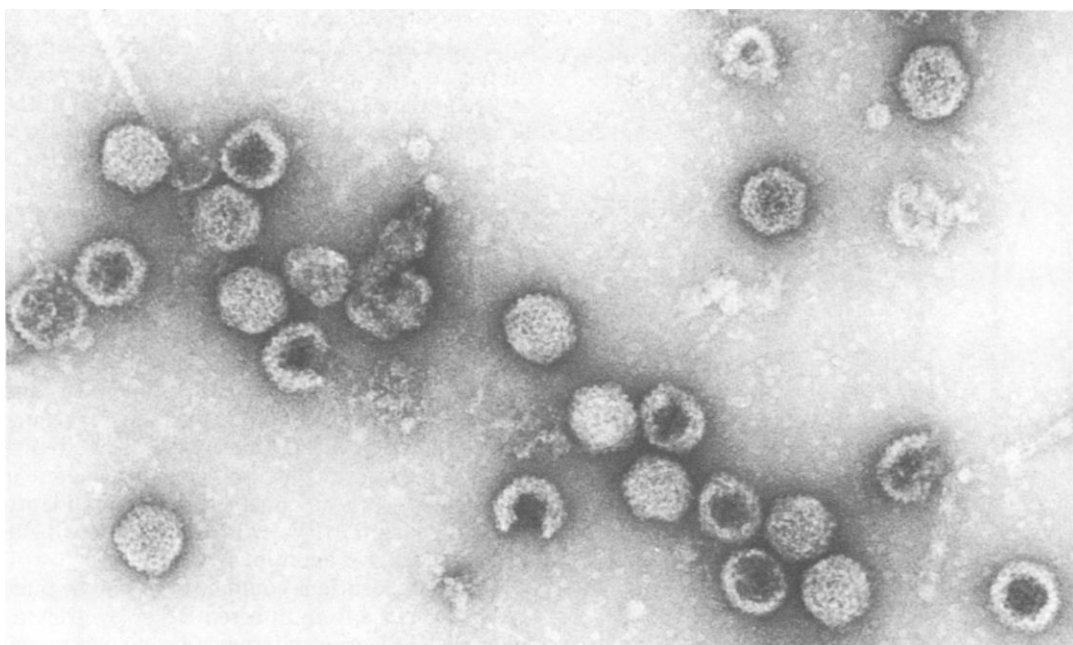


Рис. 1.1. Електронна мікрофотографія вірусу ІБХ (збільшення $\times 150000$) [93].

Вірус не містить ліпідів, тому не чутливий до дії органічних розчинників (наприклад ефіру, хлороформу) [75].

Геном вірусу інфекційної бурсальної хвороби представлений двома сегментами (А та В) дволанцюгової РНК (рис.1.2) [13, 18].

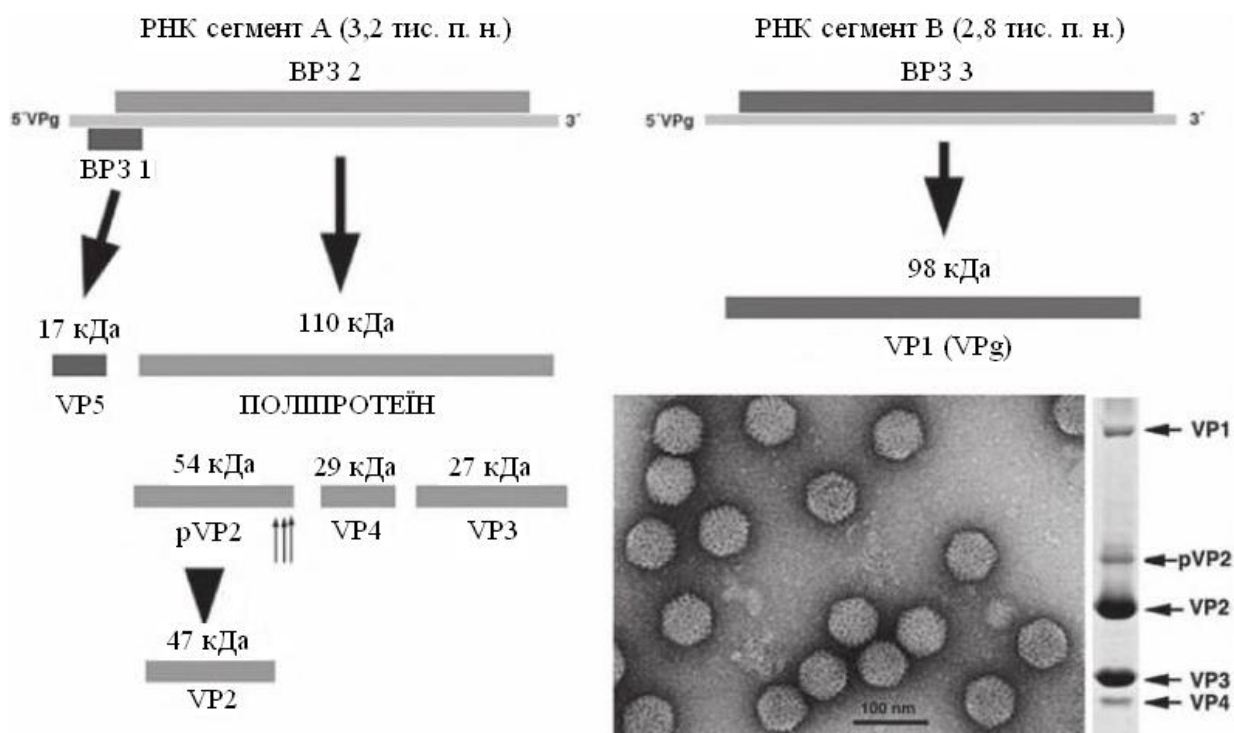


Рис.1.2. Організація геному та схема експресії генів вірусу ІБХ [18].

Сегмент А має розміри 3,2 тис. п.о. та містить 2 відкриті рамки зчитування (BP3), що частково перекриваються. Більша за розміром BP3 кодує поліпротеїн (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH) з молекулярною масою 110 кДа. Цей поліпротеїн у подальшому зазнає протеолізу вірусною протеазою VP4 з утворенням попередника капсидного протеїну pVP2 (54,4 кДа) та двох функціональних білків: VP3 (29 кДа) та VP4 (26,7 кДа). Зрілий структурний протеїн VP2 (47 кДа) утворюється унаслідок відщеплення 71 амінокислотних залишків від С-кінця протеїну pVP2, під дією власної ендопептидазної активності, вірусної протеази VP4 та протеаз клітини хазяїна. Менша за розміром BP3 сегменту А кодує білок

VP5 молекулярною масою 12 кДа, що необхідний для вивільнення з клітин та дисемінації вірусу [2, 18]. Сегмент В має розмір 2,8 тис. п.о. та містить одну відкриту рамку зчитування, що кодує вірусну РНК-залежну РНК полімеразу VP1. Молекулярна маса ферменту складає 97,8 кДа [35, 41].

1.2. Характеристика білків вірусу інфекційної бурсальної хвороби.

У вірусу ІБХ описано 5 протеїнів, а саме VP1, VP2, VP3, VP4 та VP5. Структуру віріону складають білки VP2 та VP3 (рис. 1.3). Натомість протеїни VP1, VP4 та VP5 належать до неструктурних [2].

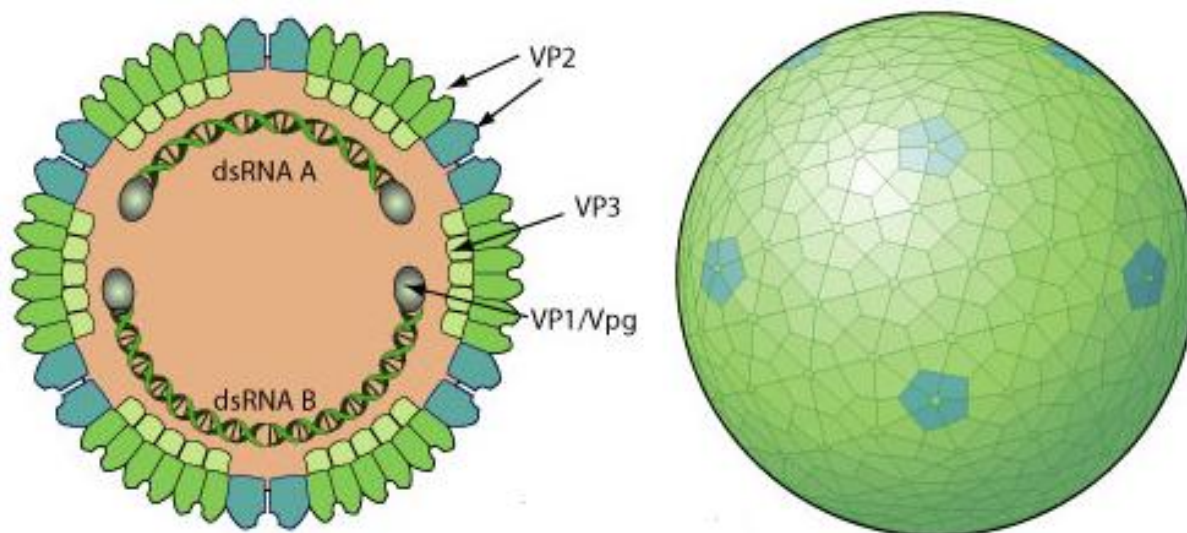


Рис. 1.3. Схематична будова вірусу інфекційної бурсальної хвороби [27].

Основним структурним білком вірусу ІБХ вважається протеїн VP2. Цей білок є основним антигеном вірусу, та містить антигенні детермінанти, що визначають серотип вірусу. Загалом на віріон припадає 780 копій білку, що формують 260 тримерів. Білок VP2 складається з 441 амінокислотних залишків. Він містить 3 домени: B(**b**ase), S(**s**hell) та P(**p**rojection) (рис. 1.4). B- та S- домени сформовані консервативними N- та C-кінцевими

послідовностями. Р-домен містить мотиви для зв'язування з рецепторами клітини хазяїна та гіперваріабельний регіон (hVP2). До складу останнього входять амінокислоти у положенні з 206 по 350 [37, 65].

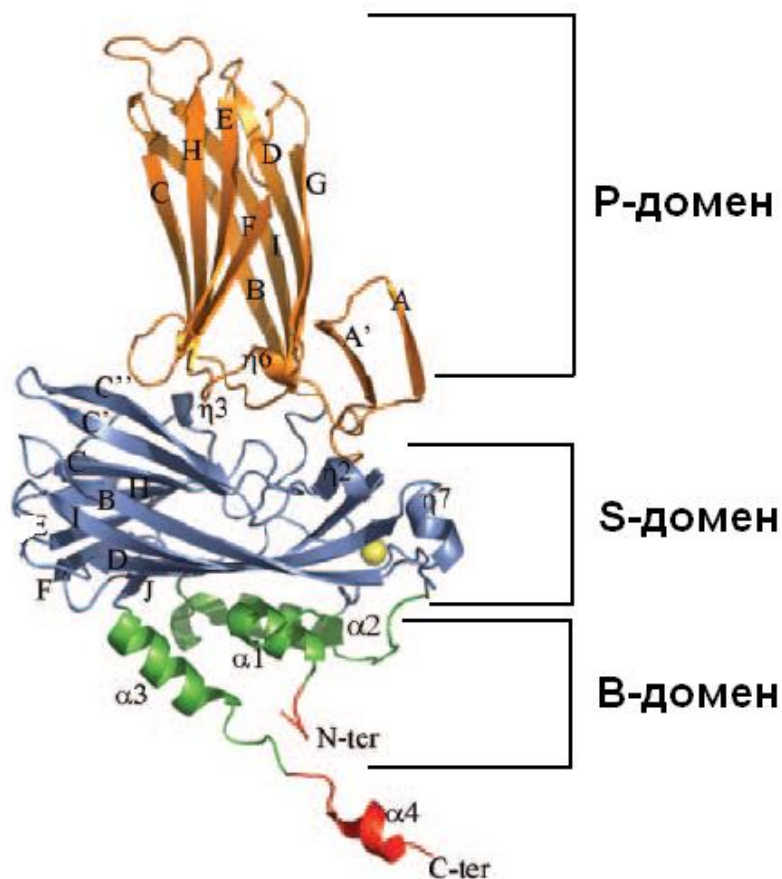


Рис. 1.4. Структурна організація білку VP2 [65].

Окрім протеїну VP2, у формуванні капсиду бере участь білок VP3. Його кількість у віріоні менша ніж білку VP2 і складає 600 копій. Білок VP3 є багатофункціональним. Основною функцією протеїну VP3 є формування правильної структури віріону [17, 19]. Він містить сайти для зв'язування із іншими вірусними білками. Зокрема, п'ять амінокислотних залишків, локалізованих на С-кінці білку VP3, взаємодіють з білком-попередником VP2 - pVP2 під час формування вірусних часток. Протеїн VP3 також взаємодіє із білком VP1. Ця взаємодія є необхідною для включення РНК-полімерази до

капсиду. Так, Valli зі співавторами [130] було показано, що білок VP3 є активатором транскрипції. Він необхідний для формування рибонуклеопротеїнового комплексу з вірусною РНК та задіяний у супресії механізмів РНК-сайленсингу клітини хазяїна та інгібування апоптозу [15].

До неструктурних протеїнів вірусу ІБХ належить вірусна протеаза VP4. Основною функцією цього ферменту є процесинг поліпротеїну NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH. VP4 належить до серин-лізинових протеаз. Необхідними для каталізу амінокислотами в активному центрі ферменту є залишки серину у положенні 652 та лізину у положенні 692. Під час процесингу поліпротеїну відбувається розрізання у сайтах Leu-511-Ala-Ala-513 та Met-754-Ala-Ala-756 між послідовностями pVP2-VP4 і VP4-VP3 відповідно. До складу віріону протеаза VP4 не входить [7, 64, 138].

Іншим неструктурним білком вірусу ІБХ є VP5. Цей протеїн не задіяний у реплікації вірусу, натомість є важливим для вивільнення вірусних часток з клітини [142]. Так, за умов *in vitro* було показано, що VP5 акумулюється у плазматичній мембрані В-лімфоцитів [89, 91]. Його характеризують як мембранний протеїн II класу, N-кінець якого обернений до цитоплазми, а С-кінець назовні клітини [72]. Вбудовування VP5 у плазматичну мембрану В-лімфоцитів призводить до її розриву, внаслідок чого реалізується цитотоксичний ефект [68, 70, 139].

РНК-залежна РНК-полімераза вірусу інфекційної бурсальної хвороби має назву VP1. У віріоні РНК-полімераза може перебувати як у вільному стані, так і бути ковалентно приєднаною до 5'-кінця кожного геномного сегменту РНК. Фермент VP1 складається з 3 доменів, а саме: N-кінцевого (амінокислоти з 1 по 167), центрального (амінокислоти з 168 по 658) та С-кінцевого (амінокислоти з 659 по 878) (рис. 1.5). N-кінець протеїну VP1 містить сайт гуанілювання та бере участь у праймуванні при реплікації вірусної РНК. Центральний домен характеризується наявністю 7 мотивів (А, В, С, D, Е, F, G), що створюють специфічну структуру, яка бере участь у реплікації РНК. Некодуючі регіони на 5'-кінцях кожного із сегментів містять

промоторні елементи, необхідні для ініціації реплікації вірусної РНК [71, 99, 128].

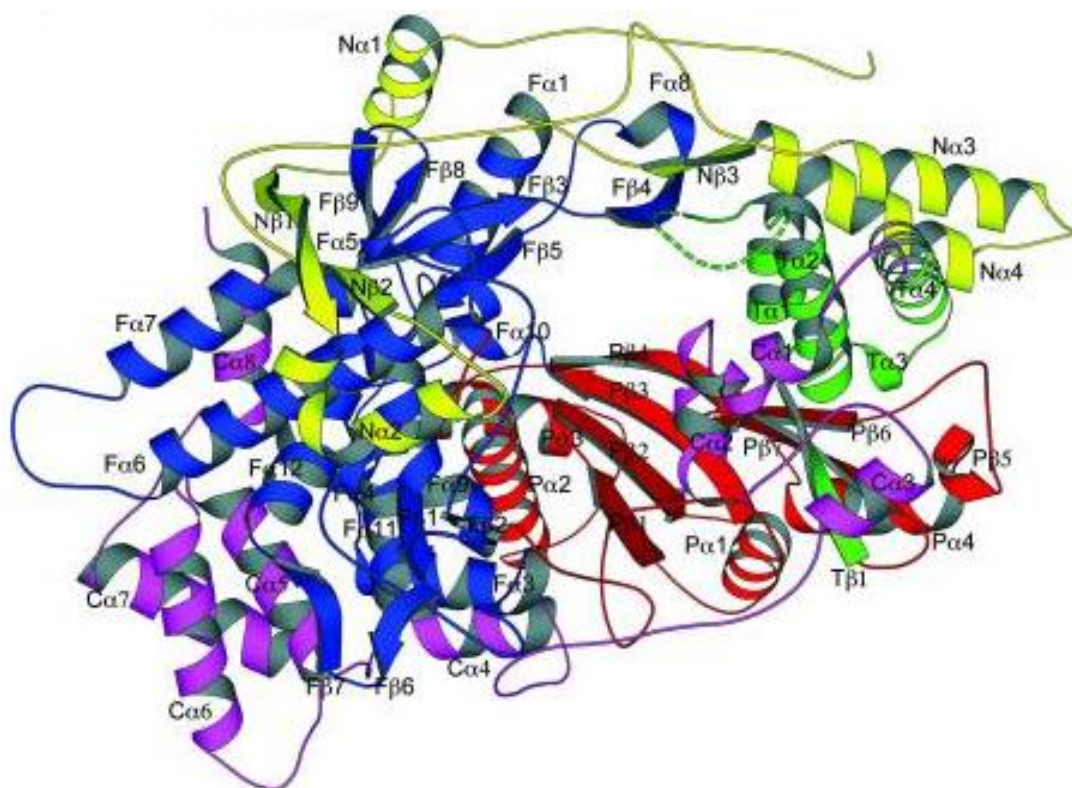


Рис.1.5. Структура РНК-залежної РНК-полімерази вірусу ІВХ (жовтий – N-кінцевий домен, фіолетовий – С-кінцевий домен, синій, червоний та зелений – центральний домен) [99].

Таким чином, вірус інфекційної бурсальної хвороби має просту будову. Віріон формується двома білками (VP2 та VP3), у той час як інші білки є неструктурними та виконують низку важливих функцій. Зокрема, необхідні для реплікації вірусної РНК, збірки віріонів та вивільнення їх із клітини. Детальна характеристика структури та функцій вірусних білків необхідна для визначення механізмів патогенезу вірусу ІВХ.

1.3. Особливості патологічного впливу вірусу ІБХ.

Вірус інфекційної бурсальної хвороби викликає горсте, висококонтагіозне захворювання у курей, наслідком якого часто є імуносупресія, з подальшим ризиком розвитку інших захворювань та неадекватною імунною відповіддю на вакцинацію [77, 121,140].

Вірус ІБХ має невеликий геном і, відповідно, невелику кількість протеїнів, яку він кодує. Це означає, що для того, щоб протистояти противірусним механізмам клітини хазяїна, кожен із протеїнів вірусу має виконувати комплекс функцій. Отже фактори вірулентності вірусу ІБХ є мультифункціональними, завдяки чому вони забезпечують реплікацію вірусу у клітинах мішенях, з подальшим розвитком захворювання [12, 108].

1.3.1. Молекулярно-генетичні детермінанти вірулентності вірусу ІБХ.

Для визначення молекулярних детермінант вірулентності вірусу ІБХ було просеквеновано та проаналізовано нуклеотидні послідовності сегментів РНК А та В багатьох штамів [9]. Далі здійснювали дослідження амінокислотної послідовності білків, зокрема поліпротеїну NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH перед формуванням кінцевих функціональних білків. Так у ізолятів із високою вірулентністю були виявлені амінокислотні заміни у pVP2 (сайти 441-442), а також заміни в сайтах 512-513 (сайт розрізання VP2- VP4) та 755-756 (сайт розрізання VP4- VP3) [119]. Крім цього заміни були виявлені в на С-кінці білку VP3. Вважається, що амінокислотні заміни у активному сайті протеази VP4 одного з відомих високовірулентних штамів вірусу ІБХ UK 661 відіграють важливу роль у його вірулентності. Мутації, що призводять до таких амінокислотних замін можуть впливають на зміну швидкості протеолізу, за рахунок чого, процес формування білку VP2 та збірка віріонів відбувається швидше. Це в свою чергу може пришвидшувати реплікацію вірусу в клітинах [131, 148].

Головною детермінантою вірулентності вірусу ІБХ є білок VP2. Саме в ньому відбувається більшість амінокислотних замін при атенуації штамів для створення вакцин. Дослідження із зворотної генетики показали важливість деяких амінокислотних залишків в білку. Так експериментально внесені мутації в позиції 253 (Q →H), 279 (D →N) та 284 (A →T) призводять до повної атенуації вірусу і зменшення його патогенності у курчат [69, 90, 131]. Yamaguchi із співавторами показали, що адаптація штаму ОКУМ до культур клітин призводить до появи мутацій в сайтах 279 (D →N) та 284 (A →T) [144]. Такі заміни були виявлені і в інших адаптованих до культур клітин штамів. Натомість деякі мутації, такі як заміна в позиції 253 (H →Q/N) призводять до значного підсилення вірулентності атенуєваних штамів вірусу ІБХ [37].

Показано, що сегмент В, який кодує вірусну РНК-залежну РНК-полімеразу (VP1) також відіграє роль у вірулентності вірусу. Так реасортанти вірусу ІБХ, що мають в геномі сегмента А від високовірулентного штаму та сегмент В від атенуєваного, в польових умовах показують зниження вірулентності у порів'язанні із диким типом вірусу. Також Jackwood визначив що високовірулентні штами вірусу характеризуються наявністю амінокислотного мотиву TND в білку VP1 у позиції 145, 146 та 147 [38, 41]. Окрім цього, показано, що наявність треоніну (Т) в позиції 276 пов'язана із зниженням патогенності вірусу. Водночас заміна треоніну на валін (V) в позиції 276 призводить до відновлення патогенності [23].

Щодо ролі неструктурних протеїнів, показано важливість білку VP5. Основною роллю цього протеїну є стримування сигналів апоптозу на ранніх стадіях інфікування та програмованої клітинної смерті на пізніх етапах вірусної реплікації [72]. Відомо, що на пізніх етапах інфікування спостерігається максимальне накопичення білку VP5 в цитоплазмі інфікованої клітини. Саме завдяки цьому білку відбувається вивільнення вірусних часток із інфікованої клітини на пізніх стадіях інфікування [142].

1.3.2. Механізми патогенезу та імуносупресивний ефект вірусу ІБХ.

Інфікування вірусом ІБХ здійснюється оральним шляхом. Він поглинається імунними клітинами шляхом ендосмного транспорту. З кишківника вірус транспортується до інших тканин за допомогою фагоцитів, зокрема резидентними макрофагами [28]. Інтенсивна реплікація вірусу відбувається у бурсі Фабріціуса [133]. Цільовими клітинами вірусу є IgM – продукуючі В-лімфоцити. Потрапляння вірусу всередину клітин здійснюється рецептор-опосередкованим шляхом. На поверхні IgM+ В-лімфоцитів є N-глікозилізовані поліпептиди, до яких може приєднуватись білок VP2 вірусу ІБХ, після чого відбувається ендозитоз. Крім цього, білок VP2 містить інтегрин-зв'язуючий мотив та здатен приєднуватись до $\alpha 4\beta 1$ інтегрину на поверхні незрілих В-лімфоцитів. За умов *in vitro* було показано, що вірус здатен зв'язуватись з поверхневими імуноглобулінами М, що теж сприяє проникненню віріону всередину клітини [76].

Через кілька годин після інфікування вірус швидко розповсюджується по фолікулам бурси. Поширення вірусу в інші лімфоїдні органи, такі як тимус, кістковий мозок, селезінка, Пейєрові бляшки, залози сліпої кишки і хардерієві залози може мати місце переважно під час інфікування високовірулентними штамми вірусу ІБХ [133].

На 48 годину після інфікування спостерігається суттєве запалення в бурсі. Вірусна реплікація призводить до руйнування лімфоїдних клітин у мозковому і кірковому шарах фолікулів. До 3-4 доби після інфікування всі бурсальні IgM+ В-клітини інфікуються вірусом та зазнають цитолітичних змін. За інфікування високо вірулентними штамми уражуються ще й Bu-1+, IgY+ та незрілі В-клітини. Показано, що Т-лімфоцити нечутливі до вірусної інфекції, але під час гострої фази захворювання тимус зазнає атрофії. Відбувається апоптоз Т-лімфоцитів, але докази щодо реплікації у них вірусу відсутні [2, 122]. Під час гострої фази інфекційного процесу значно знижується кількість IgM+ В-клітин та спостерігається інфільтрація бурси Т-

лімфоцитами. Останні продукують інтерферон- γ (IFN- γ), що активує макрофаги, які, у свою чергу, вивільняють прозапальні цитокіни, зокрема, такі як інтерлейкін-6 (IL-6) та оксид азоту (NO). Ці процеси підсилюють руйнування здорових клітин бурси (рис. 1.6). Окрім того, цитотоксичні Т-лімфоцити сприяють лізису клітин, в яких відбувається експресія вірусних антигенів [58, 114].

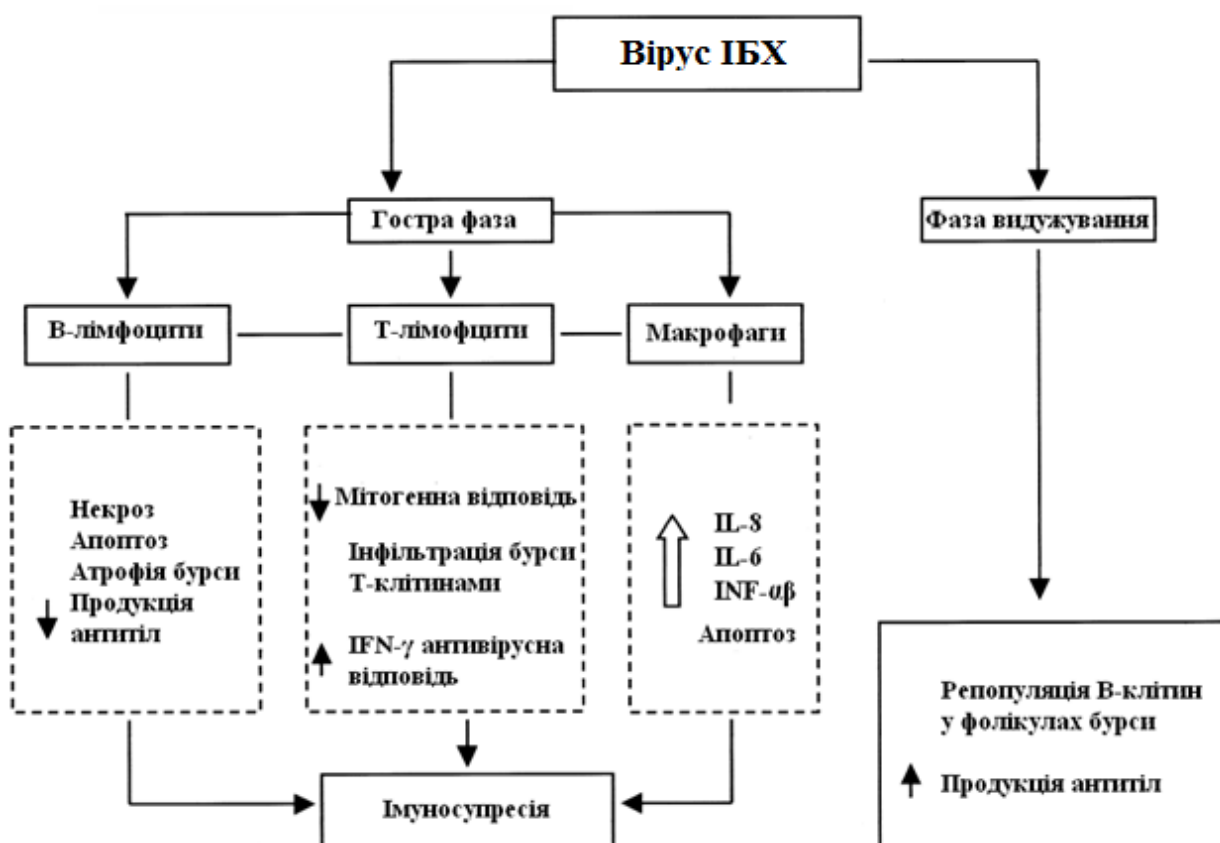


Рис. 1.6. Схема патогенезу та імуносупресивних ефектів вірусу інфекційної бурсальної хвороби [121].

У птахів, що переживають гостру фазу захворювання спостерігається повне відужування. Механізми цього процесу було досліджено із використанням SPF-курчат. Курчат віком 3 тижні заражали вірулентним штамом вірусу IBX. Вже через добу після інфікування спостерігалась інфільтрація бурси Т-клітинами. Найвищий рівень Т-клітин в бурсі припадав

на 7 день після інфікування. Через п'ять тижнів хвороби відмічались процеси відновлення фолікулів за рахунок стовбурових клітин фабрицієвої сумки та їх репопуляція IgM⁺ В-клітинами. До сьомого тижня 40 % фолікулів були відновленими. На 12 тиждень після інфікування фактично усі фолікули бурси були заселені В-клітинами, при цьому морфологія бурси поверталась до вихідного стану [56].

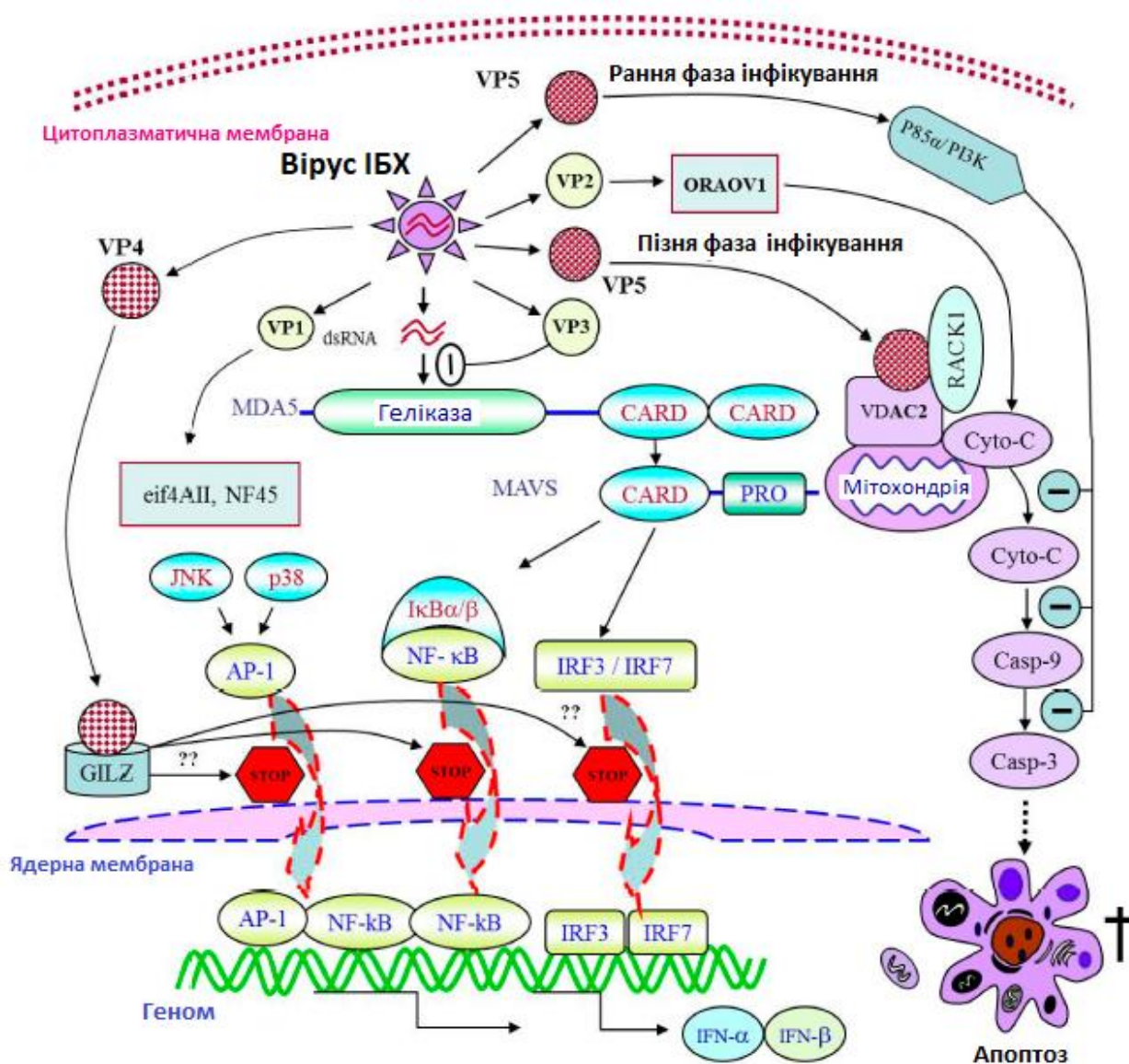


Рис. 1.7. Схема індукції апоптозу через взаємодію вірусних протеїнів із клітинними мішенями: NF-κB – ядерний транскрипційний фактор каппа; JNK: с-Jun-N-кінцева кіназа; AP-1: активуючий протеїн-1; IRF: фактор

регуляції інтерферону; PI3K: фосфоінозитол-3 кіназа; MAVS: мітохондріальний сигнальний протеїн; CARD: домен активування каспаз; eIF: еукаріотичний фактор ініціації; ORAOV1: гіперекспресований ген ORA1; GILZ: глюкокортикоїд активована лейцинова блискавка; VDAC2: вользалежний аніонний канал 2; RACK1: рецептор активованої протеїнкінази C1; IFN: інтерферон; Cyto-C: цитохром C; Casp: каспаза; dsRNA: дволанцюгова РНК. [111].

Вірус-опосередковане знищення В-клітин призводить до тяжкої гуморальної імуносупресії. Інфікування чутливих до вірусу курчат віком менше двох тижнів може призвести до повного знищення бурсальних В-клітин, внаслідок чого імунна система тварини не відновлюється (рис 1.7) [111].

1.3.3. Клінічні ознаки інфекційної бурсальної хвороби.

ІБХ призводить до тяжкої імуносупресії у 3-6-тижневих курчат. Інкубаційний період складає 2-4 дні. Першими ознаками клінічного захворювання є гостра депресія, птиця стає кволою, малорухливою, клює себе в області клоаки. Часто розвивається діарея, тремор, пір'я скуйовджене [2]. При інфікуванні курчат віком до 2-х тижнів клінічних ознак не спостерігається, але при цьому розвивається ураження бурси. Птиця може знаходитися в стані імуносупресії впродовж всього життя [140].

Уже через 24 години після інфікування з'являються ознаки ураження бурси. Інфікована фабрицієва сумка відрізняється наявністю желеподібного трансудату, що вкриває серозну поверхню. Орган збільшується у розмірі, набрякає та гіперемує. На його мукозній поверхні помітні некрози та петехіальні крововиливи. Селезінка та нирки збільшені. На поверхні селезінки помітні сірі некротичні плями. Нирки блідого кольору, в звивистих каналцях накопичуються уратні кристали. В м'язах часто спостерігаються

крововиливи [81]. В бурсі вірус може персистувати до 16 та 24 днів після інфікування (для класичних та варіантних штамів відповідно). Встановлено випадки виявлення у бурсі вірусної РНК через 6 тижнів після інфекційного захворювання [87].

Смертність при інфекційній бурсальній хворобі коливається від 2 до 100%, захворюваність в одному стаді може сягати 100 %. Високовірулентні штами призводять до летальності 70 % та уражують не тільки фабрицієву сумку, а й інші органи імунної системи, зокрема кістковий мозок та тимус [121].

1.3.4. Патотипи вірусу інфекційної бурсальної хвороби та характеристика уражень, які вони викликають.

Віруси інфекційної бурсальної хвороби розділяють на патогенні (1 серотип) та непатогенні (2 серотип).

Антигенні субтипи, або субгрупи вірусу інфекційної бурсальної хвороби поділяють на класичні вірулентні (наприклад, штами 52-70, STC, 002-73, Cu-1 wt), варіантні (зокрема, штами Delaware A, 1084A, Maryland) та високовірулентні (наприклад, штами UK661, Harb, K357/88, OKYM, ks та інші), а також атенуйовані (вакцинні штами). Залежно від патотипу вірусу спостерігаються відмінності у рівні смертності, перебігу захворювання та інтенсивності ураження бурси (рис. 1.8) [2].

Класичні вірулентні штами викликають запалення бурси, лімфоїдні некрози, що призводить до розвитку імунодефіциту та помірної смертності, пік якої досягає максимуму на третій день розвитку інфекційного процесу, хоча курчата можуть гинути і на 5-7-й день після інфікування. Смертність від класичних вірулентних штамів сягає 20 % [141]. Високовірулентні штами спричиняють швидку загибель великої кількості птиці з подібними симптомами для інфекцій, викликаних класичними вірулентними штамми. Рівень смертності при ураженні дуже вірулентними штамми перевищує

50 % [3]. Варіантні штами викликають значну атрофію бурси без ознак запалення, що характерно для інфікування класичними штамми та не викликають загибелі птиці [154].



Рис. 1.8. Класифікація штамів вірусу інфекційної бурсальної хвороби: А – розподіл вакцинних штамів за рівнем залишкової вірулентності; Б – різновиди штамів вірусу ІБХ, що належать до першого серотипу та їх патогенність [154].

Вакцинні штами вірусу ІБХ, що входять до складу живих вакцин також реплікуються у лімфоїдних органах інфікованої птиці, насамперед у фабрицієвій сумці, викликаючи її часткову атрофію. "Гарячі" або "середні-плюс" штами вірусів у вакцині найбільшою мірою пошкоджують бурсу та навіть зумовлюють імуносупресію у курчат [88, 101, 103]. Її використовують виключно у випадках циркуляції високовірулентних штамів вірусу ІБХ в господарстві.

Ураження бурси після вакцинації оцінюють під час гістологічного дослідження, визначаючи рівень її виснаження (у відсотках %). Вакцини, що викликають виснаження бурси менше ніж 50 %, вважають безпечними [154]

1.4. Особливості імунної відповіді на вірус IBX.

Інфікування вірусу IBX призводить до активації усіх ланок імунної системи. Проте рівень активації залежить від вірулентності штаму, віку птиці, імунного статусу та генетично-опосередкованої стійкості ураженої птиці [113].

Рання вроджена неспецифічна імунна відповідь проявляється інфільтрацією макрофагів, лейкоцитів та мастоцитів у бурсу Фабріціуса. Це регулюється хемокінами, такими як IL-8 та iNOS. Толл-подібні рецептори, такі як TLR-3 та TLR7, що знаходяться на поверхні вищезгаданих клітин запалення впізнають вірусну РНК. Таке впізнавання призводить до активації системи інтерферону та активації прозапальних цитокінів - IL-6, IL-1 β та IL-18 [58, 136]. Вивільнення цих цитокінів регулюється NF- κ B, рівень експресії якого підвищується в бурсі Фабріціуса під час гострої фази інфекції. Показано, що вірусне інфікування в свою чергу призводить до дерегуляції експресії інтерферонів (IFN- α/β) [92]. Важливу роль інтерферонів в захисті від вірусу було доведено експериментально. Показано, що обробка тварин інтерфероном зменшує інтенсивність реплікації вірусу та знижує інтенсивність ураження бурси [98].

Щодо гуморальної імунної відповіді, важливу роль відіграють вірус-специфічні антитіла [42]. Всі класи антитіл можуть синтезуватись у відповідь на вірусну інфекцію, але гуморальна імунна відповідь не може захистити уражених птахів від усіх антигенних варіантів вірусу. Дія нейтралізуючих антитіл напряму залежить від конформації нейтралізуючих епітопів вірусного білку VP2. Антитіла проти білку VP3 та конформаційно-незалежних доменів білку VP2 не мають нейтралізуючої дії [86].

Важливою ланкою гуморального імунітету є пасивний гуморальних захист курчат в перші тижні після вилуплювання за рахунок антитіл материнського походження. Показано, що курчата, що мають захисні титри антитіл материнського походження менш чутливі до інфікування у порівнянні із курчатами без такого пасивного захисту [14].

Ще однією ланкою імунітету, що відіграє важливу роль у противірусному захисті є клітинний імунітет. Оскільки під час гострої фази відбувається масове зниження В-лімфоцитів у бурсі, Т-клітини акумулюються у місці вірусної реплікації. Найбільша концентрація Т-клітин припадає на 7 день після інфікування. Основна роль Т-лімфоцитів полягає у зниженні інфікованих вірусом ІБХ клітин бурси та зниженні вірусного навантаження. Завдяки виділенню таких протеїнів як перфорин (PFN) та гранзим А (Gzm A) Т-клітинами, відбувається порушення структури мембрани інфікованих В-клітин та зниження концентрації вірусу в бурсі Фабріціуса [77].

1.5. Генетичні передумови штамового різноманіття вірусу ІБХ

Для РНК-вірусів характерне поняття квазівидів. Це явище за якого у популяції вірусу одночасно знаходяться різноманітні віруси, геноми яких представлені певною консенсусною послідовністю, проте відрізняються один від одного однією чи декількома мутаціями. Феномен квазівидів РНК вірусів відіграє дуже важливу роль у їх еволюції. Для вірусу ІБХ наявність різних квазівидів в одній популяції вакцинних та польових штамів було доведено методом ПЛР в реальному часі та аналізу кривих денатурації [2, 49].

Вірус інфекційної бурсальної хвороби, як і будь який представник РНК-вірусів, відрізняється високою мінливістю. Постійно виникають нові штами, що за антигенним складом відрізняються від тих, що циркулювали раніше. Вірус ІБХ зазнає генетичних варіацій задля уникнення імунної відповіді хазяїна, як наслідок, виникають нові варіанти вірусу. В цьому

процесі мають місце різні біологічні механізми, зокрема точкові мутації, реасортації та рекомбінації [22, 31]

Більшість мутацій, що призводять до зміни структури вірусного антигену відбуваються у гені VP2. Внаслідок інфікування птахів мутантними штамми вірусів, відбувається розвиток клінічної хвороби навіть за умови попереднього вакцинування. Проблема нових варіантів вірусу була широко досліджена у США. Так було показано, що 100 із 300 досліджених вірусних ізолятів не реагували із відомими моноклональними антитілами, що використовуються для виявлення різноманітних штамів вірусу ІБХ протягом останніх 20 років. Ці дослідження є прямим доказом антигенної варіабельності вірусу хвороби ІБХ [48].

Генетична реасортація вважається одним із можливих механізмів утворення високовірулентних штамів вірусу хвороби ІБХ, що виникли у західній Європі наприкінці 80-х рр.. ХХ ст.. Було описано декілька природніх реасортантів, у більшості із них РНК сегмент А походив від високовірулентних штамів, тоді як сегмент В – від атенуйованих вакцинних штамів. Проте, спроби створити штучних реасортантів внаслідок коінфекції двома штамми вірусу були невдалими. Процес реасортації може бути складним і залежить від багатьох факторів, зокрема часу, середовища, вакцинного тиску, тощо [108].

Гомологічна рекомбінація також вважається одним із механізмів, що призводить до виникнення нових груп високовірулентних штамів вірусу. Окрім цього, рекомбінація відіграє важливу роль у реверсії вакцинних атенуйованих штамів до вірулентності [22]. В механізмі реверсії до вірулентності також відіграють роль неточності в роботі вірусної РНК-полімерази, яка може здійснювати помилкові вбудовування нуклеотидів під час реплікації. Рекомбінації можуть призводити до появи антигенно та генетично різноманітних популяцій вірусу ІБХ та як наслідок виникнення нових груп високовірулентних штамів вірусу ІБХ. На сьогодні було показано, що більшість виявлених ізолятів є рекомбінантами за геном VP2.

Рекомбінації у гені, що кодує цей білок призводять до заміни амінокислот у доменах зв'язування з нейтралізуючими антитілами, внаслідок чого ефективність вакцинації значно знижується [38].

1.6. Методи діагностики вірусу ІБХ

Гострі клінічні спалахи ІБХ в повністю чутливих популяціях легко впізнаються. Характерними ознаками захворювання в цьому випадку є стрімкий початок, висока захворюваність, різкий ріст смертності та зникнення за 5-7 днів клінічних симптомів. Для підтвердження діагнозу проводять огляд бурси. Інфікування курчат будь-якого віку варіантними штамми можна визначити лише за гістологічними змінами бурси та шляхом виділення вірусу. Для діагностики вірусу ІБХ використовують вірусологічні, серологічні, імуногістохімічні та молекулярно-біологічні методи [87].

Вірус ІБХ виділяють на 9-11-денних курячих SPF-ембріонах. Найкращим шляхом інокуляції є хоріоалантоїсна оболонка. Максимальної концентрації вірус досягає через 72 години після інокуляції. Загибель ембріонів настає на 3-5 день [118]. Також використовують культури клітин, на яких спостерігають цитопатичний ефект. Є штами вірусів, адаптовані до фібробластів та нирок курячих ембріонів, до культури нирок кроля RK-13, культури Vero, MA-104, нирок дитинчат зеленої мавпи BGM-70. Вірус росте в культурі лімфоцитів та лімфобластоїдних В-клітинних лініях курей [90]. З метою виявлення вірусу ставлять біопробу на 21-25 денних курчатах, яким вводять вірус інтраназально чи іншими шляхами та спостерігають протягом 15 днів [118].

Вірус вивчають за допомогою електронної та імуносорбентної електронної мікроскопії. Застосовують серологічні методи – реакцію нейтралізації, імуноферментний аналіз, реакцію імунодифузії в агаровому гелі. Реакція нейтралізації з моноклональними АТ дозволяє визначити субтип вірусу та провести штамову диференціацію вірусу ІБХ. Обмеженнями цього

методу полягають в тому, що не всі польові ізоляти здатні реплікуватися у культурах клітин. Наявність вірусного антигену у бурсі можна також виявити за допомогою методу мічення флюоресцентними антитілами [97].

Для діагностики вірусу ІБХ застосовують молекулярно-біологічні методи, засновані на індикації вірусних нуклеїнових кислот в патологічному матеріалі. У 90-х роках ХХ століття було встановлено, що основною антигенною детермінантою вірусу є білок VP2. Зважаючи на це перші спроби дослідників класифікувати штами вірусу інфекційної бурсальної хвороби ґрунтувались на вивченні послідовностей нуклеотидів сегменту РНК, що кодує капсидний білок VP2. Так D.J. Jackwood запропонував систему класифікації штамів вірусу ІБХ [45, 46]. В основі цієї системи лежить порівняльний аналіз гіперваріабельного регіону гену VP2 вакцинних штамів та високовірулентних ізолятів вірусу з використанням ендонуклеаз рестрикції *MboI*, *SacI*, *SspI* та *MvaI*. Визначення та порівняльний аналіз первинної структури високоваріабельної ділянки гену VP2 вірусу ІБХ дозволяють найбільш точно встановити штамову належність виділеного ізоляту. Крім того, визначення ступеня подібності досліджених ізолятів та виділених раніше штамів дозволяє встановити можливе джерело інфекції та дослідити мінливість вірусу. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей польових та вакцинних штамів дозволяє виявити вакцинні штами, що мають найменші відмінності від польових у антигенно важливій ділянці VP2 [47].

Застосовують гібридизацію *in situ*, яка дозволяє визначити наявність нуклеїнової кислоти вірусу безпосередньо в клітині чи тканині. Метод є високо специфічним, що досягається завдяки використанню специфічного олігонуклеотидного зонду, комплементарного до РНК-мішені, з якою гібридується зонд. Зонди, які використовуються для цієї мети, можуть бути міченими радіоактивними нуклеотидами, біотином або діоксигеніном тощо. Якщо зонд радіоактивний, візуалізацію проводять авторадіографічно, якщо біотином, діоксигеніном, використовуються гістохімічні методики

візуалізації цих речовин, які інкорпоровані в олігонуклеотидний ланцюг зонду, що гібридизувався з РНК-мішенню [97].

З розвитком молекулярної біології з'явилися діагностичні методи, засновані на виявленні нуклеїнової кислоти вірусу в зразках, зокрема, ПЛР із етапом зворотної транскрипції. ЗТ-ПЛР [30, 55]. При розробці методу діагностики на основі ПЛР необхідно провести підбір праймерів та умов проведення реакції. Оптимальними є ті, при яких досягаються найвищі аналітичні та діагностичні показники чутливості та специфічності.

Факторами, що впливають на кінетику реакції та вихід ДНК-продукту (ефективність ампліфікації) є температура денатурації ДНК та гібридизації праймерів, ефективність зв'язування праймерів з матрицею, кількість циклів ампліфікації та час гібридизації, елонгації, денатурації, концентрація ДНК-полімерази, дНТФ, йонів магнію, зразку ДНК, праймерів, а також наявність у реакційній суміші інгібіторів чи посилювачів ампліфікації та неспецифічної «фонові» ДНК, що не містить специфічних для ампліфікації послідовностей. [30, 95].

Оптимізація умов проведення ПЛР з метою збільшення чутливості та специфічності реакції може досягатися по-різному, зокрема шляхом змін певних параметрів реакції, вказаних вище. Існують методологічні підходи для оптимізації умов проведення ПЛР, серед яких – ПЛР з гарячим стартом, touch-down та touch-up ПЛР, гніздова ПЛР та інші [117].

Виявлення вірусу методом ПЛР відбувається в декілька етапів. На першому етапі дослідження проводять виділення РНК з клінічного матеріалу. Далі виділену РНК використовують для реакції зворотної транскрипції з утворенням кДНК. Цей етап є необхідний, оскільки матрицею для ампліфікації в ПЛР може бути лише ДНК. На другому етапі отримана кДНК підлягає ампліфікації із специфічною парою праймерів, підбраною до певного регіону геному вірусу ІБХ. Метод є високочутливим, дозволяє швидко провести діагностику вірусу [10]. Найчастіше для виявлення вірусу

ІБХ за допомогою ЗТ-ПЛР ампліфікують частину гену VP2, інколи – VP1 та VP3 [67, 84, 128].

Ампліфікація гіперваріабельного регіону гену VP2 дозволяє в подальшому аналізувати отримані амплікони методом секвенування або за допомогою рестрикційного аналізу, виявляючи мутації, які можуть призводити до зміни антигенних та вірулентних властивостей вірусу. Таким чином для типування штамів вірусу ІБХ застосовують ЗТ-ПЛР для ампліфікації гіперваріабельного регіону гену VP2. Отримані амплікони аналізують за допомогою рестриктаз *Bst*NI та *Mbo*I [10]. Ця методика дозволяє ідентифікувати 6 різних профілів рестрикційних фрагментів, кожен з яких відповідає певній молекулярній групі, що включає в себе різні штами. Не всі штами вірусу ІБХ входять до складу цих 6 молекулярних груп, тому не завжди вдається розподілити їх за молекулярними групами. Крім того, штами, що належать до різних патотипів, можуть знаходитись в однаковій молекулярній групі. Є дані щодо переваги профілактичного застосування вакцинних штамів вірусу ІБХ, які належать до однієї молекулярної групи з польовим ізолятом вірусу. Тому визначення молекулярної групи, до якої належить польовий вірус, як і визначення його патотипу, є важливим для правильного підбору ефективної вакцини [31, 40, 50].

Для виявлення вірусу ІБХ крім ділянки гену VP2, можуть також ампліфікувати ділянки генів VP1 та VP3. Але немає остаточних даних щодо наявності в цих генах певних маркерів вірулентності, характерних для високо вірулентних штамів вірусу. Тому ці гени не можуть бути використані для типування виявлених штамів вірусу. Розроблені також методи виявлення нуклеїнових кислот вірусу ІБХ за допомогою ПЛР у реальному часі [36, 52, 67, 84]. За допомогою цього методу можна не лише виявити, а й кількісно оцінити навантаження вірусу у досліджуваному зразку.

Таким чином, існує багато різних діагностичних методів для виявлення вірусу ІБХ, але питання про диференціацію штамів ще залишається відкритим і потребує подальшого вивчення та дослідження.

1.7. Загальна характеристика вакцин проти вірусу інфекційної бурсальної хвороби

Вакцинація проти вірусу ІБХ є найбільш дієвим способом захисту від інфекції, тому цей метод застосовується дуже часто. Більшість комерційних вакцин належать до групи живих атенуйованих або інактивованих. В деяких країнах вже офіційно застосовуються нові типи вакцин, серед яких векторні, рекомбінантні та субодичні вакцини [2, 88].

1.7.1. Особливості живих атенуйованих та інактивованих вакцин.

Насьогодні основним засобом захисту птахів від інфекційної бурсальної хвороби є використання живих атенуйованих вакцин. Штами вірусів, які використовують для створення вакцин розмножуються у тканинах фабрицієвої сумки птахів та забезпечувати високий рівень антитіл проти вірусу. Втім такого типу вакцинам притаманний ряд недоліків, основними з яких є виснаження фолікул бурси птахів та реверсія атенуйованих вакцинних штамів до вірулентних [88, 144]. В Україні зареєстровано більше десяти живих вакцин, ефективність яких регулярно контролюють [158]. Показано, що вакцини створені із використанням штамів із низьким рівнем залишкової вірулентності не захищають від високовірулентних штамів, тому класифікація та характеристика ізолятів вірусу виявлених у птахів у місцях її промислового вирощування є необхідною для здійснення ефективної вакцинації [1, 16, 32, 54].

Живі вакцини моделюють природню інфекцію. Вони можуть реплікуватися і викликати формування клітинного та гуморального імунітету в організмі хазяїна. Вони не потребують ад'ювантів для ефективності та підходять для масових вакцинацій у великих господарствах [2].

Живі вакцини створюють із класичних та варіантних штамів пасажуванням вірусів у культурах клітин або на курячих ембріонах [69, 147]. Залежно від рівня атенуації або залишкової вірулентності для SPF курчат атенуовані вакцинні штами прийнято класифікувати на «м'які», «середні» або «середні плюс» [2].(табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Основні характеристики вакцинних штамів із різним рівнем залишкової вірулентності

Тип вакцинного штаму	Швидкість колонізації бурси вакцинними штамми, (день після вакцинації)	Граничний титр антитіл материнського походження, за якого зберігається імуногенність (ELISA)	Ступінь виснаження бурси, (%)
«М'які»	7 – 14	150-300	40 – 50
«Середні»	6 – 9	500-800	60 – 70
«Середні-плюс»	5 – 7	800-1000	80 – 90

Вакцинні штами вірусу ІБХ реплікуються в лімфоїдних органах інфікованої птиці, насамперед у бурсі, викликаючи її часткову атрофію. «М'які» вакцини є найменш ефективними у присутності високого рівня антитіл материнського походження. «Середні» та «середні плюс» вакцини здатні долати високі рівні антитіл та забезпечувати кращий захист від вірулентних штамів вірусу. «Середні плюс» штами вірусів, що входять до складу вакцин найбільшою мірою пошкоджують бурсу та можуть навіть зумовлювати імуносупресію у курчат. Такі вакцини використовують для захисту птиці від високовірулентних штамів вірусу [2].

Однак, незважаючи на високу ефективність, живі вакцини характеризуються низкою недоліків. Головним із них є можливість реверсії до вірулентності атенуйованих вакцинних штамів. Це може призводити до хвороби птиці та значних втрат продуктивності. Не виключається також горизонтальне перенесення вакцинних штамів [43].

Подолати побічні ефекти живих вакцин допомагає використання інактивованих. Їх часто використовують після одноразового введення живої вакцини для зменшення ризику прояву імуносупресії. Інактивовані вакцини місять антигени, цілі вірусні частки вірусні субодиниці або рекомбінантні вірусні антигени, не здатні до реплікації. Ефективність таких вакцин підсилюється з використанням ад'ювантів. Найчастіше інактивовані вакцини формують як водно-олійні емульсії та використовують одразу декілька антигенів. Було показано, що такі вакцини здатні викликати специфічну Т-клітинну відповідь [2].

1.7.2. Характеристика субодиничних вакцин.

В останні десятиліття багато досліджень спрямовано на отримання рекомбінантних систем для синтезу структурного протеїну VP2 (rVP2). Зважаючи на те, що білок VP2 є також і антигенною детермінантою, його активність безпосередньо залежить від конформації. Дослідження показали, що у денатурованому стані протеїн VP2 втрачає здатність викликати секрецію нейтралізуючих антитіл у курей. Денатурований протеїн не відновлює свої властивості навіть після ренатурації. Для того, щоб отримати білок VP2 у нативному стані було розроблено кілька систем експресії з використанням *Escherichia coli*, дріжджів, вірусу віспи птахів та вірусу Semliki Forest. Деякі субодиничні вакцини проти вірусу ІБХ вже ліцензовані та масово застосовуються. Зокрема, широкого розповсюдження набули вакцини створені на основі білку VP2, для експресії якого використовують дріжджі *Pichia pastoris* [2].

Різновидом субодиничних вакцин також є VLPs (**v**irus **l**ike **p**articles). VLP – це вірусні частинки, в яких відсутній геном, через це вони втрачають здатність до реплікації. У таких вірусних частинках протеїни зберігають нативну конформацію, тому вірусні антигенні детермінанти зберігають здатність викликати синтез нейтралізуючих антитіл. Вакцини такого типу знаходяться на стадії розробки, оскільки процес налагодження систем для експресії VLP є дуже складним. Втім, наразі уже показано, що VLP здатні викликати вищий рівень секреції нейтралізуючих антитіл, порівняно з частинами вірусного капсиду чи поліпротеїн VP2-VP3-VP4. З огляду на ці результати VLP-вакцини вважаються більш прогресивними та ефективними з точки зору захисту птиці від інфекційної бурсальної хвороби [27, 39].

Іншим підходом для створення субодиничних вакцин є використання мімотопів. Мімотопи – це хімічно синтезовані пептиди, що мають структуру, подібну до епітопів вірусного білку VP2. Білки, що містять такі мімотопи можуть використовуватись у якості субодиничних вакцин, оскільки здатні викликати синтез специфічних нейтралізуючих антитіл та забезпечувати захист проти інфекційної бурсальної хвороби. По аналогії з інактивованими вакцинами, недоліком субодиничних вакцин є необхідність використання ад'ювантів та багаторазової вакцинації [2].

1.7.3. Властивості імунокомплексних вакцин.

Новим напрямком розробок вакцин проти вірусу IBX є створення імунокомплексних вакцин. До складу цих вакцин входить суміш специфічних антитіл та вакцинного штаму вірусу IBX. Антитіла, у свою чергу, відбирають із сироватки крові гіперімунізованих курей [36, 88]. Найбільшою перевагою таких вакцин є те, що вони підходять для вакцинації *in ovo* (на 18 день інкубації) для масового використання у господарствах. Також такі вакцини можна вводити курчатам підшкірно у перший день життя. Такий тип вакцинування є більш систематизованим та забезпечує

захист усіх птахів, на відміну від живих вакцин, основним засобом адміністрації яких є впоювання. Ряд досліджень показали, що імунокомплексні вакцини є ефективними навіть за наявності у курчат антитіл материнського походження. Завдяки цьому вони забезпечують вищий рівень захисту, порівняно з живими атенуєваними вакцинами. Також *in ovo* вакцинація із використанням імунокомплексних вакцин проти ІБХ викликає більшу, порівняно із іншими вакцинами, активацію гермінативних центрів у селезінці, і як результат більше активування В-лімфоцитів [88].

1.7.4. Характеристика ДНК-вакцин.

Імунну відповідь на чужорідний антиген можна викликати за допомогою ДНК, що транспортують до клітин хазяїна. Такий тип вакцинування долає проблему, викликану присутністю специфічних антитіл, що одразу знешкоджують внесені антигени [79]. До складу ДНК-вакцин зазвичай входить експресійний вектор (плазмід), що складається із: транскрипційного промотора, бажаного гену, транскрипційного термінатора та сайту поліаденілювання. Для ДНК-вакцин проти ІБХ створювали вектори, що містили кДНК гену VP2 або всього поліпротеїну VP2-VP3-VP4. Після того як такий вектор потрапляє до клітини, в ній *de novo* відбувається синтез вірусного антигену, що мімікрує вірусну інфекцію та викликає імунну відповідь. Використання вакцин із клонуваним геном повного поліпротеїну викликає секрецію вищих рівнів нейтралізуючих антитіл, ніж за використання лише гену VP2 [110]. Показано, що ДНК-вакцини здатні викликати секрецію нейтралізуючих антитіл, а також Т-клітинну імунну відповідь. Такі вакцини підходять для *in ovo* вакцинації [100]. Для того, щоб забезпечити доставку кДНК до клітин хазяїна оральним шляхом інколи використовують трансформовані бактерії, зокрема: *Lactococcus lactis*, *Salmonella typhimurium* та *Escherichia coli*. Вакцинація такого типу не завжди забезпечує належний захист проти вірусу ІБХ. Це пояснюють насамперед із

труднощами, пов'язаними із секрецією або транслокацією вірусного антигену через клітинну стінку бактерій до клітин хазяїна. Для підвищення ефективності ДНК-вакцин використовують ад'юванти. Такі вакцини знаходяться на стадії розробки та поки що широко не використовуються [79].

1.7.5. Особливості векторних вакцин.

У випадку векторних вакцин використовуються генетично видозмінені штами вірусів, у яких ген від донора інкорпорується у геном іншого вірусу (вектору). Внаслідок цього формується вірус, що комбінує антигенні детермінанти збудників одразу двох захворювань. Використання таких вакцин дозволяє імунізувати тварин одночасно проти двох збудників. Як вектори для вакцин проти інфекційної бурсальної хвороби вже використовуються вірус віспи птахів, вірус хвороби Ньюкасла, вірус хвороби Марека, аденовірус птахів, герпесвірус та бактеріофаг Т4. У геном цих вірусів вбудовували ген VP2 вірусу IBX. У клітинах організму змінені віруси реплікуються подібно до вакцинних штамів, що використовуються для живих вакцин. В результаті отримані химерні віруси окрім свої генів експресують антигенний білок VP2, внаслідок чого у імунізованих птахів формується імунітет як до векторного вірусу, так і до вірусу IBX [14]. Деякі векторні вакцини вже ліцензовані, наприклад «HVT plus IBDV-VP2», що захищає одразу від хвороби Марека та інфекційної бурсальної хвороби. Цю вакцину використовують для вакцинації *in ovo* або у перший день життя курчат. Порівняно із живими вакцинами, векторні вакцини ефективні навіть у присутності антитіл проти вірусу IBX материнського походження та не викликають виснаження бурси птахів, при цьому забезпечують надійний захист проти інфекційної бурсальної хвороби [2]. Зважаючи на вищевикладене, вакцини даного типу можуть стати основним методом профілактики IBX.

Таким чином, аналіз літературних джерел продемонстрував значну поширеність та штамову різноманітність вірусу ІБХ, що в свою чергу призвело до появи різних вакцин для профілактики захворювання. Ці дані свідчать про важливість досліджень в напрямку оптимізації схем вакцинації та молекулярно-біологічної діагностики інфекційної бурсальної хвороби.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження та його характеристика

2.1.1. Загальна характеристика об'єкту дослідження.

Об'єктом дослідження були ізоляти вірусу ІБХ, виділені зі зразків органів уражених курей, а також комерційних вакцин, зареєстрованих в Україні. РНК вірусу виділяли із патологічного матеріалу відібраного від птахів із клінічними ознаками інфекційної бурсальної хвороби, віком від 5 до 48 днів. На наявність вірусу були досліджені птахи із 16 господарств, 10 областей України, а саме Київської, Черкаської, Львівської, Вінницької, Волинської, Дніпропетровської, Луганської, Тернопільської, Харківської та АР Крим. Для молекулярно-біологічних досліджень РНК вірусу було виділено із 120 зразків.

Як об'єкт порівняння використовували вакцинні референс-штами вірусу інфекційної бурсальної хвороби, що входять до складу вакцин зареєстрованих в Україні:

-вакцини, що були взяті для виділення вірусу ІБХ:

- 1) Полімун ІБХ (Біотестлаб, Україна), штам МВ/5 - $\geq 10^2$ ЕІД₅₀,
- 2) Полімун ІБХ+ (Біотестлаб, Україна), штам МВ/3 - 10^2 ЕІД₅₀,
- 3) Полімун ІБХ Лайт (Біотестлаб, Україна), штам МВ/20 - 10^2 ЕІД₅₀,
- 4) Хібрагамборо (Ніпра, Іспанія), штам GM97- 10^2 ЕІД₅₀,
- 5) Avipro Precise (Lohmann Animal Health GmbH, Німеччина), штам LC-57 – 10^3 ЕІД₅₀.

З огляду на обмежену кількість секвенованих послідовностей геному вакцинних штамів у базах GenBank, у дослідженні використовували також деякі вакцинні штами, нуклеотидних послідовностей які не зареєстровані в базах GenBank:

- 1) Nobilis 228E (MSD, Нідерланди), штамп 228E (AF457204),
- 2) CEVAC «Winterfield-2512» (CEVA, Франція), штамп Winterfield-2512 (DQ355819),
- 3) Nobilis D78 (MSD, Нідерланди), штамп D78 (AJ586963),
- 4) CEVAC IBD 2512 L (CEVA, Франція), штамп Lukert (AY918948),
- 5) Poulvac Bursa F (Fort Dodge, США), штамп V877 (AJ878882) (США),
- 6) Tabic MB (Phibro Vaccines, Ізраїль), штамп MB (AY739669).

Для виявлення антитіл до вірусу ІБХ було обрано 83 господарства із 20 областей України. Інформація про клінічні ознаки захворювання надавалася ветеринарними лікарями господарств. Загалом протягом 2014-2016 років було проаналізовано 20126 зразків сироватки крові відібраних від курей (*Gallus domesticus*), вік яких становив від 1 до 506 днів.

Для філогенетичного аналізу виявлених ізолятів вірусу використовували нуклеотидні послідовності гіперваріабельного регіону гену VP2, що кодує капсидний білок VP2 високовірулентних референс-штамів вірусу інфекційної бурсальної хвороби з такими кодами доступу даних GenBank: UK661 - Великобританія (AJ878898), K406/89 - Єгипет (AF159218), HK46 - Китай (AF051838), 1986 - Нідерланди (Z25482), SP/31/02 - Іспанія (AY770593), CU-1 - Німеччина (AF362771), Cro-Pa/98 - Хорватія (EU184689), STC - США (AY819701)

2.1.2. Відбір зразків для молекулярно-біологічних і гістологічних досліджень.

Для відбору зразків проводили аналіз морфолого-патологічного стану птахів, взятих для дослідження лабораторії патолого-анатомії Центру Ветеринарної Діагностики з метою виявлення і опису зовнішніх ознак захворювання. Для цього проводили розтин трупів птахів, аналіз, фіксування та фотографування патологічних змін органів та систем органів курей. За

виявлення таких проявів як виснаження, набряклість та гіперемованість бурси, наявність желеподібного трансудату, крововиливів на клоакальній сумці (рис. 2.1) та, інколи, у м'язах, збільшенні розмірів нирок та селезінки проводили відбір патологічного матеріалу для подальших молекулярно-біологічних та гістологічних досліджень. Так, для гістологічного дослідження відбирали зразки тканин без ознак автолізу, що не підлягали замороженню. Таким чином відбирали зразки бурс Фабріціуса. Органи з видимими патологічними змінами тканин відбирали на межі з нормальними частинами, щоб були захоплені здорові і змінені ділянки. Розмір зразків бурс становив 2-4 см. Відібрані зразки одразу переносили у контейнери з 10 % розчином формаліну.

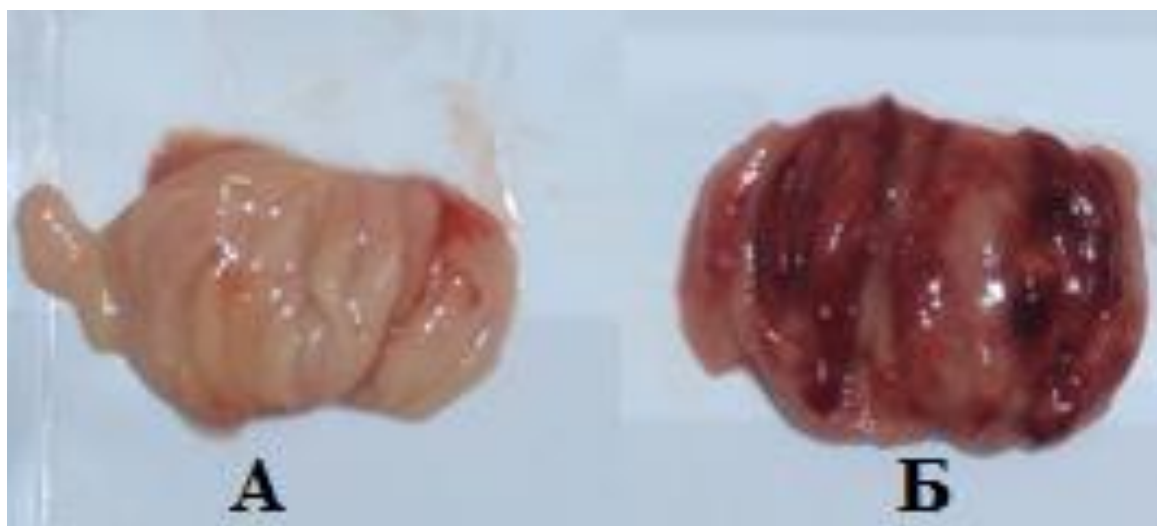


Рис. 2.1. Зображення бурси Фабріціуса: А – нормальний стан органу, Б – орган за ураження вірусом інфекційної бурсальної хвороби.

Для молекулярно-біологічних досліджень відбирали зразки бурс, лімфатичних вузлів, селезінки та нирок, які поміщали у сухі пластикові чашки Петрі та зберігали за температури – 20 °С.

Контейнери та чашки Петрі з відібраними для досліджень зразками маркували із зазначенням дати відбору зразку, віку тварини, назви господарства та області.

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання, що були використані у роботі

Під час дослідження було використано такі матеріали та реактиви:

– набір реактивів для виявлення антитіл до вірусу ІБХ у сироватці крові IDEXX IBD Ab Test (IDEXX, США), до складу якої входять розчин для промивки (wash concentrate), розчин для розведення сироваток крові (sample diluents), сироватки крові з антитілами до вірусу ІБХ (IBV-positive control) та без антитіл до вірусу ІБЗ (Negative control);

– набір для виділення РНК та ДНК «Рибо-сорб» (Амплісенс, Росія), до складу якого входять: розчин для лізису, розчин для відмивання 1, розчин для відмивання 3, розчин для відмивання 4, сорбент, РНК-буфер;

– набір для виділення РНК та ДНК «MagVet Universal Isolation Kit», до складу якого входять розчини N1, M1, NM2, NM3, NM4, NM6 та NM LSI Beads;

– набір реактивів для проведення зворотної транскрипції «Реверта-L» (Амплісенс, Росія), до складу якого входять: RT-G-mix 1, RT-mix, ревертаза (MMIv), ДНК-буфер;

– реактиви та матеріали для проведення ПЛР: суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (10 мМ dNTP-mix (Thermo Scientific, Литва), DreamTaq ДНК-полімераза (5 од ак/мкл) (Thermo Scientific, Литва), 2,5 мМ магнію хлорид (Thermo Scientific, Литва), легкоплавкий віск для ПЛР (Амплісенс, Росія);

– ферменти для проведення реакції рестрикції: Eco911 (Thermo Scientific, Литва), MboI (Thermo Scientific, Литва), SacI (Thermo Scientific,

Литва), Mval (Thermo Scientific, Литва), Sspl (Thermo Scientific, Литва), BspMI (Thermo Scientific, Литва);

– реактиви та матеріали для здійснення електрофорезу: агароза для електрофорезу (Thermo Scientific, Китай), етидіум бромід (Sigma, США), 2,5 М NaOH (Sigma, США); барвник (6X Orange Loading Dye) (Thermo Scientific, Литва), маркер молекулярних мас «O`GeneRuler 50 bp DNA Ladder» (Thermo Scientific, Литва);

– набір для очищення ДНК з агарозного гелю «mi-Gel Extraction Kit» (Metabion, Німеччина), до якого входять буфер для екстракції, буфер для відмивання, пластикові колонки із сорбентом;

– матеріали та реактиви необхідні для фіксації зразків бурс та приготування мікрорізів: формалін 37 % («чда», Росія), спирт 96 % (ВАТ ВВП «Укрзооветпромстач», Україна), О-ксилол («чда», Україна), парафін - Paraffin type 6 (Richard-Allan Scientific, США); барвники еозин-Ү та гематоксилін (Richard-Allan Scientific, США), середовище для фіксування гістологічних зрізів – Mounting Medium Glue (Richard-Allan Scientific, США), імерсійна рідина (Richard-Allan Scientific, США);

- референс-зразки:

- 1) Суспензія тканини бурси відібраної від 6-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини CEVAC IBD-L негативна на вірус IBX;
- 2) Суспензія тканини бурси відібраної від 4-тижневого SPF-курча позитивна на вірус IBX;
- 3) Суспензія тканини бурси відібраної від 5-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини Poulvac Bursine 2 позитивна на вірус IBX;
- 4) Суспензія тканини бурси відібраної від 6-тижневого SPF-курча інфікованого vv IBDV D6948 позитивна на вірус IBX;
- 5) Суспензія тканини бурси відібраної від 4-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини Nobilis D78 позитивна на вірус IBX;

- 6) Суспензія тканини бурси відібраної від 6-тижневого SPF-курча інфікованого європейським варіантним штамом вірусу ІБХ IBD 10191 позитивна на вірус ІБХ;
- 7) Суспензія тканини бурси відібраної від 5-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини Nobilis 228E позитивна на вірус ІБХ;
- 8) Суспензія тканини бурси відібраної від 5-тижневого SPF-курча інфікованого європейським варіантним штамом вірусу ІБХ IBD 1251 позитивна на вірус ІБХ;

Буферні розчини:

ПЛР-буфер (концентрований десятикратний буфер «DreamTaq Green Buffer», десятикратний буфер «DreamTaq Buffer») (Thermo Scientific, Литва); буфер для ендонуклеаз рестрикції (концентрований десятикратний буфер «Fast Digest Buffer») (Thermo Scientific, Литва); трис-боратний буфер (ТБЕ, Амплісенс, Росія).

Обладнання яке було використано у роботі:

– ламінарний бокс 2 класу біологічної безпеки (Telstar, Іспанія), бокс абактеріального повітряного середовища (Lamsystems, Росія), екстрактор нуклеїнових кислот «Bead Retriever» (Invitrogen, США), термостат для мікропробірок з температурним режимом 25 – 100 °С (Біоком, Росія); вакуумний відсмоктувач (Biosan, Латвія), мікроцентрифуга «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина); центрифуга-вортекс (Біоком, Росія); автоматичні мікродозатори на 10, 20, 100 та 1000 мкл (Eppendorf, Німеччина), термоциклер (ампліфікатор) (Eppendorf, Німеччина); камера для горизонтального електрофорезу (Scie-Plas, США); ультрафіолетовий транслюмінатор для перегляду гелів (Vilber Lourmat, Німеччина);

– станція попередньої обробки та проведення тканин STP-120 (Microm, Німеччина), мікромом НМ 340-Е (Microm, Німеччина), ножі для гістологічних досліджень Sec-130 (Microm, Німеччина), станція

транспортування зрізів та водяна баня (Microm, Німеччина), станція заливки парафіну EC-350 I (Microm, Німеччина), кріоблок EC350 II (Microm, Німеччина), мікроскоп світловий Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Німеччина), мікрохвильова піч (Samsung, Корея), цифровий фотоапарат (Cannon, Японія), пластикові касети Turboflowe (Microm, Німеччина).

– станція для промивання плашок (Sunrise TECAN, Швейцарія), рідер для плашок (TECAN, Швейцарія), термостат (Biosan, Латвія).

2.3. Серологічні методи дослідження. Імуноферментний аналіз.

Для детекції антитіл до вірусу ІБХ використовували метод непрямого імуноферментного аналізу, який здійснювали за допомогою комерційного тест-набору IDEXX IBD Ab Test (IDEXX, США) відповідно до інструкції виробника.

2.3.1. Приготування реагентів та зразків.

Перед початком роботи всі компоненти набору прогрівали до кімнатної температури (20-24 °C). Приготування миючого розчину проводили шляхом розчинення 30 мл концентрованого розчину для промивання (wash concentrate, IDEEX) у 270 мл дистильованої води. Розчин доводили до кімнатної температури та гомогенізували для розчинення кристалів. 5 мкл сироватки крові розчиняли в 245 мкл буферу для розведення (sample diluents, IDEEX). Кров, відібрану від птахів, центрифугували 15 хвилин за 1000 g. для отримання сироватки. Готову сироватку яку попередньо розводили розчинником у співвідношенні 1:500 використовували для дослідження. Всю послідовність аналізу здійснювали за рекомендаціями виробника.

В лунки із засорбованими антигенами (Recombinant IBD antigens Coated Plates) вносили, не торкаючись дна лунки, по 90 мкл буферу та по 10 мкл, попередньо розведеної, сироватки крові. В лунки з позитивним та негативним

контролем вносили по 100 мкл сироваток крові, що входили в набір тест-системи (IBD-positive control, Negative control). Плашку із засорбованими антигенами та внесеними зразками поміщали в термостат (Biosan) при температурі 20 °C та інкубували протягом 30 хвилин. Після прогрівання проводили п'ятикратну промивку зразків попередньо приготованим розчином для промивки з використанням автоматичної станції для промивки плашок, (Sunrise TECAN). Після кінцевої аспірації, яка завершувала останню промивку, видаляли залишки рідини з лунок, шляхом витрушування з плашки на адсорбуючий папір. За допомогою багатоканальної піпетки в лунки вносили по 100 мкл кон'югату. Плашку із внесеним кон'югатом поміщали в термостат при температурі 20 °C та інкубували протягом 30 хвилин. Після прогрівання проводили повторну п'ятикратну промивку зразків попередньо приготованим розчином для промивки з використанням автоматичної станції для промивки плашок (Sunrise TECAN), після чого вносили по 100 мкл барвника в кожен лунку за допомогою багатоканальної піпетки.

Значення оптичної густини визначали за допомогою імуноферментного аналізатора (Sunrise Tecan, Швейцарія) за довжини хвилі 650 нм. Обчислення результатів проводили за допомогою програмного забезпечення xCheck (США), в яке були внесені наступні формули для підрахунку визначення середнього значення негативного контролю $N_{cx} = (N_{c1} A_{650} - N_{c2} A_{650})/2$, N_{c1} – значення першого негативного контролю; N_{c2} – значення другого негативного контролю; визначення середнього значення позитивного контролю $P_{cx} = (P_{c1} A_{650} - P_{c2} A_{650})/2$, де P_{c1} - значення першого позитивного контролю P_{c2} - значення другого позитивного контролю; та формулою калькуляції для зразку $S/P = (зразок A_{650} - N_{cx}) / (P_{cx} - N_{cx})$.

Для перерахунку оптичної щільності в титр антитіл використовували формулу, що була надана фірмою-виробником тест-системи:

$$\text{Log}_{10}\text{Titer} = 1,09 (\log_{10}S/P) + 3,36, \text{ де } 1,09 - \text{slope}; 3,36 - \text{intcept}.$$

Значення титрів вище 396 вважали позитивними.

2.4. Молекулярно-біологічні методи дослідження вірусу ІБХ.

2.4.1. Підбір праймерів для проведення ПЛР.

Для виявлення генетичного матеріалу вірусу інфекційної бурсальної хвороби у зразках тканин відібраних органів птиці, проводили підбір праймерів до консервативних ділянок гену VP2 із використанням пакету програм Vector NTI Advanced 11 (Invitrogen, США). За допомогою вказаної комп'ютерної програми 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).

2.4.2. Виділення РНК та ДНК з патологічного матеріалу.

Виділення нуклеїнових кислот здійснювали за допомогою двох наборів реагентів для ручного (Рибо-сорб) та автоматичного виділення ДНК та РНК (MagVet Universal Isolation Kit).

Виділення НК із зразків бурс за допомогою набору «Рибо-сорб» проводили таким чином. У пробірки додавали 450 мкл розчину для лізису, до яких додавали 100 мкл гомогенату тканин бурс. До вмісту додавали по 25 мкл сорбенту для зв'язування нуклеїнових кислот, після чого вміст пробірок перемішували за допомогою вортексу (10 тис. об./хв) та залишали у штативі для осідання сорбенту на 10 хв. Далі нуклеїнові кислоти зв'язані із сорбентом осаджували за 10 тис. об/хв протягом 30 сек. Надосадову рідину видаляли за допомогою вакуумного відсмоктувача. Для очищення нуклеїнових кислот від протеїнів та ліпідів проводили відмивання. На першому етапі відмивання у пробірки із осадженими нуклеїновми кислотами, зв'язаними із сорбентом додавали по 400 мкл розчину для відмивання 1, ресуспендували НК у комплексі із сорбентом на вортексі, центрифугували зразки за 10 тис. об/хв

протягом 30 сек та видаляли надосадову рідину вакуумним відсмоктувачем. Наступні етапи відмивання здійснювали за вище описаною схемою. Під час другого та третього етапу відмивання у пробірки додавали по 500 мкл розчину для відмивання 3, а для четвертого етапу вносили 400 мкл розчину для відмивання 4. Після цього пробірки із відмитими нуклеїновими кислотами зв'язаними із сорбентом поміщали у термостат за температури 60 °C на 10 хв. для підсушування. Після цього здійснювали елюцію нуклеїнових кислот. Для цього у зразки додавали по 50 мкл РНК-буферу, перемішували їх на вортексі, поміщали у термостат за температури 60 °C на 5 хв. та центрифугували протягом 90 сек. за 13 тис. об./хв. Надосадову рідину, що містила РНК та ДНК відбирали та використовували для проведення ПЛР, або зберігали за температури -20 °C.

Для автоматичного виділення нуклеїнових кислот використовували екстрактор «Bead Retriever» та набір реагентів «MagVet Universal Isolation Kit». Спочатку у пластикові смужки на 5 лунок вносили реагенти як вказано у таблиці 2.1.

У першу лунку з розчином для лізису (NM1) додавали 100 мкл гомогенату тканин бурс. Далі послідовно з другої по п'яту лунки вносили розчини NM3, NM4, 80 % етанол та NM6. Після цього смужки із заповненими лунками поміщали у екстрактор на 10 хвилин для лізису зразку тканин бурс. Після завершення лізису у першу лунку, що містила лізований зразок тканин сумки Фабріціуса додавали розчин для зв'язування нуклеїнових кислот NM2 та NM LSI Beads (магнітні кульки). Потім смужки знову поміщали до екстрактора на 35 хвилин, де відбувались наступні етапи виділення ДНК та РНК у такому порядку: зв'язування НК – 5 хв; перше відмивання НК 1 – 3 хв; друге відмивання НК 2 – 3хв; третє відмивання НК 3 – 2 хв; висушування магнітних кульок із зв'язаними нуклеїновими кислотами – 10 хв; елюція НК – 5 хв, 30 сек. Після елюції ДНК та РНК відбирали та використовували для проведення ПЛР, після чого їх зберігали за температури - 20°C.

Таблиця 2.1

Порядок внесення та об'єм реагентів, які використовували для виділення нуклеїнових кислот

№ п/п	Назва реагенту	Номер лунки	Об'єм реагентів, що вносили у лунки, мкл
1	NM1 (N1+M1) (розчин для лізису)	1	250
2	NM3 (розчин для відмивання)	2	600
3	NM4 (розчин для відмивання)	3	600
4	80% етанол	4	600
5	NM6 (буфер для елюції НК)	5	600
6	NM2 (буфер для зв'язування НК)	1	600
7	NM LSI Beads (магнітні кульки)	1	20

2.4.3. Проведення реакції зворотної транскрипції.

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». У пробірки об'ємом 500 мкл відбирали 10 мкл виділеної РНК та поміщали у термостат за температури 87 °С на 5 хвилин для руйнування вторинних зв'язків у молекулах РНК. Потім зразки переносили у льодяну баню та витримували 3 хвилини для фіксації молекул РНК у денатурованому стані. Після цього у пробірки додавали суміш, яку готували відповідно до запропонованого виробником протоколу. До складу суміші входили: 0,5 мкл ревертази (MMIv), 10 мкл RT-mix та 0,4 мкл RT-G-mix 1. Далі зразки інкубували за температури 37 °С на 30 хв.

Для зупинення реакції зразки витримували за температури 87 °С упродовж 5 хвилин. Після цього концентровану кДНК розводили, додаючи 20 мкл ДНК-буферу. Готову кДНК використовували для проведення полімеразної ланцюгової реакції та зберігали за температури – 20 °С.

2.4.4. Проведення гніздової полімеразної ланцюгової реакції.

ПЛР проводили у два етапи (рис. 2.2) [30, 95]. Для першої реакції використовували кДНК, для другої – амплікони отримані на першому етапі реакції. Для кожної реакції використовували окремі набори праймерів, послідовності яких наведено у таблиці 2.2.

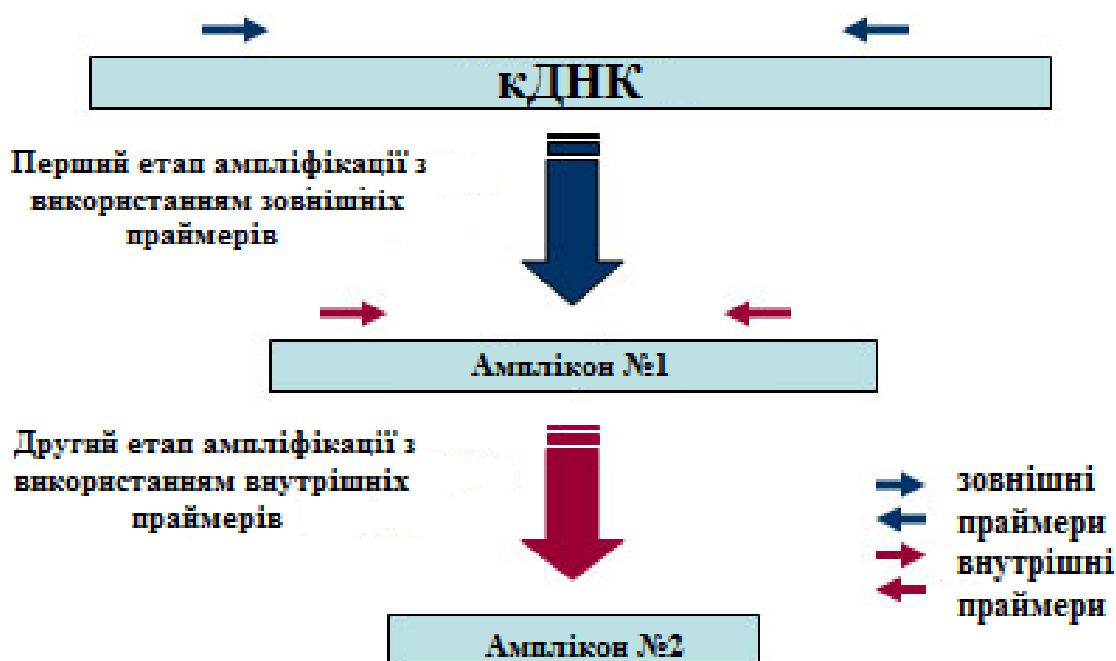


Рис. 2.2. Схема проведення гніздової полімеразної ланцюгової реакції [30].

Таблиця 2.2

Характеристика праймерів, які використовували для виявлення вірусу ІБХ

Номер реакції	Назва та нуклеотидна послідовність праймерів	Довжина амплікону, п.н.	Температура гібридизації, °С
1	Bur1F (5' TCACCGTCCTCAGCTTAC3')	643	52
	Bur1R (5' TCAGGATTTGGGATCAGC3')		
2	Bur2F (5' CGCTATAGCGCTTGACCCAAAA 3')	552	63
	Bur2R (5' CTCACCCAGCGACCGTACGACG3')		

Таблиця 2.3

Температурний режим для ампліфікації специфічних ділянок кДНК до геномної РНК вірусу ІБХ із застосуванням діагностичних пар праймерів

Етапи	Кількість циклів		Температура, °С		Тривалість етапу, хв
Гарячий старт	1		95		1
Денатурація	1		94		0,5
Гібридизація	Реакція 1	Реакція 2	Реакція 1	Реакція 2	0,5
	35	40	52	63	
Елонгація	1		72		0,5
Кінцева елонгація	1		72		2

Для проведення першого раунду полімеразної ланцюгової реакції готували ПЛР-суміш, до складу якої входили дезоксинуклеотидтрифосфати,

прямий та зворотній праймери, ПЛР-буфер, хлорид магнію, Taq-полімерази та H₂O. До реакційної суміші додавали 5 мкл кДНК. ПЛР-суміш для другого етапу ПЛР готували аналогічно, але із використанням пари праймерів Bur2_F та Bur2_R. До реакційної суміші додавали 5 мкл амплікону першого етапу реакції, який попередньо розводили у 20 разів. Програмували ампліфікатор згідно температурного режиму наведеного у таблиці 2.3

Після проведення реакції, отримані амплікони використовували у наступних етапах дослідження (проведення електрофорезу або рестрикційного аналізу), або зберігали за температури -20°C.

2.4.5. Проведення рестрикційного аналізу ампліфікованих послідовностей кДНК.

Рестрикційний аналіз ампліконів кДНК гену VP2 проводили із використанням ендонуклеаз рестрикції *Eco911*, *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). Реакційні суміші для кожної із перелічених рестриктаз готували відповідно до запропонованого виробником протоколом. Кожна реакційна суміш складалась з 16 мкл води, 2 мкл буферу для рестриктази та 2 мкл ферменту. До готової реакційної суміші додавали 6 мкл продукту ПЛР та витримували 5 годин за температури +37 °C. Після закінчення реакції інактивування ендонуклеаз здійснювали шляхом нагрівання до +65 °C упродовж 20 хвилин. Візуалізацію результатів реакцій, зокрема кількість та розмір фрагментів ДНК, здійснювали шляхом електрофоретичного аналізу рестрикційних фрагментів в агарозному гелі [10].

2.4.6. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів реакцій в агарозному гелі.

Після закінчення ПЛР та реакцій рестрикції проводили електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації та рестрикції у 1,5 % агарозному гелі. Для цього використовували комерційний концентрований трис-боратний буферний розчин з етидієм бромідом, який розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:18. Агарозу розводили готовим ТБЕ-буфером. Розплавлений гель заливали у камеру для електрофорезу шаром завтовшки 0,6 – 0,8 см та залишали на 20 хв для застигання. Далі в камеру додавали готовий ТБЕ-буфер, яким покривали агарозний гель. Після цього 10 мкл ампліфікату ресуспендовували з 1 мкл барвника (6X Orange Loading Dye) і вносили на дно лунок агарозного гелю під буфер. У крайні лунки гелю вносили по 6 мкл маркеру “GeneRuller 50 bp DNA Ladder”. Електрофорез проводили у градієнті напруги 10 В/см протягом 45-50 хв. Після закінчення електрофорезу гелі переглядали за допомогою транслюмінатора при ультрафіолетовому світлі, довжиною хвилі 320 нм.

2.4.7. Очищення ампліфікатів з агарозного гелю.

Для секвенування 552-нуклеотидного фрагменту гену VP2 продукт другого етапу ампліфікації очищували з агарозного гелю за допомогою набору реагентів «mi-Gel Extraction Kit». Для цього обраний для аналізу зразок вирізали з гелю та поміщали у мікропробірку об'ємом 1,5 мл. Далі для екстракції ДНК, у пробірку із зразком гелю вносили 300 мкл буферу для екстракції та інкубували 5 – 10 хвилин за 65 °С до повного розчинення гелю. Далі вміст пробірок переносили у колонки із сорбентом та центрифугували протягом 1 хв за 13 тис. об/хв. Після цього відмивали колонки додаючи до сорбенту 500 мкл буферу для відмивання та центрифугуючи протягом 1 хв за 13 тис. об/хв. Цю процедуру повторювали двічі. Потім проводили елюцію

ДНК. Для цього в колонки вносили 30 мкл ДНК-буферу та центрифугували 1 хв при 13 тис. об/хв. Очищений зразок ДНК відбирали у пробірки та зберігали за температури – 20 °С.

2.5. Секвенування нуклеїнової кислоти та філогенетичний аналіз.

Встановлення нуклеотидної послідовності ділянки гену VP2 вірусу інфекційної бурсальної хвороби здійснювали після проведення електрофорезу та очищення ампліконів від агарозного гелю.

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

Ідентифікацію та порівняння отриманих ділянок проводили за допомогою системи BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Вирівнювання фрагментів проводили за допомогою програмного пакету GENE DOC. Філогенетичний аналіз за допомогою програмних пакетів PHYLIP, MEGA. Топологію дерев проводили з допомогою програми DNAPARS і DNADIST. Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп аналіз (bootstrep) із 1000 бутстреп реплікаціями. Філогенетичні дерева конструювали методом NJ (найближчих сусідів) та максимуму пар симонії (ML). Філогенетичні дерева були візуалізовані за допомогою TREEVIEW

2.5.1 Побудова філогенетичних дерев з використанням нуклеотидних послідовностей за допомогою програми MEGA [127].

У програмі MEGA за допомогою вбудованого WEB-браузеру завантажували послідовності з GenBank у форматі FASTA та одразу додавати їх до інших послідовностей для проведення вирівнювання. Для відкриття браузера у вікні Alignment знаходили Show Web Browser. У рядку пошуку вписували Nucleotide і назву вірусу. Знайшовши у браузері програми

необхідну послідовність натискали Add to Aligment для вилучення з бази послідовності та додавання її до вирівнювання.

Для вирівнювання послідовностей натискали Edit, потім Select All, потім Aligment, після чого натискали Aight By Crustalw та ОК.

Для збереження вирівняних послідовностей, натискали меню Data та обирали пункт Save Session. Зберігали у форматі MEGA (meg.) за допомогою меню послідовності дій: Data -> Export Aligment -> MEGA Format. При збереженні файлу програма визначає, чи є дані послідовності білок-кодуючими.

У меню File Основного контекстного меню програми обирали пункт Open Data та відкривали необхідний файл (meg.) для подальшої роботи. У меню Phylogeny -> Construct Phylogeny обирали метод побудові дерев – в нашому випадку - Neighbor-Joining (NJ).

2.6. Гістологічні методи дослідження змін, викликаних вірусом ІБХ.

2.6.1. Виготовлення гістологічних зразків тканин бурс.

Відібрані зразки тканин бурс фіксували у 10 % розчині формаліну та витримували у мікрохвильовій печі упродовж 40 секунд за потужності 400 Вт із водним навантаженням 400 мл. Після фіксації проводили первинне зневоднення тканин, занурюючи зразки у 96 % розчин етанолу, та витримували у мікрохвильовій печі протягом 10 хв за потужності 100 Вт. Після цього зразки нарізали гістологічним лезом (товщина зрізу становила 3 – 4 мм, ширина та довжина не більше 1,5 см) та поміщали у пластикові касети Turboflowe. Після фіксації здійснювали проведення досліджуваних зразків із використанням автоматизованої станції Microm STP-120 [156]. Тривалість обробки тканин та реактиви, які використовували для її проведення, наведено у таблиці 2.4.

Після зневоднення та парафінізації зразків тканин, останні заливали рідким парафіном і переносили на кріоконсоль на 30 - 40 хвилин для

застигання парафіну. На наступному етапі виготовляли мікротонкі зрізи патологічного матеріалу залитого у парафін. Попередню прирізку виконували встановлюючи «крок» мікротому 50 мкм, а для виготовлення зразків тканин органів – 5 мкм, кут нахилу предметного столика 10°. Готові зрізи переносили безпосередньо на предметні скельця.

Гістологічні зрізи висушували упродовж 3 – 4 годин за температури + 42 °С, після чого фарбували розчинами еозину та гематоксиліну. Для цього зрізи послідовно занурювали на 5 хвилин у розчини ксилолу (99,85 %), етанолу (96 %), етанолу (70 %) та дистильовану воду, а потім фарбували розчином гематоксиліну. Після витримування у розчині барвника упродовж 1 хв препарати відмивали протягом 3 хв у воді й дофарбовували розчином еозину та знову відмивали барвник водою протягом 3 хв. Потім зрізи витримували протягом 3 хв у етанолі 70 і 96 % та ксилолі. Після висушування отримані препарати закривали у клей.

Таблиця 2.4

Характеристика і тривалість етапів попередньої обробки зразків бурс у автоматизованій станції STP-120

Етап	Характеристика етапу	Тривалість етапу, години
1	Занурення патматеріалу у 50 % етанол	2
2	Занурення патматеріалу у 70 % етанол	2
3	Занурення патматеріалу у 96 % етанол	3
4	Занурення патматеріалу у 96 % етанол	3
5	Занурення патматеріалу у ксилол	3
6	Занурення патматеріалу у ксилол	2
7	Занурення патматеріалу у рідкий парафін	2

Після проведення підготовки гістологічних зрізів здійснювали їх мікроскопічний аналіз.

2.6.2. Мікроскопічний аналіз гістологічних препаратів.

Мікроскопію зразків здійснювали із застосуванням світлового мікроскопу Axioskop 2 plus за збільшення у 100, 200 та 400 разів. Зразки фотографували за чотирьохсоткратного оптичного збільшення. Одержані цифрові фотографії маркували, аналізували і описували виявлені гістологічні зміни та зберігали в архіві.

2.7. Статистична обробка даних.

Математичну обробку експериментальних даних (середнє значення, стандартне відхилення) здійснювали за допомогою програмного забезпечення xCheck (США) Для статистичного аналізу отриманих результатів користувались методами варіаційної статистики. Достовірність відмінностей між показниками визначали по t-критерію Стьюдента при $p=0,05$ [165].

РОЗДІЛ 3. СЕРОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ В ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ В ПЕРІОД З 2014 ПО 2016 РОКИ

Одним із основних методів контролю епізоотичної ситуації в господарствах є серологічний моніторинг. В його основі лежить виявлення антитіл до збудників захворювань за допомогою імуноферментного аналізу. Дані серологічного моніторингу використовують для побудови карт поширення небезпечних збудників та оцінки їх актуальності на досліджуваних територіях [153, 155].

Оскільки епізоотична ситуація за вірусом ІБХ в Україні мало досліджена, метою нашої роботи було здійснити серологічний моніторинг для оцінки актуальності цього збудника для України та поширення його у місцях промислового вирощування птиці.

Антитіла до вірусу ІБХ були виявлені у сироватці крові курей 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 [161, 162].

Протягом дослідження антитіла до вірусу ІБХ було виявлено у 19236 зразках сироватки крові (таб. 3.1.). Значення титрів антитіл в позитивних зразках складали від 415 до 15576. Середнє значення титрів становило 5952. Різниця у рівнях антитіл виявлених у зразках сироватки крові може свідчити про різний час інфікування птахів, оскільки рівень антитіл зростає поступово зі збільшенням концентрації вірусу у крові. Високий рівень антитіл може свідчити також про ураження високовірулентними штамами вірусу ІБХ [3].

Відсоток позитивних зразків у різних областях коливався від 82,5% у Херсонській області до 100% у Чернігівській Полтавській та інших областях (рис. 3.1).

Таблиця 3.1

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

Область	Кількість досліджених 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

Результати серологічного моніторингу поширення вірусу ІБХ в Україні збігаються із загальноєвропейською та загальносвітовою тенденцією. За даними Berg випадки інфекційної бурсальної хвороби були зафіксовані у 95% країн-членів Міжнародного Епізоотичного Бюро, до складу якого входять, зокрема, більшість європейських країн [6]. Jackwood також показав поширення різноманітних штамів вірусу ІБХ не лише в Європі, а й у Північній та Південній Америці, Африці та Азії [49].

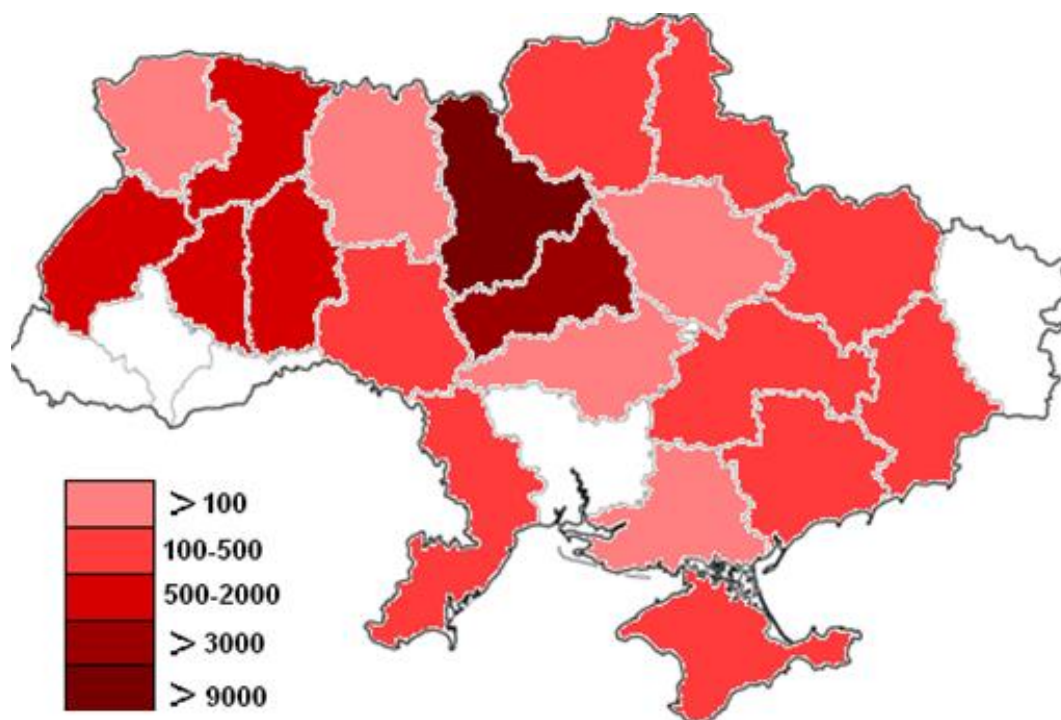


Рис. 3.1. Розповсюдження вірусу ІБХ на території України за даними серологічного скринінгу (кольорами вказано кількість позитивних на вірус зразків, виявлених в різних областях).

Антитіла до вірусу ІБХ були виявлені у всіх досліджуваних вікових груп птахів. Наявність антитіл у сироватці крові курчат свідчить про передачу антитіл від перехворілих або вакцинованих курей. Максимальний рівень антитіл материнського походження фіксували на 1-4 день після народження. Отримані результати збігаються з раніше опублікованими

даними. Показник рівня антитіл у курчат використовують для розрахунку віку при проведенні вакцинації. Показано, що високі рівні материнських антитіл здатні знищувати вакцинний вірус та погіршувати ефективність вакцинації [14]. Тому серологічний моніторинг слід здійснювати перед проведенням вакцинації, аналізувати рівень антитіл материнського походження у курчат різного віку та визначати вік пташенят у якому рівень антитіл знижується до мінімального допустимого значення (значення титру від 150 до 1000 в залежності від виду вакцин) для вакцинопрофілактики [158].

Таким чином у результаті роботи було показано, що птахи в усіх досліджених господарствах були серопозитивними на вірус ІБХ. Нами було вперше показано значне поширення вірусу ІБХ в Україні. Наявність антитіл було відмічено у всіх вікових груп. Найвищі титри антитіл зареєстровано у курчат віком від 1 до 4 днів, що є критичним при застосуванні вакцинопрофілактики інфекційної бурсальної хвороби. Дані наших досліджень 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.

РОЗДІЛ 4. ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ ІБХ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТА ГІСТОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ

4.1. Характеристика праймерів, які застосовували для проведення ПЛР метою виявлення вірусу ІБХ.

Для виявлення вірусу ІБХ в патологічному матеріалі необхідно в першу чергу оптимізувати умови проведення ПЛР. Важливим є вибір мішені для виявлення. Зазвичай, для проведення ПЛР з діагностичною метою підбирають праймери до консервативних генів, послідовності яких збігаються у різних представників одного виду вірусів. Ген VP2 містить консервативні ділянки, спільні для різних штамів вірусу. Крім цього, при дослідженні геному вірусу ІБХ Jackwood та співав. [45, 46]. показали, що нуклеотидна послідовність гіперваріабельного регіону гену VP2 (hVP2) відрізняється у різних штамів вірусу, тому її можна використовувати для рестрикційного та філогенетичного аналізу різних ізолятів вірусу. Зважаючи на це вважали доцільним використання праймерів специфічні до вказаного регіону гену VP2.

На першому етапі досліджень на основі аналізу літератури нами було обрано дві пари праймерів для ампліфікації hVP2, послідовності та розміщення яких наведено на рисунку 4.1. Продукт ампліфікації із використанням пари праймерів Bur1F та Bur1R 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 раунду ПЛР із застосуванням праймерів Bur2F та Bur2R утворювався продукт довжиною 552 п.н. [10].

Обрані нами для проведення ПЛР праймери, аналізували *in silico* за допомогою програми VectorNTIAdvanced 11 (Invitrogen, США). З огляду на те, що цільовий ген VP2 кодується сегментом А вірусної РНК, для визначення рівня гомології праймерів до гену VP2 використовували доступні у базі GeneBank нуклеотидні послідовності сегменту А, а саме тринадцять ізолятів вірусу, що належали до 1 та 2 серотипу.

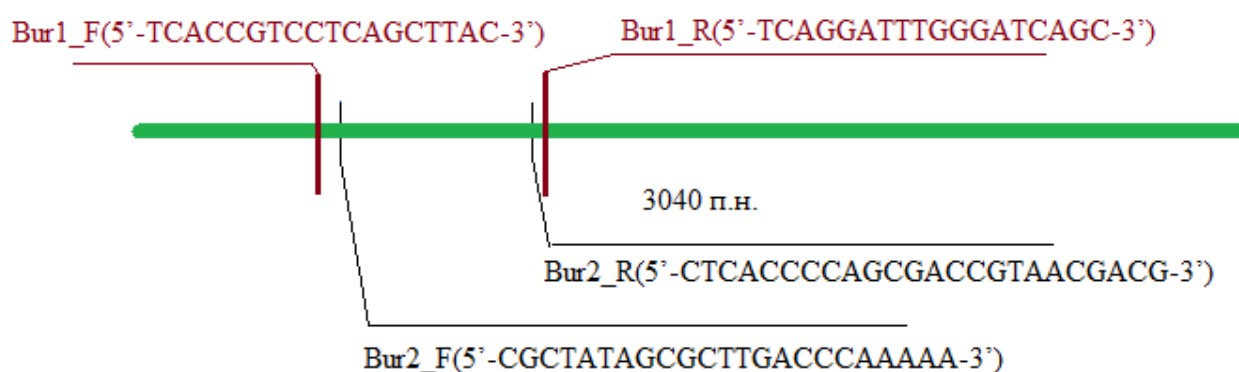


Рис. 4.1. Схема положення праймерів, підібраних до геному ізолятів вірусу інфекційної бурсальної хвороби, на основі нуклеотидної послідовності сегменту А.

Загалом було визначено рівень гомології праймерів до послідовностей сегменту А тринадцяти штамів вірусу, серед яких 3 належали до вакцинних, 9 – до високовірулентних та 2 – до авірулентних штамів (табл. 4.1). Так, для ізолятів 1 серотипу та вакцинних штамів праймери Bur1F та Bur1R характеризувалися гомологією 100 – 88,9 % та 100 % відповідно. Гомологія праймерів Bur2F та Bur2R становила 95,7 – 91,3 % та 100 – 91,7 %. Водночас, аналіз спорідненості вказаних праймерів до послідовностей сегменту А ізолятів вірусу серотипу 2 засвідчив, що рівень гомології олігонуклеотидів був значно нижчим і відповідно становив від 72,2 та 94,4 % для зовнішньої пари праймерів, 62,2 і 83,3 – для внутрішньої пари праймерів. Ці дані вказують на те, що обрані нами олігонуклеотиди є специфічними для виявлення ізолятів вірусу ІБХ, що належать до серотипу 1.

Таблиця 4.1

Рівень гомології праймерів до нуклеотидної послідовності кДНК
 сегменту А різних штамів вірусу ІБХ

Характеристика ізолятів вірусу	Код доступу GenBank	Рівень гомології праймерів до послідовності сегменту А штамів вірусу, %			
		Bur1_ F	Bur1_ R	Bur2_ F	Bur2_ R
Вакцинний штам D78	EU162087	100	100	91,3	100
Вакцинний штам MB	DQ927040	94,4	100	91,3	91,7
Вакцинний штам Faragher 52/70	HG974565	88,9	100	94,7	94,4
Високовірулентний штам	AY163771	100	100	91,3	100
Високовірулентний штам	KJ198844	94,4	100	95,7	100
Високовірулентний штам	AF133904	94,4	100	95,7	95,8
Високовірулентний штам	AM111353	88,9	100	91,3	95,8
Високовірулентний штам	AY134874	94,4	100	91,3	91,7
Високовірулентний штам	NC004178	94,4	100	91,3	91,7
Високовірулентний штам	AB368920	94,4	100	91,3	91,7
Високовірулентний штам	GQ451330	88,9	100	91,3	91,7
Авірулентний штам серотипу 2	M66722	72,2	94,4	65,2	83,3
Авірулентний штам серотипу 2	U30818	72,2	94,4	65,2	83,3

На підставі проведеного аналізу можна підсумувати, що описані пари праймерів характеризуються дуже високими рівнями специфічності до нуклеотидних послідовностей ізолятів вірусу, які належать до серотипу 1 та, власне, викликають хворобу у птахів. В той же час, для вказаних праймерів

було показано низький рівень гомології до послідовностей РНК сегменту А авірулентних ізолятів серотипу 2. Це, у свою чергу, свідчить про те, що обрані олігонуклеотиди можуть бути успішно використані для діагностичного виявлення патогенних ізолятів вірусу.

Для валідації обраних для роботи праймерів проводили спільні міжлабораторні дослідження (Proficiency testing scheme, PTC Infectious Bursal Disease Virus RNA detection) із співробітниками ветеринарної діагностичної лабораторії (Девентер, Нідерланди) [163]. Під час дослідження працювали із зашифрованими зразками, надісланими вказаною лабораторією. Після завершення дослідження зразки розшифровували для аналізу результатів (таб. 4.2).

У результаті проведення гніздової ПЛР зі згаданими зразками РНК вірусу ІБХ було виявлено у 7 із 8 зразків. Отримані результати повністю збіглися із даними діагностичної лабораторії. Таким чином, було підтверджено валідність використаних нами праймерів для виявлення РНК вірусу ІБХ.

Таблиця 4.2

Характеристика зразків, що використовувались для міжлабораторних досліджень

№ зразку	Опис	Очікуваний результат	Отриманий результат
1	2	3	4
1	Суспензія тканини бурси відібраної від 6-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини CEVAC IBD-L	Негативний	Негативний
2	Суспензія тканини бурси відібраної від 4-тижневого SPF-курча	Позитивний	Позитивний

1	2	3	4
3	Суспензія тканини бурси відібраної від 5-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини Poulvac Bursine 2	Позитивний	Позитивний
4	Суспензія тканини бурси відібраної від 6-тижневого SPF-курча інфікованого vv IBDV D6948	Позитивний	Позитивний
5	Суспензія тканини бурси відібраної від 4-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини Nobilis D78	Позитивний	Позитивний
6	Суспензія тканини бурси відібраної від 6-тижневого SPF-курча інфікованого європейським варіантним штамом вірусу IBX IBD 10191	Позитивний	Позитивний
7	Суспензія тканини бурси відібраної від 5-тижневого SPF-курча, вакцинованого дозою вакцини Nobilis 228E	Позитивний	Позитивний
8	Суспензія тканини бурси відібраної від 5-тижневого SPF-курча інфікованого європейським варіантним штамом вірусу IBX IBD 1251	Позитивний	Позитивний

Отже, з огляду на високий рівень гомології обраних олігонуклеотидів до послідовності сегменту А патогенних ізолятів та вакцинних штамів вірусу,

а також результати спільних досліджень із діагностичною лабораторією (Девентер, Нідерланди) можна стверджувати, що проаналізовані праймери були валідними та виявляли високу специфічність для виявлення ізолятів вірусу, що належать до серотипу 1 та атенуйованих вакцинних штамів. Надалі олігонуклеотиди Bur1F, Bur1R, Bur2F та Bur2R використовували для виявлення вірусу інфекційної бурсальної хвороби у зразках органів уражених птахів.

4.2. Виявлення РНК вірусу ІБХ методом гніздової ПЛР.

Після валідації обраних праймерів їх використовували для виявлення вірусу ІБХ в клінічних зразках.

З метою виявлення РНК вірусу хвороби ІБХ у зразках органів птахів з клінічними ознаками інфекційної бурсальної хвороби застосовували метод гніздової полімеразної ланцюгової реакції. У якості зразків для ПЛР використовували кДНК, отриману у результаті зворотної транскрипції на матриці вірусної РНК, виділеної із тканин бурс досліджених тварин. Після проведення ампліфікації здійснювали електрофоретичний аналіз отриманих продуктів ПЛР. Якість проведення реакції оцінювали за допомогою позитивного та негативного контролів. Позитивний контроль використовувався для оцінки ефективності ампліфікації. Відсутність продуктів реакції у негативному контролі було свідченням чистоти виділення нуклеїнових кислот та адекватності результатів проведеного аналізу. Розмір ампліконів оцінювали за допомогою маркеру молекулярних мас (Thermo, США). Наявність вірусу у зразках органів птахів засвідчувалась у випадку появи у гелі смуги, що відповідала розміру 552 п.н. (рис. 4.2).

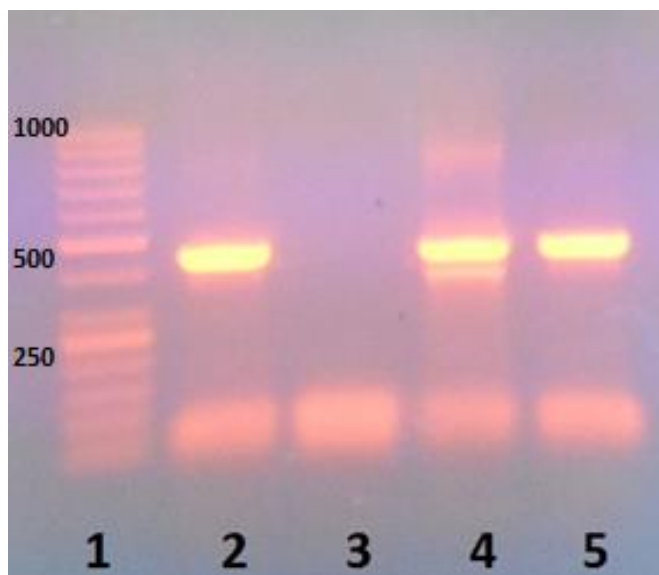


Рис. 4.2. Електрофореграма продуктів ПЛР: 1 – маркер молекулярних мас, 2 – позитивний контроль, 3 – негативний контроль, 4, 5 – позитивні зразки вірусу інфекційної бурсальної хвороби.

Таким чином, у результаті проведених нами досліджень, РНК вірусу інфекційної бурсальної хвороби було виявлено у 75 із 120 проаналізованих зразків органів, відібраних від птахів з клінічними ознаками інфекційної бурсальної хвороби. У всіх досліджених вакцинах також було детектовано ПЛР-продукт розміром 552 п.н., що свідчило про наявність вакцинних штамів вірусу.

4.3. Виявлення патоморфологічних змін у лімфоїдній тканинній бурс курей викликаних різними вакцинними та польовими штамми вірусу ІБХ.

Відомо, що живі вакцинні штами, подібно до польових штамів вірусу ІБХ реплікуються в лімфоїдних органах інфікованої птиці, насамперед у бурсі, викликаючи її часткову атрофію. Для захисту від захворювання використовують вакцини, що відповідно до рівня антитіл материнського походження, за якого здатні викликати імунну реакцію поділяються на

«м'які», «середні» та «середні плюс». [2]. Для диференціювання різних штамів вірусу використовують різноманітні методи, серед яких молекулярно-генетичні (ПЛР, рестрикційний аналіз, секвенування), імуноферментний аналіз та гістологічні дослідження. Останні можуть бути корисними для встановлення поствакцинальних реакцій у курей та оцінки ефективності вакцинації в господарствах. Зважаючи на велику різноманітність вакцин та широке розповсюдження польових штамів вірусу ІБХ важливою є діагностика впливу різних штамів на ключовий орган-мішень вірусу - сумку Фабріціуса [75].

Для встановлення характерних патолого-морфологічних змін в бурсі фіксували тканин бурси, 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. 4.3.).

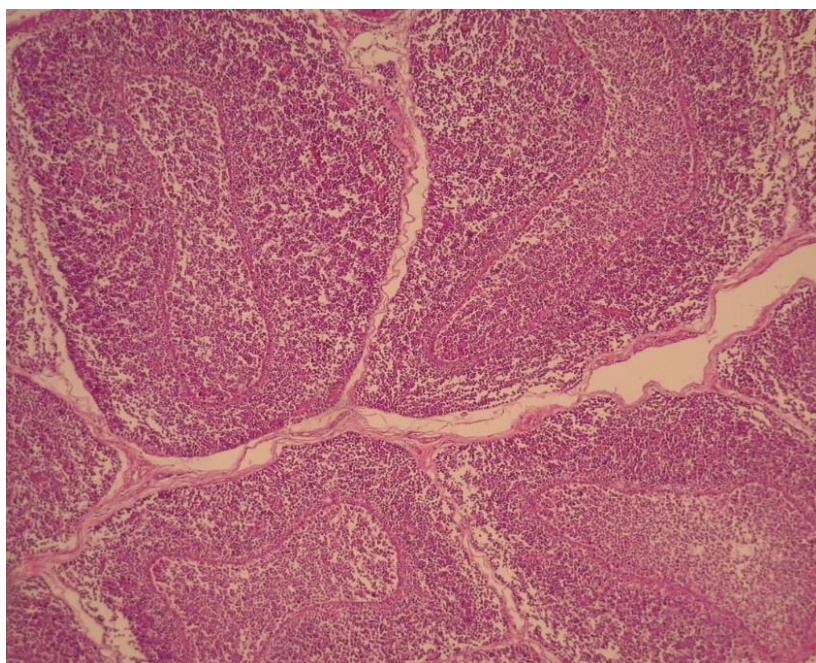


Рис. 4.3. Лімфоїдна тканина фолікулів бурси фабріціуса за відсутності вірусного інфікування та вакцинації (негативний контроль). Забарвлення еозином та гематоксиліном. Збільшення в 200 разів.

Ураження бурси Фабріціуса визначали за методикою лабораторії гістології ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики». Для цього на кожному препараті аналізували по 10 полів зору при збільшенні у 200 та 400 разів та оцінювали виснаження (зменшення кількості В-лімфоцитів) окремих фолікулів бурси. Середнє значення виснаження бурси виражали у відсотках [160].

Ступінь виснаження фолікул бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамами вірусу ІБХ варіював від 90 до 100 % (рис. 4.4). Окрім виснаження фолікул бурси, у всіх зразках також виявляли множинні крововиливи у міжфолікулярній стромі та точкові крововиливи у фолікулах фабріцієвої сумки. Також було виявлено лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярній стромі.

За 100% виснаження фолікул бурс спостерігали повну відсутність В-лімфоцитів у фолікулах клоакальної сумки (рис. 4.4).

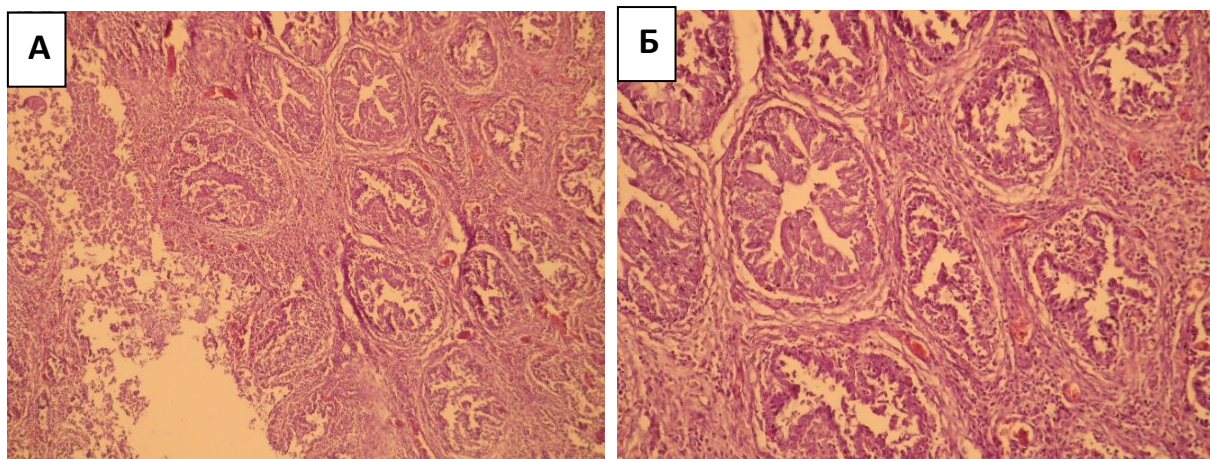


Рис. 4.4. Виснаження фолікул бурс птахів на 100%, викликані польовими штамами вірусу, крововиливи та інфільтрати у міжфолікулярній стромі (А – збільшення в 100 разів, В – збільшенн в 400 разів). Забарвлення еозином та гематоксиліном.

Результати проведених нами гістологічних досліджень збігаються із даними інших авторів. При дослідженні різних штамів вірусу ІБХ, поширених у США, авторами було показано, що за інфікування високовірулентними штамми характерним є значне (до 100 %) виснаження фолікулів бурс птахів та характерні крововиливи у міжфолікулярній стромі. [118].

З метою визначення патологічних змін, викликаних у тканинах бурси за вакцинування живими штамми вірусу ІБХ, було проаналізовано характерні зміни, викликані вакцинними штамми.

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. 4.5). Слід наголосити, що в фолікулах та міжфолікулярній стромі бурс ми не виявили крововиливів та лімфоцитарних інфільтратів, на відміну від бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамми.

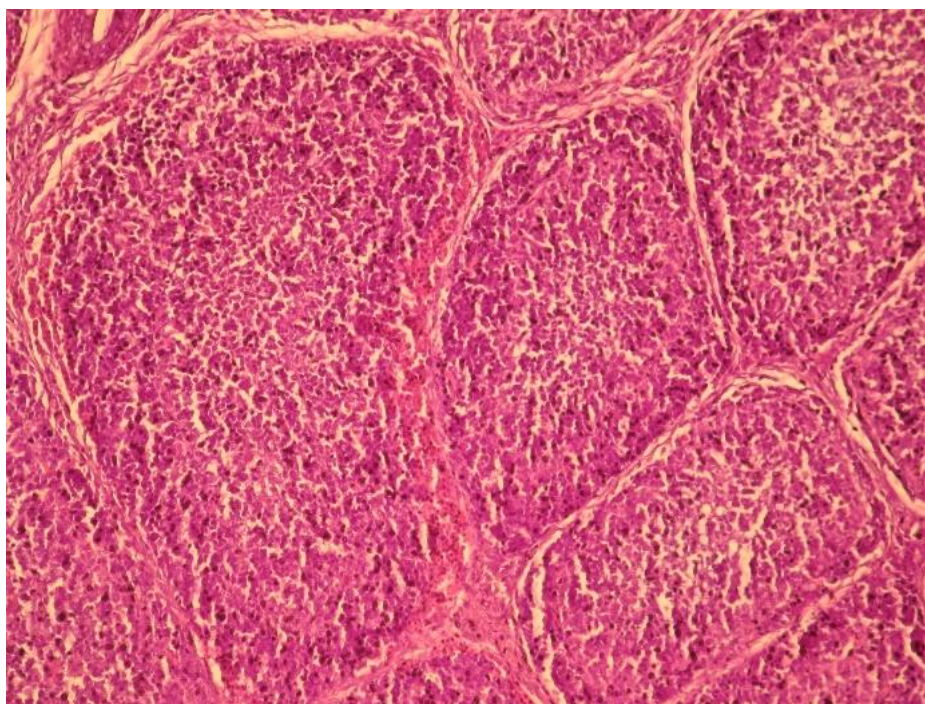


Рис. 4.5. Вплив «м'яких» вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси (виснаження 40 - 50 %): збільшення у 400 разів. Забарвлення еозином та гематоксиліном.

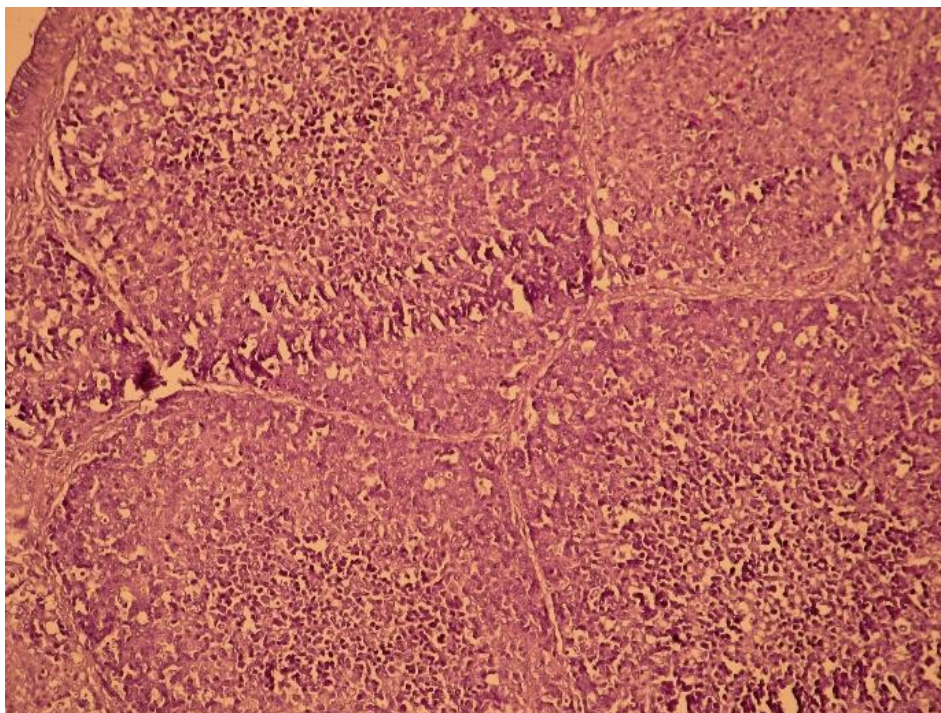


Рис. 4.6. Вплив «середніх» вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси (виснаження 60 - 70 %): збільшення у 400 разів. Забарвлення еозином та гематоксиліном.

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. 4.6). 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. 4.7). Втім відмінністю від високовірулентних штамів залишалась відсутність крововиливів у фолікулах та інфільтратів лімфоцитів у міжфолікулярний простір.

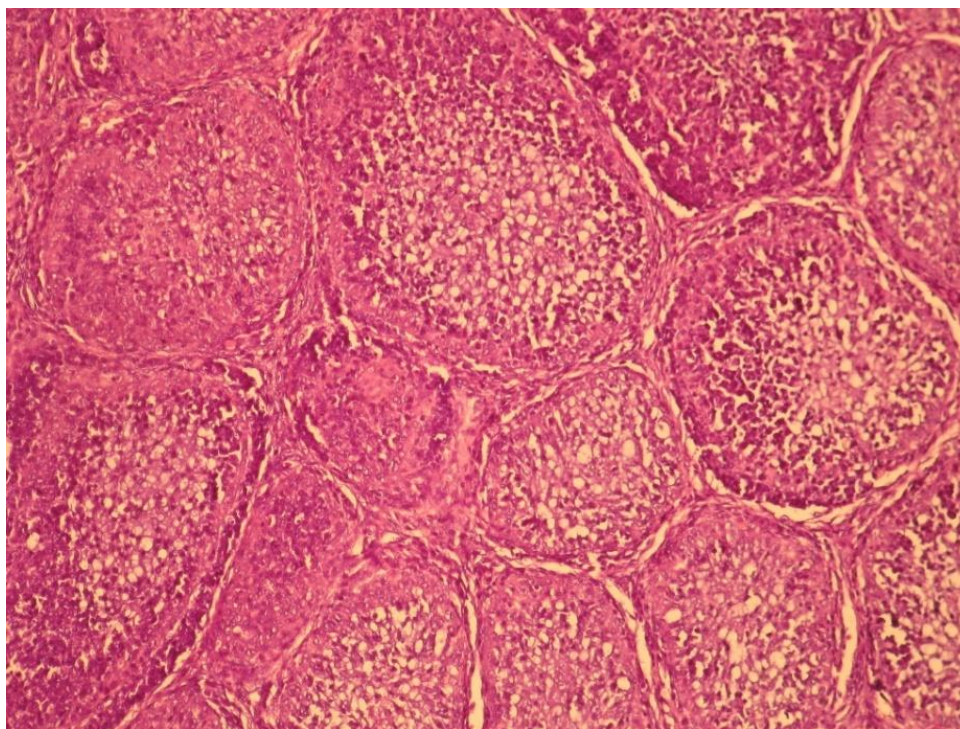


Рис. 4.7 Вплив середніх-плюс вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси (виснаження бурси 90 %): збільшення у 400 разів. Забарвлення еозином та гематоксиліном.

Таким чином у результаті гістологічного дослідження було показано, що вакцинні штамі із різним рівнем залишкової вірулентності викликали відмінні ступені виснаження бурси птахів. Так для м'яких штамів виснаження становить 40 – 50 %, середніх – 60 – 70 %, а для середніх плюс воно складає 80 – 90 %. Було також показано, що польові високовірулентні штами, виявлені в Україні, подібно до штамів охарактеризованих в інших країнах, можуть спричинювати значне виснаження бурс, рівень якого становив від 90 до 100 %. Окрім того на відміну від усіх вакцинних штамів, за інфікування високовірулентними вірусами спостерігали значні крововиливи у фолікулах та міжфолікулярному просторі, а також лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярному просторі.

Таки чином згадані зміни були специфічними для ураження польовими високовірулентними штамами вірусу ІБХ. Отримані нами результати можуть бути використані для аналізу поствакцинальної реакції при проведенні профілактичних заходів на птахофабриках та диференціювання впливу вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ.

РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ШТАМОВОГО РІЗНОМАНІТТЯ ВІРУСУ ІБХ МЕТОДОМ РЕСТРИКЦІЙНОГО АНАЛІЗУ

Зважаючи на те, що основним методом захисту птахів від інфекційної бурсальної хвороби є вакцинування, існує проблема диференціювання вакцинних штамів із різним рівнем залишкової вірулентності та високовірулентних варіантів вірусу. За даними Jackwood, у дослідженнях атенуєваних штамів вірусу ІБХ, було показано, що різним вакцинним штамам властиві особливі сайти рестрикції та розмір фрагментів, що утворюється у результаті дії ендонуклеаз *BstN1* та *MboI* [45]. Зокрема, у дослідженнях Jackwood та Sommer [44] було показано, що більшість високовірулентних штамів мають сайт рестрикції *SspI*.

Зважаючи на те, що високовірулентні штами можуть спричинювати захворювання навіть після вакцинації птахів, для диференціювання вакцинних штамів від високовірулентних Vorodavka зі співав.[10] здійснювали рестрикційний аналіз різних ізолятів вірусу ІБХ, використовуючи набір із шести рестриктаз, а саме: *Eco911* (*BstEII*), *MboI*, *SacI*, *BspMI*, *MvaI* (*BstN1*), та *SspI*. Ними було показано, що фрагменти, які утворюються унаслідок дії цих ферментів відрізняються для різних вакцинних штамів. Окрім того, високовірулентний штам UK661 також відрізняється від вакцинних штамів із високим рівнем залишкової вірулентності за сайтом рестрикції *BstEII*. Використання вказаних рестриктаз дозволяло розрізняти вакцинні штами із різним рівнем залишкової вірулентності між собою та від високовірулентних ізолятів вірусу ІБХ, тому для характеристики виявлених ізолятів вважали за доцільне використовувати вищезазначені ендонуклеази рестрикції.

З огляду на вищевикладене, на цьому етапі дослідження порівнювали вакцинні штами із різним рівнем залишкової вірулентності для подальшого диференціювання згаданих штамів від високовірулентних ізолятів. Для цього ПЛР-продукти, довжиною 552 п.н., піддавали рестрикції ферментами *Eco911*

(*Bst*ЕІІ), *Mbo*I, *Sac*I, *Bsp*МІ, *Mva*I (*Bst*Н1), та *Ssp*I. Розміри рестрикційний фрагментів, які очікували отримати в результаті дослідження, визначали за допомогою програми Vector-NTI Advanced 2011. Дані отримані у результаті досліджень *in silico* наведені у таблиці 5.1 [105, 159].

У дослідженні використовували 9 вакцинних штамів, що належали до трьох груп: 5 із яких, а саме штами 228Е, GM97, MB/20, D78 та Winterfield-2512 характеризувались низьким рівнем залишкової вірулентності, штами V877 та MB/5 – середнім рівнем, а штами MB і MB/3 – високим.

Було показано, що штами, які належали до однієї групи за рівнем залишкової вірулентності мають однаковий рестрикційний профіль (таб. 5.1).

Таблиця 5.1

Розмір фрагментів, що утворюються унаслідок рестрикції ампліфікованої послідовності гену VP2 (552 п.н.), вакцинних та високовірулентного штамів вірусу ІБХ

Назви штамів вірусу ІБХ	Назви рестриктаз, що були використані в роботі					
	<i>Bsp</i> МІ	<i>Sac</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Bst</i> ЕІІ	<i>Mva</i> I	<i>Mbo</i> I
1	2	3	4	5	6	7
GM97	–	184+368	–	–	475+77	413+62+ 50+27
228Е	–	184+368	–	–	475+77	413+62+ 50+27
MB/20	–	184+368	–	–	475+77	413+62+ 50+27
D78	–	184+368	–	–	209+154+ 112+77	413+62+ 50+27
MB/5	–	184+368	–	257+ 295	230+210+ 112	270+150+ 132
V877	–	184+368	–	257+ 295	230+210+ 112	270+150+ 132

1	2	3	4	5	6	7
MB	102+450	–	326+226	257+ 295	475+77	413+71+ 41+27
MB/3	102+450	–	326+226	257+ 295	475+77	413+71+ 41+27
UK661	102+450	–	326+226	–	–	–
Winterfi- eld-2512	–	169+383	314+238	–	186+139+ 82+80+72	452+71+29

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 фрагмент розміром 413 п.н.(рис. 5.1).

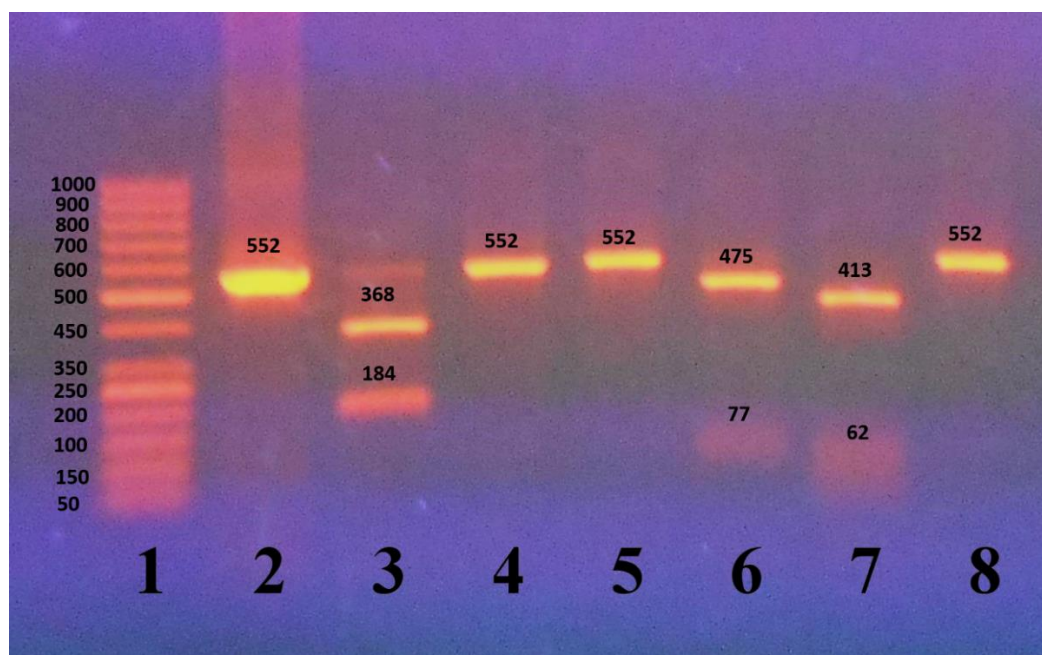


Рис. 5.1. Рестрикційний профіль вакцинних штамів GM97, 228E і MB/20: 1- маркер молекулярних мас; 2 - амплікон до рестрикції; 3 - фрагменти після рестрикції *SacI*; 4 - фрагменти після рестрикції *SspI*; 5 -

фрагменти після рестрикції *Bst*ЕІІ; 6 - фрагменти після рестрикції *Mva*I; 7 - фрагменти після рестрикції *Mbo*I; 8 - фрагменти після рестрикції *Bsp*МІ.

Штами V877 та МВ/5, що належали до групи із середнім рівнем залишкової вірулентності, характеризувалися наявністю сайтів рестрикції для ендонуклеаз рестрикції *Bst*ЕІІ, *Mbo*I, *Sac*I та *Mva*I (рис. 5.2).

На відміну від двох вищезазначених груп вакцинних штамів, у штамів МВ та МВ/3 із високим рівнем залишкової вірулентності не було виявлено сайт рестрикції *Sac*I. Натомість їм був властивий сайт для ферменту *Ssp*I. Внаслідок рестрикції ПЛР-продукту ендонуклеазою *Ssp*I утворювались фрагменти розміром 326 та 226 п.н. Також у штамів МВ та МВ/3 було встановлено наявність сайту для рестриктази *Bsp*МІ, чого не було показано для інших вакцинних штамів (рис.5.3).

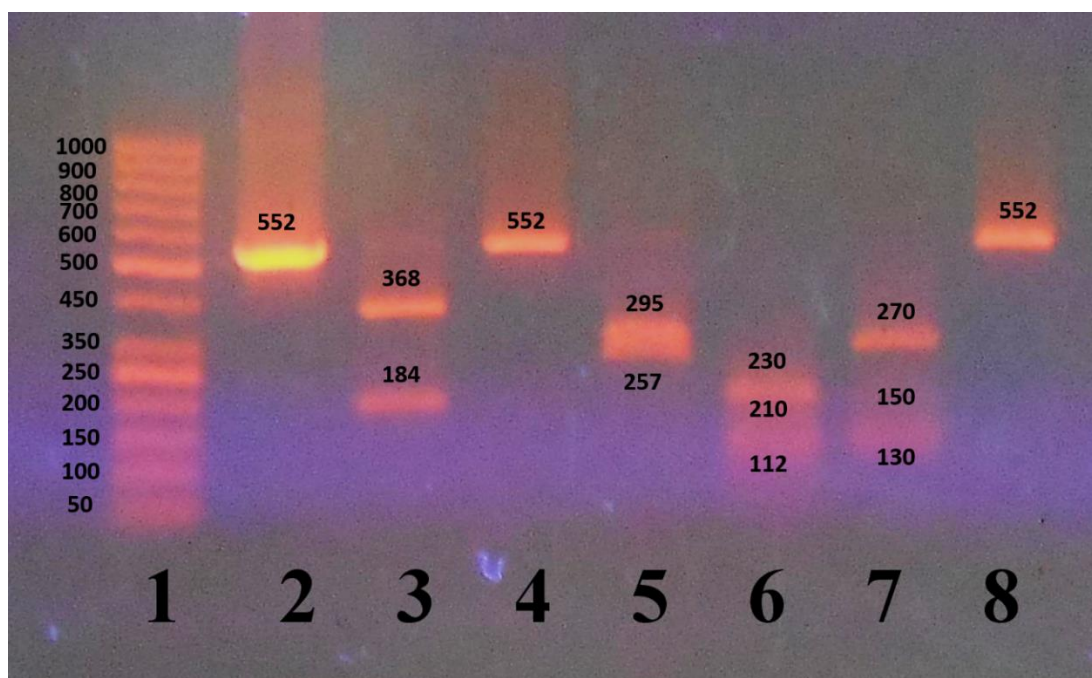


Рис. 5.2. Рестрикційний профіль вакцинних штамів V877 та МВ/5: 1- маркер молекулярних мас; 2 - амплікон до рестрикції; 3 -фрагменти після рестрикції *Sac*I; 4 - фрагменти після рестрикції *Ssp*I; 5 - фрагменти після

рестрикції *Bst*ЕІІ; 6 - фрагменти після рестрикції *Mva*I; 7 - фрагменти після рестрикції *Mbo*I; 8 - фрагменти після рестрикції *Bsp*МІ.

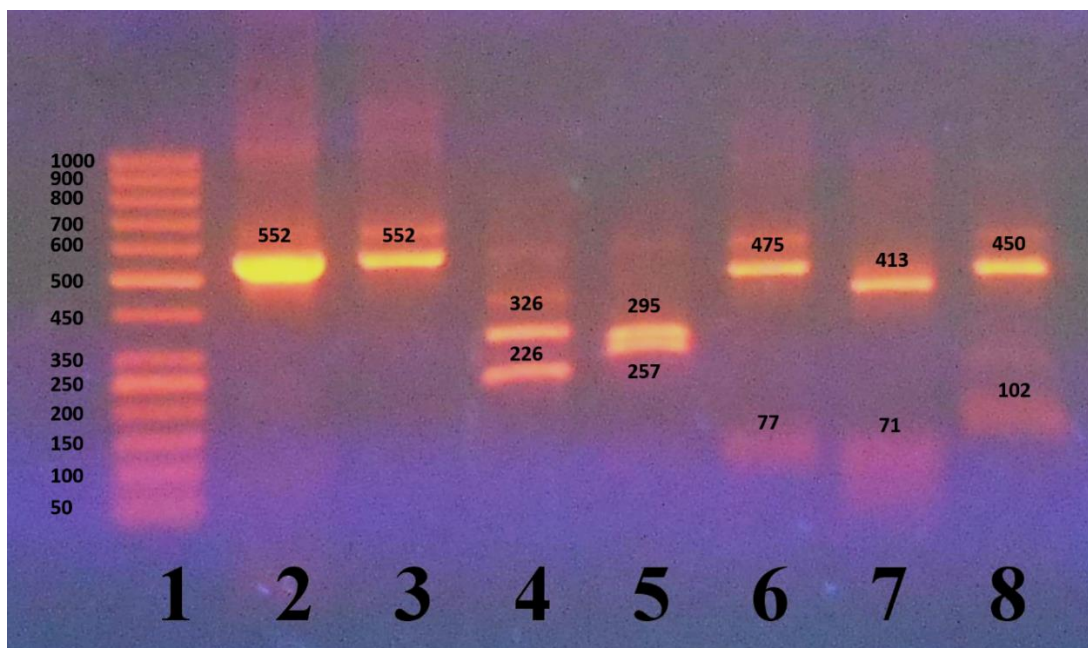


Рис. 5.3. Рестрикційний профіль вакцинних штамів MB та MB/3: 1- маркер молекулярних мас; 2 - амплікон до рестрикції; 3 -фрагменти після рестрикції *Sac*I; 4 - фрагменти після рестрикції *Ssp*I; 5 - фрагменти після рестрикції *Bst*ЕІІ; 6 - фрагменти після рестрикції *Mva*I; 7 - фрагменти після рестрикції *Mbo*I; 8 - фрагменти після рестрикції *Bsp*МІ.

На відміну від усіх проаналізованих вакцинних ізолятів штам Winterfield-2512 характеризується унікальним набором сайтів рестрикції, не притаманним іншим дослідженим штамом. Зокрема, у послідовності гену VP2 було виявлено сайти рестрикції для ендонуклеаз рестрикції *Mbo*I, *Sac*I, *Mva*I (*Bst*NI) та *Ssp*I (рис. 5.4).

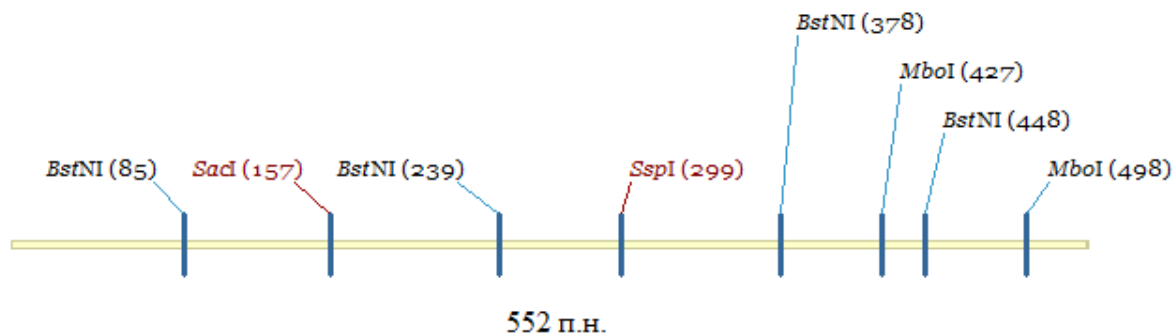


Рис. 5.4. Схема положення сайтів рестрикції, визначених у послідовності гену VP2 вакцинного штаму Winterfield-2512.

На підставі порівняльного аналізу рестрикційних профілів вакцинних штамів характеризували 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 (рис. 5.5).



Рис. 5.5. Ізоляти вірусу ІБХ, виявлені у тканинах бурс вакцинованих та інфікованих птахів

Серед усіх досліджених ізолятів було також виявлено 5%, сайти рестрикції яких співпадали із референтним високовірулентним штамом UK661 (рис. 5.6). На відміну від вакцинних штамів із високим рівнем залишкової вірулентності, у послідовності гіперваріабельного регіону гену VP2 високовірулентних ізолятів був відсутній сайт рестрикції *BstEII* (рис. 5.6).

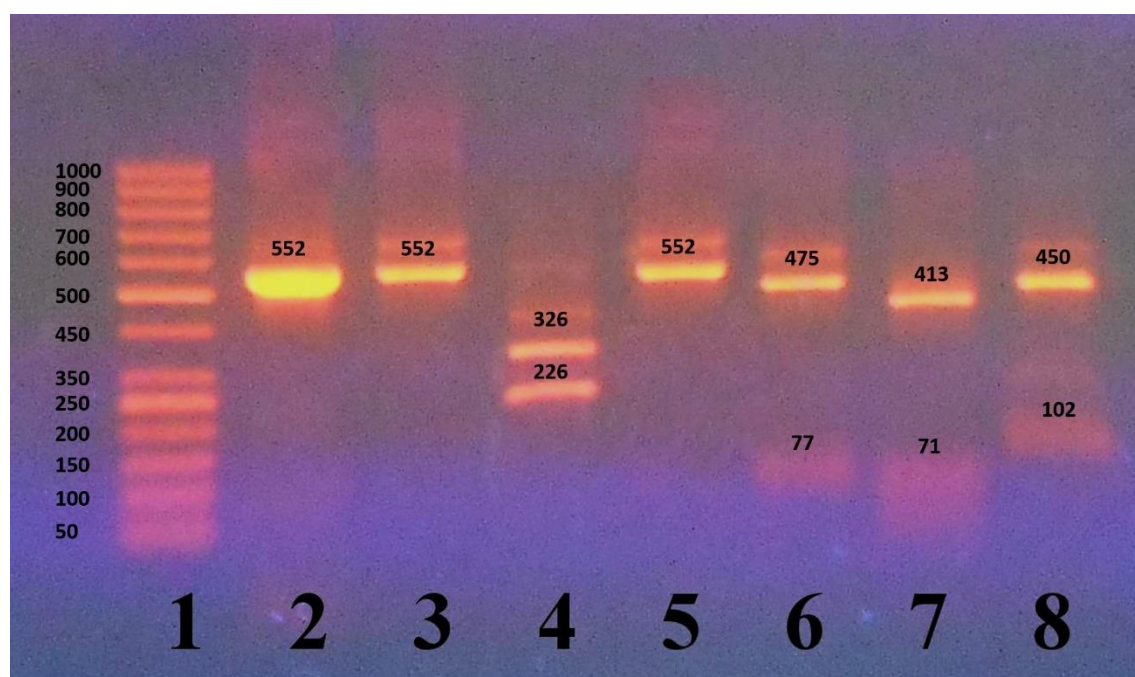


Рис. 5.6. Рестрикційний профіль високовірулентних ізолятів вірусу ІБХ: 1- маркер молекулярних мас; 2 - амплікон до рестрикції; 3 -фрагменти після рестрикції *SacI*; 4 - фрагменти після рестрикції *SspI*; 5 - фрагменти після рестрикції *BstEII*; 6 - фрагменти після рестрикції *MvaI*; 7 - фрагменти після рестрикції *MboI*; 8 - фрагменти після рестрикції *BspMI*.

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 вакцинного штаму Winterfield-2512 було

описано унікальний рестрикційний профіль, який відрізнявся від усіх проаналізованих вакцинних штамів.

За даними рестрикційного аналізу 95% ізолятів вірусу ІБХ походив 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.

РОЗДІЛ 6. ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМІВ ВІРУСУ ІБХ ПОШИРЕНИХ В УКРАЇНІ.

Вірус інфекційної бурсальної хвороби відрізняється високою здатністю до мінливості, оскільки його геном представлений сегментованими молекулами РНК. Тому всі види мутацій можуть бути притаманними даному вірусу, а саме рекомбінації, реасортації, точкові мутації у зв'язку з помилками в роботі вірусної РНК-залежної РНК-полімерази. Найбільша кількість мутацій фіксується у гені, що кодує основний структурний білок вірусу - VP2. Саме тому на сьогодні у світі описано сотні штамів вірусу ІБХ, які мають відмінності у послідовності гену VP2.

Зважаючи на велику різноманітність та варіабельність штамів вірусу ІБХ, з'ясування походження досліджених ізолятів вірусу є необхідним для визначення ступеню їх вірулентності. При аналізі штамів, виявлених у птахів із 18 країн світу, Jackwood та Sommer [49, 50] показали, що незважаючи на високий рівень смертності, лише 80 % були філогенетично споріднені із високовірулентними штамми. Інші 20 % ізолятів походили від варіантних штамів. Оскільки для захисту проти різних типів штамів необхідно використовувати специфічні вакцини, аналіз філогенетичної спорідненості виявлених ізолятів є необхідним для адекватної вакцинації тварин.

З огляду на вищевикладене, визначали нуклеотидну послідовність гіперваріабельного регіону гену VP2 ізолятів, що за рестрикційним профілем були подібні референтних високовірулентних штамів. Отриману послідовність порівнювали із різними польовими, а також вакцинними штамми для встановлення спорідненості між ними.

6.1. Аналіз філогенетичних зв'язків різних штамів вірусу ІБХ.

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 Україні та порівняти отримані послідовності із охарактеризованими штамми вірусу, послідовності геномів яких доступні в базі GenBank [104].

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% (таб. 6.1.)

Таблиця 6.1.

Опис секвенованих послідовностей VP2 HVR українських ізолятів
вірусу ІБХ

Назва ізоляту	Дата виявлення	Місце відбору	Вік тварин (дні)	Філогенетична група
Ukraine 1517	17.04.2014	Львів	44	VV
Ukraine 1853	24.04.2014	Черкаси	48	CV
Ukraine 38_1943	29.05.2014	Черкаси	38	CV
Ukraine 43_1943	29.05.2014	Черкаси	43	CV
Ukraine 2045	29.05.2014	Луцьк	34	CV
Ukraine 58	12.06.2014	Тернопіль	10	CV
Ukraine 55	17.06.2014	Київ	26	VV
Ukraine 691_24	23.09.2014	Львів	24	CV
Ukraine 691_35_4	23.09.2014	Львів	35	VV
Ukraine 691_35_5	23.09.2014	Львів	35	VV
Ukraine 760_45_4	23.09.2014	Львів	45	VV
Ukraine 760_45_5	23.09.2014	Львів	45	CV
Ukraine 1147	07.08.2015	Луцьк	37	CV
Ukraine 2065	13.11.2015	Київ	38	VV
Ukraine 934	04.06.2016	Київ	36	VV
Ukraine 964	04.06.2016	Київ	36	VV

Отримані послідовності вирівнювали за допомогою програми MEGA 6 та використовували для філогенетичного аналізу. Філогенетичні зв'язки між українськими ізолятами та охарактеризованими високовірулентними, класичними, варіантними та атенуйованими штамами вірусу ІБХ досліджували за допомогою методу зближення сусідів (рис 6.1).

В результаті проведених досліджень отримали філогенетичне дерево. 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. 6.1).

Виявлені в Україні високовірулентні штами групувались в один кластер із високовірулентними штамами 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 штамами 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 між 99,8% (між штамми Ukraine_934 та Ukraine_964) до 94,4% (між штамми Ukraine_1517 та Ukraine_964).

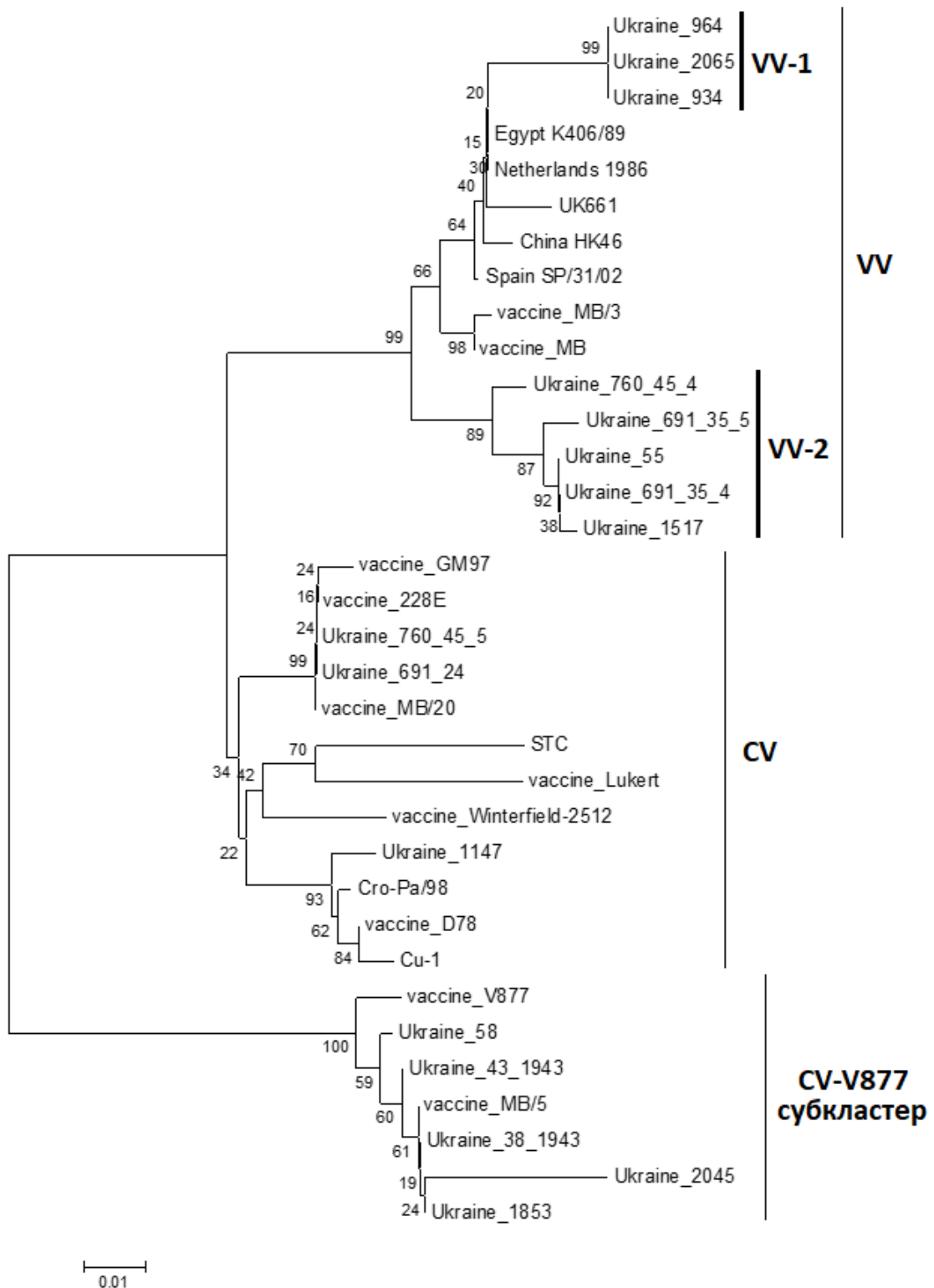


Рис. 6.1. Філогенетичне дерево 34 послідовностей гіперваріабельного регіону гену VP2 різних ізолятів вірусу ІВХ, побудоване за допомогою методу NJ. Результати бутстреп реплікації вказані під гілками (бутстреп – 1000). Масштабне позначення вказує на 0,01 нуклеотидних замін на сайт.

Решта аналізованих ізолятів вірусу ІБХ виявлених в Україні, за результатами філогенетичного аналізу були віднесені до класичних вірулентних штамів.

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 вірусними 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. Це може свідчити, що тварини, в яких були виявлені дані ізоляти вірусу ІБХ були вакциновані одним із вищезгаданих штамів вірусу.

Таким чином, у результаті досліджень було визначено, що 8 досліджуваних ізолятів вірусу ІБХ належать до високовірулентних штамів, 8 – до класичних вірулентних. Високовірулентні штами формували 2 субкластери. Було вперше показано наявність циркуляції високовірулентних штамів вірусу ІБХ в Україні.

6.2. Філогенетичний аналіз вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ.

Насьогодні існує велика кількість вакцин проти інфекційної бурсальної хвороби. Тому часто постає проблема вибору оптимальної вакцини для отримання високого рівня імунного захисту та одночасно зменшення негативного впливу вакцинних штамів із високим рівнем залишкової вірулентності на бурсу Фабріціуса. Саме тому надалі нами було здійснено порівняння послідовності VP2 HRV різних вакцинних штамів, зареєстрованих в Україні та польових українських ізолятів вірусу ІБХ.

В дослідженні використовували 11 вакцинних штамів, що входять до складу найбільш розповсюджених вакцин проти ІБХ в Україні, та 16 попередньо охарактеризованих польових ізолятів вірусу ІБХ.

Послідовності деяких вакцинних штамів були отримані із баз GeneBank, а саме: D78 (AJ586963), 228E (AF457204), Lukert (AY918948), V877 (AJ878882), MB (AY739669), Winterfield-2512 (DQ355819). Послідовності п'яти вакцинних штамів були недоступні в базах GeneBank, тому були секвеновані для доповнення бази вакцинних штамів. До них належали вакцинні штами: MB/20 (BioTestLab, Україна), MB/5 (BioTestLab, Україна), MB/3 (BioTestLab, Україна), LC-75 (Lohmann Animal Health GmbH, Німеччина), GM97 (Hirpa, Іспанія) [102, 103].

Для філогенетичного аналізу було використано нуклеотидну послідовність VP2 HRV розміром 426 нуклеотидів (рис. 6.2).

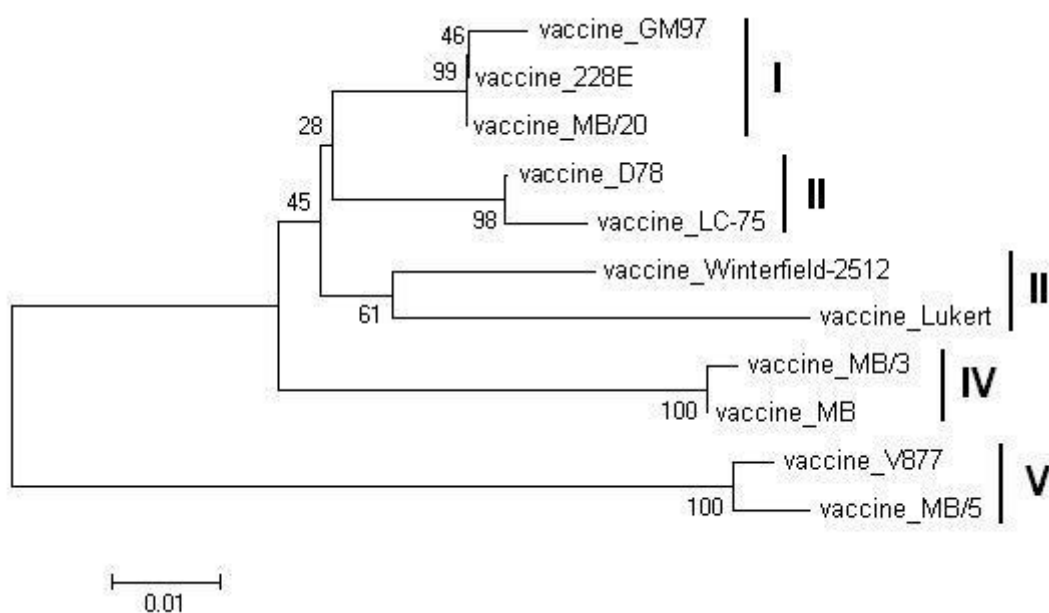


Рис. 6.2. Філогенетичне дерево VP2(HRV) 11 широко розповсюджених в Україні вакцинних штамів, побудоване за допомогою методу NJ. Результати бутстреп реплікації вказані під гілками (бутстреп – 1000). Масштабне позначення вказує на 0,01 нуклеотидних заміни на сайт.

Для визначення філогенетичних зв'язків між різними вакцинними штамами вірусу ІБХ, послідовності VP2 HRV 11 вакцинних штамів були використані для побудови філогенетичного дерева.

У результаті вакцинні штами формували 5 кластерів. До кластеру I належали штами «м'які» 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 штамами 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.

Було показано, що після додавання до аналізу польових штамів структура початкового дерева лишилась незмінною і нове філогенетичне дерево також формувалось із 5 кластерів (рис. 6.3). 8 високовірулентних штамів належали до кластеру IV із «середніми-плюс» вакцинними штамами. 3 класичних штами були споріднені із м'якими штамами в кластері I, один класичний штам належав до кластеру II та 5 класичних штамів належали до кластеру V.

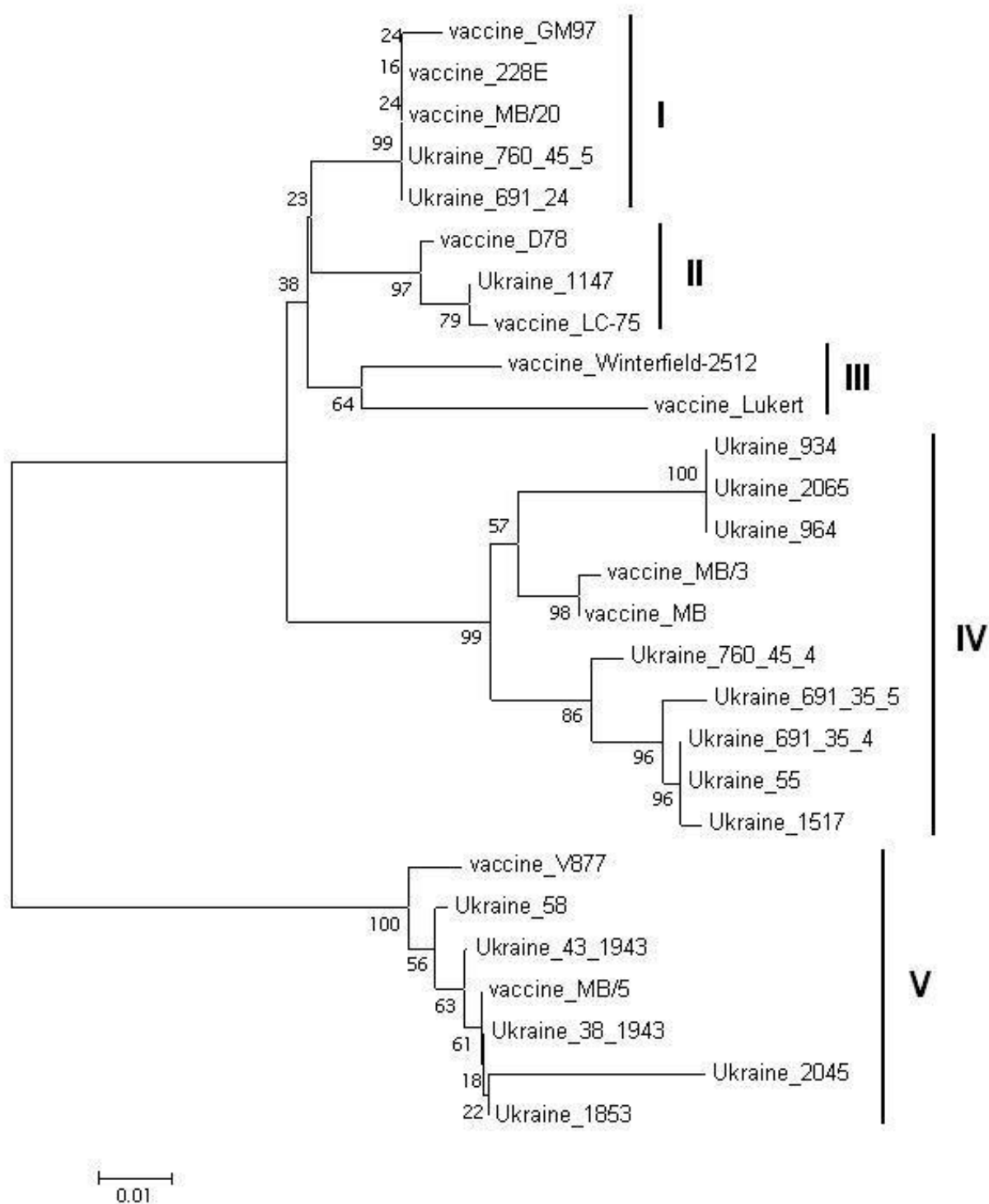


Рис. 6.3. Філогенетичне дерево VP2(HRV) вакцинних та польових штамів вірусу IBV, виявлених в Україні. Методи аналізу – NJ. Результати бутстреп реплікації вказані під гілками (бутстреп – 1000). Масштабне позначення вказує на 0,01 нуклеотидних замін на сайт.

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.

6.3. Дослідження амінокислотних послідовностей гіперваріабельного регіону гену VP2 вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ

Оскільки білок VP2 є основною антигенною детермінантою вірусу ІБХ, амінокислотні заміни, що відбуваються в ньому у зв'язку з мутаціями в гіперваріабельному регіоні гену VP2 відіграють важливу роль у вірулентності вірусу. Так, дослідження амінокислотної послідовності білку VP2 різних штамів вірусу показали, що такі амінокислотні залишки як: 222A, 256I, 294I та 299S зустрічаються у більшості високовірулентніших штамів вірусу ІБХ. [107]. Зокрема, дослідженні амінокислотного профілю високовірулентних штамів Латвії, було показано наявність вищезазначених сайтів. Крім цього, дослідники виявили додаткові сайти, а саме 219L, 220F, 254D, 279N та 280T, роль яких не була досліджена [107]. Також Van Loon та співав. показали, що адаптація польових штамів шляхом пасажування вірусу у культурах тканин призводить до появи амінокислотних замін у гіперваріабельному регіоні VP2, що в свою чергу призводить до зниження вірулентності досліджуваних штамів [131].

В дослідженні молекулярно-генетичних особливостей вірусу ІБХ під час природньої інфекції на фоні вакцинопрофілактики Jackwood показав, що заміна амінокислоти з гістидину на глутамін або аспарагін в положенні 253 гіперваріабельного регіону VP2 призводить до зростання рівня вірулентності атенуйованих штамів [37]. Крім цього, він показав, що для високовірулентних штамів вірусу ІБХ властива наявність серин-збагаченого

гептапептид SWSASGS біля другого гідрофільного регіону у положенні 326–332 [47].

Зважаючи на важливу роль амінокислотних замін для рівня вірулентності вірусу 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 GeneBank AJ878898) та «середнього-плюс штаму MB (номер GeneBank 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 IBX.

Для здійснення амінокислотного аналізу нуклеотидні послідовності гену VP2 всіх досліджуваних штамів було трансльовано в амінокислотну за допомогою програми MEGA 6. Далі проводили вирівнювання 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 GeneBank - D00869) [101].

В результаті дослідження було визначено, що всі 16 ізолятів вірусу IBX виявлені в Україні не мали амінокислотних замін, характерних до атенуйованих штамів вірусу, таких як 253-Гістидин та 284-треонін [107, 131] (рис. 6.4).

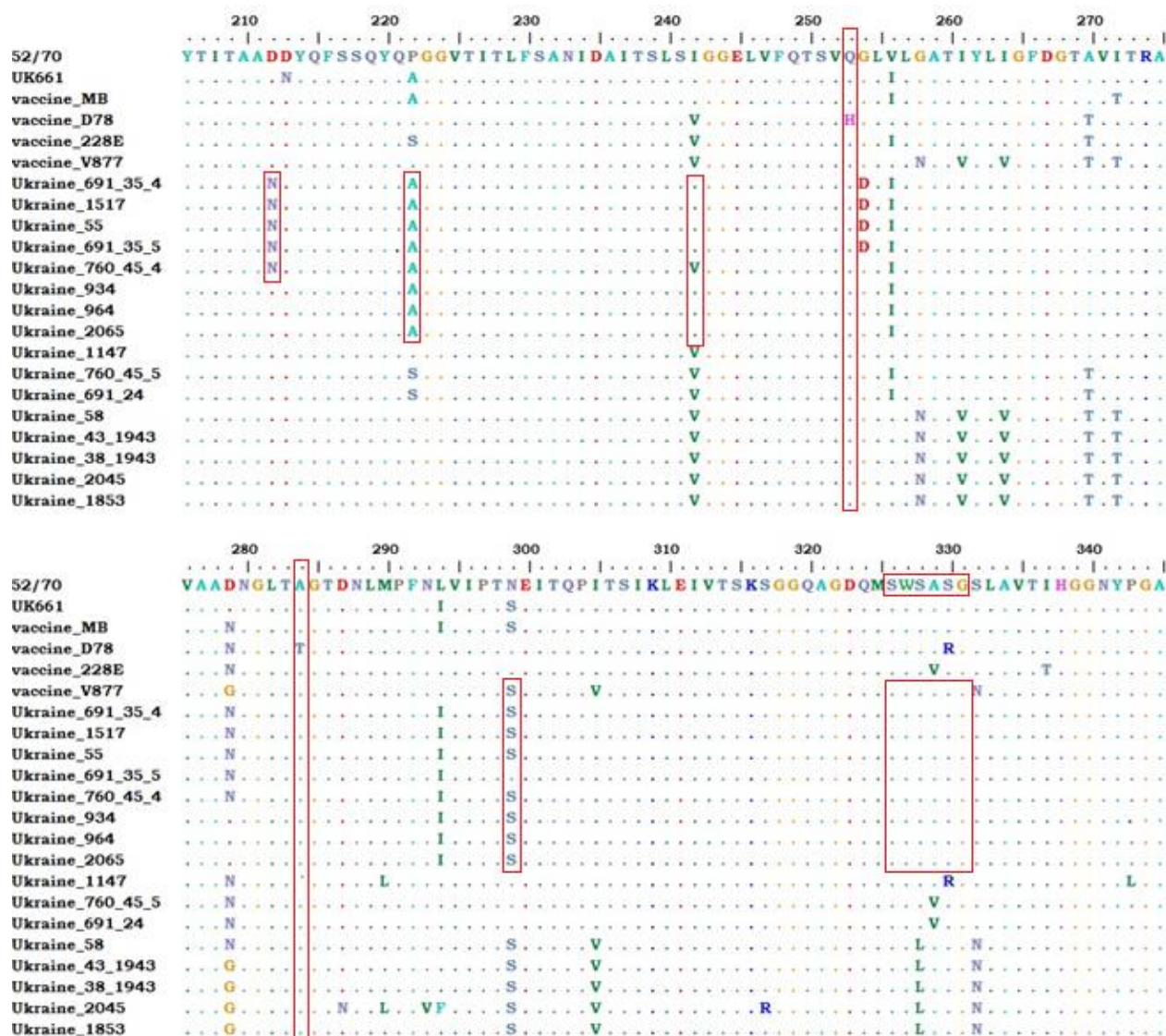


Рис. 6.4. Вирівнювання консенсусних амінокислотних послідовностей гіперваріабельного регіону гену VP2 в амінокислотних позиціях з 206 до 347 (нумерація відповідно до референтного штаму 52/70). Амінокислотні сайти однакові у різних штамів позначені крапками.

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 та 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 [37, 47, 90].

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 МВ та високовірулентних ізолятів показали високий рівень гомології між ними. Критичні сайти, що відповідають за вірулентність також збігаються у середнього-плюс штаму МВ 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 гену 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.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Вірус ІБХ, або інфекційної бурсальної хвороби належить до родини *Birnaviridae*, роду *Avibirnavirus* [134]. Генوم вірусу інфекційної бурсальної хвороби представлений двома сегментами (А та В) дволанцюгової РНК, завдяки чому вірусу властива мінливість в результаті реасортацій, рекомбінацій та точкових мутацій, за рахунок помилок в роботі РНК-залежної РНК-полімерази [26, 51, 57]. Вірусу ІБХ поширений у більшості країн світу, що спеціалізуються на промисловому вирощуванні птиці та є причиною значних економічних збитків. Він уражує курчат у віці 2-7 тижнів. Вірус реплікується в тканинах бурси Фабріціуса, тому призводить до тяжкої імуносупресії. Рівень смертності, що викликає вірус дуже високий, та коливається від 20 до 70% в залежності від патогенності штаму [53].

Вірус ІБХ вперше було виявлено ще наприкінці 50-х років 20 століття у США. Проблему інфекційної бурсальної хвороби долали шляхом вакцинування. Проте вже у 1986 році у центральній Європі набули поширення штами вірусу з високою вірулентністю. Інфікування ними призводило до загибелі птиці у 70% випадків, а вакцинування не надавало ефективного захисту [97]. Згодом було показано, що причиною появи нових штамів були мутації у гіперваріабельному регіоні гену VP2, що кодує основний капсидний білок вірусу [119, 145]. Протеїн VP2 містить антигенні детермінанти, які визначають серотип вірусу. На сьогодні описано 2 серотипи вірусу інфекційної бурсальної хвороби. 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 високо вірулентні штами. Існують також атенуйовані вакцинні штами, що за рівнем залишкової вірулентності поділяються на “м’які”, “середні” та “середні-плюс” [2].

Починаючи із 1980-тих років високовірулентні штами вірусу ІБХ поширилися у центральній Європі. У 1990-тих роках ці штами було вже

описано у Японії, Росії, країнах Близького Сходу, Азії, Південної Америки та Африки. Разом із тим відомості стосовно розповсюдження високовірулентних штамів у США, Канаді, Австралії та Новій Зеландії були відсутні. Натомість в цих країнах виникла проблема зумовлена появою варіантних штамів вірусу ІБХ [59, 106, 146, 150]. Такі штами на відміну від високовірулентних, не призводили до загибелі птиці, але викликали тяжку імуносупресію, внаслідок чого в уражених птахів спостерігали підвищення чутливості до інших патогенів. Починаючи з 2000-го років у США з'явилися повідомлення про спалахи інфекції, викликані високовірулентними штамми вірусу [50]. Окрім того випадки захворювання, викликаного вищезгаданими штамми вірусу ІБХ були зафіксовані в Україні [10, 166].

Дані серологічних досліджень вказують на те, що інфікування стад птиці коливається в межах 2-100%. Під час 63-ї Генеральної Сесії Міжнародного Епізоотичного Бюро в Парижі було повідомлено про випадки ІБХ у 95% країн та оголошено про значну соціально-економічну важливість цього захворювання у світі [6].

В Україні офіційно вірус ІБХ було зареєстровано співробітниками Інституту експериментальної та клінічної ветеринарної медицини в Одеській області в 1991 році [166]. У зв'язку з поширенням інфекції у 2000 році була розроблена інструкції про заходи профілактики та боротьби з інфекційною бурсальною хворобою. Проте даних з приводу характеристики поширення вірусу по всій території України опубліковано не було.

Зважаючи на вищевикладене ми вважали за доцільне здійснити серологічний моніторинг для оцінки поширення вірусу ІБХ в Україні. В період 2014-2016 роки нами було проведено серологічне дослідження сироваток крові курей зі 83 господарств з 20 регіонів України. Для виявлення антитіл до вірусу ІБХ було обрано 83 господарства із 20 областей України. Загалом було проаналізовано 20126 зразків сироватки крові відібраних від курей (*Gallus domesticus*) вік яких становив від 1 до 506 днів. У результаті

дослідження антитіла до вірусу ІБХ були виявлені у сироватці крові курей з усіх проаналізованих господарств та областей України. Поширення вірусу ІБХ було підтверджене для більшості регіонів України, окрім Закарпатської, Івано-Франківської, Луганської, Миколаївської та Чернівецької областей, за причини відсутності досліджуваних зразків із цих регіонів. Антитіла було виявлено у 19236 зразках сироватки крові. Значення титрів антитіл в позитивних зразках складали від 415 до 15576. Середнє значення титрів становило 5952. Не залежно від кількості проаналізованих господарств відсоток позитивних зразків у різних областях був дуже високим та коливався від 82,5% у Херсонській області до 100% у Чернігівській, Полтавській та інших областях. Нами було вперше підтверджено значне поширення вірусу ІБХ та неблагополучну епізоотичну ситуацію за цим захворюванням у більшості регіонах України. Результати серологічного моніторингу поширення вірусу ІБХ в Україні збігаються із загальноєвропейською та загальносвітовою тенденцією [97].

Враховуючи широке розповсюдження вірусу ІБХ важливою є його вчасна та швидка діагностика. З розвитком молекулярної біології з'явилися діагностичні методи, засновані на виявленні нуклеїнової кислоти вірусу в зразках, зокрема, ЗТ- ПЛР. Даний вид лабораторної діагностики є високочутливим та дозволяє виявити РНК збудника в досліджуваних матеріалах протягом декількох годин. Слід зазначити, що до 2007 року жодної інформації про детекцію вірусу методом ЗТ-ПЛР опубліковано не було. Вперше лабораторні методи ідентифікації вірусу ІБХ описав Бородавка О. зі співавторами [10]. Вони використовували метод полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації вірусу ІБХ в патологічному матеріалі, відібраному від птахів із клінічними ознаками захворювання. Даний метод детекції був запроваджений у практику лабораторії молекулярної діагностики ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики» та використовувався у нашому дослідженні.

Для ПЛР-дослідження відбирали патматеріал – бурсу Фабріціуса, тимус, нирки, селезінку. Зважаючи на високу варіабельність вірусу, праймери для ПЛР повинні бути підібрані до консервативних ділянок вірусу, подібних у різних штамів. Оскільки найбільш діагностично значимим за даними літератури є ген, що кодує білок VP2, саме до нього і підбирали праймери. Так Бородавка О. [10] у своїх дослідженнях використовував набір із двох пар праймерів, що обмежували гіперваріабельний регіон гену VP2. Використання двох пар праймерів було необхідним для підвищення чутливості реакції, оскільки вірусу характеризується значним рівнем варіабельності.

Нами було використано дві пари праймерів для проведення гніздової ПЛР. Перша пара праймерів обмежувала частину гену VP2 розміром 643 п.н.. Друга пара праймерів була комплементарна до послідовностей всередині першої ділянки і обмежувала нуклеотидну послідовність розміром 552 п.н.. Оскільки попередні дослідження не доводили високий рівень чутливості та специфічності даних праймерів, було доцільно провести валідацію обраних олігонуклеотидних послідовностей для діагностики вірусу ІБХ.

Для валідації обраних для роботи праймерів проводили спільні міжлабораторні дослідження із співробітниками ветеринарної діагностичної лабораторії (Девентер, Нідерланди). Під час дослідження працювали із зашифрованими зразками, надісланими вказаною лабораторією. Після розшифрування зразків та аналізу результатів нами було доведено валідність обраних праймерів, а також їх специфічність для виявлення вірусу ІБХ в різних видах зразків.

Важливою характеристикою інфекції, викликаної вірусом ІБХ є ступінь виснаження бурси Фабріціуса. Цей показник досліджується для оцінки безпечності вакцин проти ІБХ. Оскільки в Україні у зв'язку із значним поширенням інфекції застосовують профілактичні заходи (вакцинацію) проти інфекційної бурсальної хвороби, важливо розрізняти вплив польових та вакцинних штамів вірусу на таргетний орган – бурсу Фабріціуса. Саме

тому протягом дослідження ми здійснювали порівняння стану виснаження фолікул бурс вакцинованих та інфікованих птахів за допомогою гістологічного дослідження. У результаті було показано, що за інфікування високовірулентними вірусами призводить до появи значних крововиливів у фолікулах, а також лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярному просторі. Таких ознак не спостерігали за впливу вакцинних штамів. Таки чином виявлені зміни є специфічними для ураження високовірулентними штамми вірусу ІБХ. Отримані нами результати збігаються із даними інших авторів, зокрема Jackwood та Sommer-Wagner [48]. Ці дані можна використовувати для диференціювання поствакцинальної та постінфекційної реакції на вірус ІБХ.

Для захисту птиці від захворювань використовується комплексна специфічна профілактика із застосуванням вакцин різних типів (живих, інактивованих, імунокомплексних, векторних і т.д.). Відомості про значне поширення вірусу ІБХ Україні і закордонний досвід вказують на важливість і актуальність специфічної профілактики. Безсистемне застосування вакцинних препаратів може призвести до непередбачуваних наслідків. Існуюча в Україні система протиепізоотичних заходів, вимагає постійного удосконалення. Важливою частиною заходів спрямованих на зменшення циркуляції вірусних інфекцій є їх достовірна діагностика. Зважаючи на поширенням високовірулентних штамів вірусу інфекційної бурсальної хвороби у світі, в тому числі й в Україні, для захисту птиці почали застосовувати масштабне вакцинування, насамперед, живими атенуйованими вакцинами. Здебільшого такі вакцини створюють застосовуючи штами із високим рівнем залишкової вірулентності [88]. Тим не менш масові вакцинації призвели до деяких негативних наслідки. Так вищезгадані вакцинні штами, розмножуючись у тканинах бурси призводили до значного виснаження фолікулів, по аналогії з високовірулентними вірусами. Внаслідок цього постала необхідність

диференціювання вакцинних та польових штамів вірусу, що виявляли у тканинах бурс уражених птахів.

Наприкінці ХХ ст. з'явилися перші спроби класифікувати штами вірусу інфекційної бурсальної хвороби за допомогою вивчення послідовностей нуклеотидів сегменту РНК, що кодує капсидний білок VP2. Згодом D.J. Jackwood зі співавторами [45] запропонували систему класифікації штамів вірусу ІБХ, яка ґрунтується на відмінностях нуклеотидних послідовностей гена VP2 і давала можливість розрізняти вакцинні та високовірулентні штами. Окрім того ними було показано, що для високовірулентних штамів властива наявність унікального сайту рестрикції *SspI* [49, 50].

Молекулярна характеристика польових ізолятів вірусу є важливою з точки зору підбору ефективної вакцинації. Найбільш дієвими для захисту птахів від ІБХ вважаються вакцини, створені на основі атенуєваних штамів, що виявляють найвищий ступінь спорідненості до ізолятів, які циркулюють у птахів в місцях їх промислового вирощування. Для вирішення проблеми диференціювання штамів ІБХ Vorodavka зі співавторами [10] розробили метод діагностики захворювання на основі зворотньотранскрипційної ПЛР та рестрикційного аналізу фрагменту геному VP2. Результати отримані у ході дослідження співпадали із отриманими раніше D.J. Jackwood зі співав. та свідчили про наявність у високовірулентних штамів вірусу ІБХ сайту рестрикції *SspI*. Проте не було охарактеризовано рестрикційний профіль вакцинних штамів із різним рівнем залишкової вірулентності. Внаслідок масової вакцинації птахів на господарствах існує велика імовірність виявлення вакцинних штамів вірусу у зразках бурс, відібраних від уражених курей. Зважаючи на це, ми вважали за доцільне дослідити рестрикційний профіль вакцинних штамів. Для цього ампліфіковану послідовність гіперваріабельного регіону геному VP2 усіх виявлених ізолятів вірусу піддавали рестрикції, після чого отримані рестрикційні профілі порівнювали між собою. Для диференціювання

польових ізолятів вірусу від вакцинних ми здійснили рестрикційний аналіз послідовності гіперваріабельного регіону гену VP2 9 вакцинних штамів вірусу ІБХ, зареєстрованих в Україні, а саме: 228E, GM97, MB/20, D78, Winterfield-2512, V877, MB/5, MB та MB/3. У дослідженні використовували 6 рестриктаз: *Eco911* (*BstEII*), *MboI*, *SacI*, *BspMI*, *MvaI* (*BstNI*), та *SspI*. У результаті проведених досліджень нами було показано, що 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 фрагмент розміром 413 п.н. Штами V877 та MB/5 характеризувалися наявністю сайтів рестрикції для ендонуклеаз рестрикції *BstEII*, *MboI*, *SacI* та *MvaI*. На відміну від вищезазначених 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. На відміну від усіх проаналізованих вакцинних ізолятів штам Winterfield-2512 характеризується унікальним набором сайтів рестрикції, не притаманним іншим дослідженим штамам. Зокрема, у послідовності гену VP2 було виявлено сайти рестрикції для ендонуклеаз рестрикції *MboI*, *SacI*, *MvaI* (*BstNI*) та *SspI*.

Деякі дослідники зазначали наявність сайту рестрикції *SspI* у гені VP2 високовірулентних ізолятів вірусу. Цей сайт за даними Jackwood зі співавторами [46] був унікальним для високовірулентних штамів вірусу ІБХ. Проте, даний сайт рестрикції наявний також у вакцинних штамів із високим рівнем залишкової вірулентності. Таким чином, сайту *SspI* більше не достатньо для виокремлення високовірулентних штамів вірусу ІБХ з поміж вакцинних. У ході досліджень нами було знайдено додатковий

сайт рестрикції, що дозволяє віддиференціювати польові штами від «гарячих» вакцинних штамів, а саме сайт BstE2. Середні-плюс штами характеризувались наявністю сайту BstE2, що відрізняло їх від високовірулентних.

Отже високовірулентні штами характеризувались наявністю унікального сайту рестрикції Ssp1 та відсутністю сайту BstE2.

Водночас у вакцинних штамів із низьким та середнім рівнем залишкової вірулентності наявний сайт Sac1, якого не було виявлено у високовірулентних штамів.

Загалом більшість проаналізованих ізолятів за рестрикційним профілем були подібні до різних вакцинних штамів. 5% ізолятів мали характерні сайти для високовірулентних штамів.

З огляду на велику різноманітність та високу варіабельність штамів вірусу IBX, з'ясування походження досліджених ізолятів вірусу є необхідним для визначення ступеню їх вірулентності. При аналізі штамів, виявлених у птахів із 18 країн світу, Jackwood та Sommer-Wagner [48] показали, що незважаючи на високий рівень смертності, лише 80 % були філогенетично споріднені із високовірулентними штамми. Інші 20 % ізолятів походили від варіантних штамів. Оскільки для захисту проти різних типів штамів необхідно використовувати специфічні вакцини, аналіз походження виявлених ізолятів є необхідним для адекватної вакцинації тварин.

З огляду на вищевикладене, визначали нуклеотидну послідовність гіперваріабельного регіону гену VP2 ізолятів, що за рестрикційним профілем були подібні до референтного високовірулентних штамів.

Загалом було здійснено секвенування 16 польових та 5 вакцинних штамів вірусу IBX. Для повноти аналізу нами були підібрані польові та вакцинні штами вірусу IBX із бази GenBank з різних країн. Філогенетичний аналіз гену VP2 ізолятів вірусу IBX вказує на циркуляцію високовірулентних варіантів вірусу IBX в Україні, що споріднені до інших виділених у Європі та Азії штамів. За результатами філогенетичного аналізу 8 штамів вірус IBX

групувались із ВВ штамми (United Kingdom, UK661 (AJ878898); Egypt, K406/89 (AF159218); China, HK46 (AF051838); Netherlands, 1986 (Z25482); Spain, SP/31/02 (AY770593). ВВ штамми формували два субкластери (VV-1 та VV-2). Рівень гомології між ВВ штамми коливався від 99,8% (між 934 та 964) до 94,4% (між 1517 та 964). 8 штамів були споріднені із класичними штамми вірусу ІБХ.

Штами 760_45_5, 691_24 та 1147 були близько споріднені із референс штамми CU-1 (AF362771), Cro-Pa/98 (EU184689) та вакцинними штамми.

Найбільш філогенетично віддаленими, виявилась група ізолятів (58, 43_1943, 38_1943, 2045 та 1853) близькоспоріднена із штамми V877 та MB/5, що широко застосовується як вакцинні штамми в Україні.

Таким чином, результати філогенетичного аналізу свідчать про те, що виявлені ізоляти вірусу не походили від вакцинних та були близькоспорідненими із високовірулентними штамми вірусу ІБХ.

Внаслідок широкого використання різноманітних живих вакцин проти ІБХ в Україні та світі постає проблема розрізнення вакцинних штамів між собою. Для розуміння генетичної різноманітності вакцинних штамів, що входять до складу вакцин проти інфекційної бурсальної хвороби, зареєстрованих в Україні, нами було здійснено філогенетичний аналіз. В результаті, вакцинні штамми формували 5 філогенетичних кластерів. Кластер I та II включає м'які вакцинні штамми, кластер III та V включає середні, та кластер IV – гарячі вакцинні штамми.

Щоб дослідити філогенетичні зв'язки між різними вакцинними штамми та українськими польовими ізолятами філогенетичного дерева вакцинних штамів, ми додали послідовності від 16 українських польових ізолятів. У результаті цього структура дерева не зазнала змін, ми так само отримали 5 філогенетичних кластерів, при цьому польові ізоляти згрупувались із різними вакцинними штамми в залежності від їх генетичної спорідненості. 8 високовірулентних ізолятів групувались із гарячими

вакцинними штамми, 8 класичних вірулентних штамів групувались із середніми та м'якими вакцинними штамми вірусу ІБХ.

Багато авторів відмічають важливість амінокислотних замін у білку VP2. Послідовність гіперваріабельного регіону VP2 варіює, проте типово містить такі амінокислотні залишки як: 222A, 256I, 294I та 299S [107]. Так у дослідженні амінокислотного профілю високовірулентних штамів Латвії, було показано наявність вищезазначених сайтів. Крім цього, дослідники виявили додаткові сайти, а саме 219L, 220F, 254D, 279N та 280T, роль яких не була досліджена [107]. Також Van Loon та співав. показали, що адаптація польових штамів шляхом пасажування вірусу у культурах тканин призводить до появи амінокислотних замін у гіперваріабельному регіоні VP2, що в свою чергу призводить до зниження вірулентності досліджуваних штамів [131]. В дослідженні молекулярно-генетичних особливостей вірусу ІБХ під час природньої інфекції на фоні вакцинопрофілактики Jackwood показав, що заміна амінокислоти з гістидину на глутамін або аспарагін в положенні 253 гіперваріабельного регіону VP2 призводить до зростання рівня вірулентності атенуйованих штамів [37].

Для розуміння антигенної природи білку VP2 польових ізолятів нами було здійснено аналіз консенсусних амінокислотних послідовностей. Аналізований регіон включав 142 амінокислоти (з 206 по 347 сайти). В результаті дослідження було визначено, що жоден із українських штамів не був вакцинного походження, оскільки відсутні мутації в сайтах 253-Гістидин та 284-Треонін, які зазвичай зустрічаються в атенуйованих вакцинних штамів.

Були відмічені характерні для високовірулентних штамів заміни в сайтах 222A, 242I (окрім штаму Ukraine 760_45_4), 256I, 294I, та 299S (окрім Ukraine 691_35_5). Також у 8 штамів був знайдений гептапептид SWSASGS, що також підтверджує високовірулентну природу виявлених штамів.

Амінокислотний аналіз підтвердив дані філогенетичного аналізу. Отримані нами результати свідчать про те, що філогенетичний аналіз можна

використовувати для підбору правильних схем вакцинації для попередження ІБХ в господарствах України.

Таким чином, нами було охарактеризовано високовірулентні штами вірусу інфекційної бурсальної хвороби, поширені на території України. Ці результати у подальшому можуть бути використані для аналізу штамів вірусу, що циркулюють у птахів у місцях їх промислового вирощування на та підборі ефективних вакцин 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 штами 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abed M, Soubies S, Courtilon C, et. al. Infectious bursal disease in Algeria: detection of highly pathogenic reassortants viruses. *Inf Genet Evol.* 2018;60:48–57.
2. Alkie T. N. Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses and development of a microparticle based vaccine / T. N. Alkie // Dissertation, University of Veterinary Medicine Hannover. – 2013. – P. 4–46.
3. Alkie, T.N., and S. Rautenschlein. Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Vet. Med. Res. Rep.* 2016;7:9-18.
4. Aoyagi K. PCR Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide, Wiley-Liss. – 2001. – P. 291-322.
5. Bartlett J. M.S., Stirling D. PCR Protocols Methods in Molecular Biology, Humana Press.-2003;226:81–101.
6. Berg T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology.* 2000;29:175–194.
7. Birghan C., Mundt E., Gorbalenya A.E. A non-canonical ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *The Embo journal.* 2000;19(1):114–123.
8. Boot H. J., Ter A. A., Huurne, A. J. W. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol.* 2000;74:6701-6711.
9. Boot, H. J., Hoekman A. J. W., Gielkens A. L. J. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Archives of virology.* 2005;150:137-144.
10. Borodavka O., Deryabin O. Differentiation of infectious bursal disease viruses using RT-PCR and restriction analysis of obtained amplicons *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology.* 2008;51:18-21.

11. Boudaoud A., Mamache B., Tombari W. Ghram A. Virus mutations and their impact on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro disease) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2016;35(3):P.1-29.
12. Brandt, M., Yao K., Liu M. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2001;75:11974-11982
13. Brown, M. D., Skinner M. A. Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 1996;40:1-15
14. Bublot M., Pritchard N., Le Gros F.-X. Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *Journal of Comparative Pathology.* 2007;137(1):81–84.
15. Busnadiego I., Maestre A.M., Rodriguez J.F. The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS One.* 2012;7(10):1–12.
16. Cardoso M. B. de Paula et al. Identification and Molecular Characterization of the Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) From an Outbreak in a Broiler Flock in Midwestern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2004;35:352-358.
17. Casanas A., Navarro A., Ferrer-Orta C. Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure.* 2008;16(1):29–37.
18. Caston J.R., Rodriguez J.F., Carrascosa J.L. Infection bursal disease virus: a segmented double-stranded RNA virus with a T=13 capsid that lacks a T=1 core. *Segmented Double-stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology.* – 2008. – P. 133 – 144.
19. Chevalier, C., Lepault J., Da Costa B., Delmas B. The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2004;78:3296-3303

20. Cortey M, Bertran K, Toskano J, Majó N, Dolz R. Phylogeographic distribution of very virulent infectious bursal disease virus isolates in the Iberian Peninsula. *Avian Pathol.* 2012;41(3):277–284.
21. Delgui L., Ona A., S. Gutierrez D. et. al. The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology.* 2009;386:360-372.
22. Durairaj V., Sellers H.S., Linnemann E.G., Icard A.H., Mundt E. Investigation of the antigenic evolution of field isolates using the reverse genetics system of infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol.* 2011;156(10):1717–1728.
23. Escaffre, O., Le Nouen C., Amelot M., et al. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2013;87(5):2767–2780.
24. Galloux M., Libersou S., Alves I.D. NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: a view on the early steps of the birnavirus entry process. *The journal of biological chemistry.* 2010;285(25):19409 – 19421.
25. Galloux M., Libersou S., Morellet N. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *The journal of biological chemistry.* 2007;282(28):20774 – 20784.
26. Gao L, Li K, Qi X, Gao H, Gao Y., et. al. Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J Gen Virol.* 2014;95:888–897
27. Garriga D., Querol-Audi J., Abaitua F. The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T = 1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *Journal of Virology.* 2006;80(14):6895 – 6905.
28. Gimenez M.C.; Rodriguez, A.J.; Colombo, M.I.; Delgui, L.R. Infectious bursal disease virus uptake involves macropinocytosis and trafficking to early

- endosomes in a Rab5-dependent manner. *Cell. Microbiol.* 2015;(17):988–1007.
29. Gomes A.D., Abreu J.T., Redondo R.A.F. et al. Genotyping of Infectious Bursal Disease Virus Strains by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the VP1, VP2, and VP3 Genes. *Avian Diseases.* 2005;49:500 – 506.
 30. Goode T., Ho W.-Z., O'Connor T. Nested RT-PCR. *RT-PCR Protocols Methods in Molecular Biology.* 2002;193:65 – 79.
 31. He X, Xiong Z, Yang L, Guan D, Yang X, Wei P. Molecular epidemiology studies on partial sequences of both genome segments reveal that reassortant infectious bursal disease viruses were dominantly prevalent in southern China during 2000–2012. *Arch Virol.* 2014;159(12):3279–3292.
 32. Hernández M, Tomás G, Marandino A, et al. Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage. *Avian Pathol.* 2015;44(3):212–221.
 33. Hirai K., Shimakura S. Structure of infectious bursal disease virus / K. Hirai, S. Shimakura. *Journal of Virology.* 1974;14(4):957 – 964.
 34. Hu, B.; Zhang, Y.; Jia, L.; Wu, H.; Fan, C. et al. Binding of the pathogen receptor HSP90AA1 to avibirnavirus VP2 induces autophagy by inactivating the AKT-MTOR pathway. *Autophagy.* 2015;11:503–515.
 35. Islam, M. R., Zierenberg K. Muller H. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch Virol.* 2001;146:2481-2492.
 36. Iván J., Velhner M., Ursu K. et al. Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: Quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 2005;69:135-142.

37. Jackwood D. J., Sreedevi B., Lefever L. J., Sommer-Wagner S. E. Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology*. 2008;377:110-116
38. Jackwood D.J. Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 2012;56(3):574–577.
39. Jackwood D.J. Multivalent virus-like-particle vaccine protects against classic and variant infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 2013;57:41–50
40. Jackwood D.J. Recent trends in the molecular diagnosis of infectious bursal disease viruses. *Anim Health Res Rev*. 2004;5(2):313–316.
41. Jackwood D.J. Crossley B.M., Stoute S.T. Diversity of genome segment B from infectious bursal disease viruses in the United States. *Avian Dis*. 2012;56(1):165–172.
42. Jackwood D.J., Saif Y.M., Moorhead P.D. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis*. 1985;29(4):1184–1194.
43. Jackwood D.J., Sommer S.E. Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. *Virology*. 2002;304(1):105–113.
44. Jackwood D.J., Sommer S.E. Molecular studies on suspect very virulent infectious bursal disease virus genomic RNA samples. *Avian Dis*. 2005;49(2):246 – 251.
45. Jackwood D.J., Sommer S.E. Restriction Fragment Length Polymorphisms in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases*. 1997;41:627-637.
46. Jackwood D.J., Sommer S.E. Restriction Fragment Length Polymorphisms in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses from Outside the United States. *Avian Diseases*. 1999;43:310–314.

47. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology*. 2011;409(1):33 – 37.
48. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. Detection and characterization of infectious bursal disease viruses in broilers at processing. *Prev Vet Med*. 2010;97(1):45–50.
49. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*. 2007;365(2):369–375.
50. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses: distribution and genetic analysis of newly emerging viruses in the United States. *Avian Dis*. 2005;49:220–226.
51. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E., Crossley B.M. Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology*. 2011;420(2):98–105.
52. Jackwood, D.J., Spalding B.D., Sommer S.E. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 2003;47:738–744.
53. Jayasundara J.M.; Walkden-Brown S.W.; Katz M.E., et. al. Pathogenicity, tissue distribution, shedding and environmental detection of two strains of IBDV following infection of chickens at 0 and 14 days of age. *Avian Pathol*. 2016; 93:1–14.
54. Jenberie S, Lynch SE, Kebede F, et al. Genetic characterisation of infectious bursal disease virus isolates in Ethiopia. *Acta Trop*. 2014;130(100):39-43.
55. Kataria R.S., Tiwari A. K., Nanthakumar T., Goswami P.P. One-Step RT-PCR for the Detection of Infectious Bursal Disease Virus in Clinical Samples. *Veterinary Research Communications*. 2001;25:429-436.
56. Kegne T., Chanie M. Review on the Incidence and Pathology of Infectious Bursal Disease. *British Journal of Poultry Sciences*. 2014;3(3):68–77.

57. Kibenge F.S., Jackwood D.J., Mercado C.C. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol.* 1990;71(3):569–577.
58. Kim I.J., Karaca K., Pertile T.L. Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;61(2):331–341.
59. Kurukulsuriya, S.; Ahmed, K.A.; Ojkic, D.; Gunawardana, T.; et al. Circulating strains of variant infectious bursal disease virus may pose a challenge for antibiotic-free chicken farming in Canada. *Res. Vet. Sci.* 2016;108:54–59.
60. Kutkat M.A., Ahmed H.M., Khali S.A. Studies on proventriculitis in Broilers with molecular characterization to its viral causes. *Journal of American Science.* 2010;6(9):582–592.
61. Le Nouen C., D. Toquin, H. Muller et. al. Different domains of the RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. *PLoS One.* 2012;7(1):1-16.
62. Le Nouen C., Rivallan G., D. Toquin D., Eterradosi N. Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Arch Virol.* 2005;150:313-325.
63. Le Nouen C., Rivallan G., Toquin D. et. al. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol* 2006;87:209-216.
64. Lejal N., Da Costa B., Huet J.C. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *Journal of General Virology.* 2000;81(4):983–992.
65. Letzel T., Coulibaly F., Rey F.A. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2007;81(23):12827–12835.
66. Li K, Courtilon C, Guionie O, et al. Genetic, antigenic and pathogenic characterization of four infectious bursal disease virus isolates from China

- suggests continued evolution of very virulent viruses. *Infect Genet Evol.* 2015;30:120–127.
67. Li Y. P., Bang D. D., Handberg K. J. et al. Evaluation of the suitability of six host genes as internal control in real-time RT-PCR assays in chicken embryo cell cultures infected with infectious bursal disease virus. *Veterinary Microbiology.* 2005;110:155-165.
 68. Li Z. H., Wang Y. Q., Xue Y. F. et. al. Critical Role for Voltage-Dependent Anion Channel 2 in Infectious Bursal Disease Virus- Induced Apoptosis in Host Cells via Interaction with VP5. *Journal of Virology.* 2012;86:1328-1338.
 69. Lim, B. L., Cao Y. C, Yu T. Mo C. W. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J Virol* 1999;73:2854-2862.
 70. Lin, W.; Zhang, Z.; Xu, Z.; Wang, B.; et. al. The Association of Receptor of Activated Protein Kinase C 1 (RACK1) with Infectious Bursal Disease Virus Viral Protein VP5 and Voltage-dependent Anion Channel 2 (VDAC2) Inhibits Apoptosis and Enhances Viral Replication. *J. Biol. Chem.* 2015;290:8500–8510.
 71. Liu M., Vakharia, V. N. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology.* 2004;330:62-73.
 72. Lombardo E., Maraver A., Espinosa I. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology.* 2000;277(2):345–357.
 73. Lu Z., Zhang L., Wang N., Chen Y., et. al. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. *Virus Res.* 2015;203:92–95.
 74. Lukert P. D., Davis R. B. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis.* 1974;18:243-250.
 75. Lukert P. D., Saif Y.M. Infectious Bursal Disease (Gumboro) // Poultry Diseases, ed. by J. Calnek, 1997. – P. 830 – 847.

76. Luo J., Zhang H., Teng M. Surface IgM on DT40 cells may be a component of the putative receptor complex responsible for the binding of infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*. 2010;39(5):359–365.
77. Mahgoub H.A., Bailey M., Kaiser P. An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol*. 2012;157(11):2047–2057.
78. Mahmood M.S., Hussain I., Siddique M. DNA vaccination with VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) delivered by transgenic *E. coli* DH5alpha given orally confers protective immune responses in chickens. *Vaccine*. 2000;25(44):7629–7635.
79. Maity H.K., Dey S., Mohan C.M., et. al. Protective efficacy of a DNA vaccine construct encoding the VP2 gene of infectious bursal disease and a truncated HSP70 of *Mycobacterium tuberculosis* in chickens. *Vaccine*. 2015;33(8):1033-1039.
80. Martinez-Torrecuadrada J.L., Saubi N., Pages-Mante A. Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. *Vaccine*. 2003;21(23):3342–3350.
81. Mawgod S.A., Arafa A.S., Hussein H.A. Molecular genotyping of the infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from Broiler Flocks in Egypt. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2014;2(1):46–52.
82. McDonald S.M., Nelson M.I., Turner P.E., Patton J.T. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanism and outcomes. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:448–460
83. Michel L. O, Jackwood D. J. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch Virol*. 2017;162:3661–3670.
84. Mickael C.S. Real-Time RT-PCR Analysis of Two Epitope Regions Encoded by the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Virus / C.S. Mickael // Dissertation, Ohio State University. – 2005. – P. 14 – 42.
85. Mittal D., Jindal N., Gupta S.L., Kataria R.S., Tiwari A. K. Detection of Infectious Bursal Disease Virus in Field Outbreaks in Broiler Chickens by

- Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Poultry Science*. 2005;4:239-243.
86. Mosley Y.Y., Wu C.C., Lin T.L. Infectious bursal disease virus rescued efficiently with 3' authentic RNA sequence induces humoral immunity without bursal atrophy. *Vaccine*. 2013;31(4):704–710.
 87. Muller H., Islam M.R., Raue R. Research on infectious bursal disease – the past, the present and the future. *Vet Microbiol*. 2003;97(1):153–165.
 88. Muller H., Mundt E., Eterradossi N. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology*. 2012;41;(2):133–139.
 89. Mundt E., Kollner B., Kretzschmar D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 1997;71:5647-5651.
 90. Mundt, E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J Gen Virol*. 1999;80:2067-2076.
 91. Nagarajan M.M. Studies on Molecular Mechanisms of Virulence of Infectious Bursal Disease Virus / M.M. Nagarajan // Dissertation, University of Prince Edward Island. – 1999. – P. 3 – 11.
 92. Nascimento G.M., Ferreira H.L., Arns C.W. Infectious bursal disease virus-induced chicken innate immune genes expression. *Hosts and Viruses. Journal BJV*. 2017.4(1):1-15.
 93. Nick H., Cursiefen D., Becht H. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*. 1976;18(1):227–234.
 94. Nwagbo I.O., Shittu I., Nwosuh C.I., et. al. Molecular characterization of field infectious bursal disease virus isolates from Nigeria. *Vet World*. 2016;9:1420–1428.
 95. O'Connell J. et al. RT-PCR in Biomedicine // *Methods in Molecular Biology*, Humana Press. – 2004. – Vol. 193. – P. 3 – 25.
 96. Ogawa H., Yamagushi T., Setiyono A. et. al. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Arch Virol* 1998;143:2327-2341

97. OIE Manual / Chapter 2.3.12., Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease); OIE. – 2008. – P. 549 – 565.
98. Ouyang W., Wang Y., Du X., Liu H.J, Zhang H.B. Gga-miR-9 inhibits IFN production in antiviral innate immunity by targeting interferon regulatory factor 2 to promote IBDV replication. *Vet Microbiol.* 2015;178(1–2):41–49.
99. Pan J., Vakharia V.N., Tao Y.J. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:18:7385–7390.
100. Park J.H., Sung H.W., Yoon B.I. Protection of chicken against very virulent IBDV provided by in ovo priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine and the adjuvant effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and interferongamma. *Journal of Veterinary Science.* 2009;10(2):131 –139.
101. 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):24-31.
102. 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.
103. 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.
104. 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). 24-27.
105. Pastyria A., Sobko I., Polischuk V. Restriction analysis and differentiation of Ukrainian strains of infectious bursal disease virus. *Biopolymers and cell.* 2017;33(1):58-63.

106. Perozo F., Villegas A.P., Fernandez R. Efficacy of single dose recombinant herpesvirus of turkey infectious bursal disease virus (IBDV) vaccination against a variant IBDV strain. *Avian Diseases*. 2009;53(4):624–628.
107. Piķuła A., Domańska-Blicharz K., Cepulis R., Śmietanka K. Identification of infectious bursal disease virus with atypical VP2 amino acid profile in Latvia. *J Vet Res*. 2017;61:145–149.
108. Piķuła A., Lisowska A., Jasik A., Śmietanka K. Identification and assessment of virulence of a natural reassortant of infectious bursal disease virus *Vet Res* 2018;49(89):1-11.
109. Pitcovski J., Gutter B., Gallili G. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*. 2003;21(32):4736–4743.
110. Pradhan S.N., Prince P.R., Madhumathi J., et al. DNA vaccination with VP2 gene fragment confers protection against infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Microbiol*. 2014;171(1–2):13–22.
111. Qin Y., Zheng S. J. Infectious Bursal Disease Virus-Host Interactions: Multifunctional Viral Proteins that Perform Multiple and Differing Jobs *Int. J. Mol. Sci*. 2017;18(161):1-8.
112. Rasoli M., Yeap S.K., Tan S.W., et al. Differential modulation of immune response and cytokine profiles in the bursae and spleen of chickens infected with very virulent infectious bursal disease virus. *BMC Vet Res*. 2015;11:75-86.
113. Rautenschlein S, Yeh H.Y., Sharma J.M. Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. *Avian Dis*. 2003;41(1):66–78.
114. Rauw F., Lambrecht B., van den Berg T. Pivotal role of ChIFNγ in the pathogenesis and immunosuppression of infectious bursal disease. *Avian Pathol*. 2007;36(5):367–374.

115. Rehman Z.U., Meng C., Umar S., Munir M. Interaction of infectious bursal disease virus with the immune system of poultry *World's Poultry Science Journal*. 2016;72:805-820
116. Ren, X.; Zhang, L.; Gao, Y.; et al. Binding chicken Anx2 is beneficial for infection with infectious bursal disease virus. *Virus Res*. 2015;210:232–240.
117. Ruth L. et al. Alkami Quick Guide for PCR // Alkami. – 1999. – P. 22-111.
118. Sa E.S.M., Rissi, D.R., Swayne, D.E. Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Produces More-Severe Disease and Lesions in Specific-Pathogen-Free (SPF) Leghorns Than in SPF Broiler Chickens. *Avian Dis*. 2016;60:63–66.
119. Sanchez A.B., Rodriguez J.F. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999;262(1):190–199.
120. Sapats S.I., Trinidad L., Gould G., Heine H.G. et al. Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus. *Archives of Virology*. 2006;151:1551-1566.
121. Sharma J.M., Kim I.J., Rautenschlein S. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology*. 2000;(2):223 –235.
122. Shoshtari A.H., Pourbakhsh S.A., Dadras H.A. Pathogenicity Study and Restriction Enzyme Profile of a Recently Isolated Infectious Bursal Disease Virus in Iran. *Arch. Razi Ins*. 2004;58:9–18.
123. Silva F.M., Vidigal P., Myrrha L., et. al. Tracking the molecular epidemiology of Brazilian infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. *Infect Genet Evol*. 2013;13:18–26.
124. Smith J. et. al. Analysis of the Early Immune Response to Infection by Infectious Bursal Disease Virus in Chickens Differing in Their Resistance to the Disease. *Journal of Virology*. 2015;89(5):2469-2482.
125. Soubies M.S., Courtilion C., Briand F.X., et. al. Identification of a European interserotypic reassortant strain of IBDV. *Avian Pathol*. 2017;46:19–27

126. Studier J.A., Keppler K.J. A Note on the Neighbor-Joining Algorithm of Saitou and Neil. *Mol. Biol. Evol.* 1988;5(6):729–731.
127. Tamura K., Stecher G., Peterson D., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2013;30:2725-2729
128. Tiwari A.K., Kataria R.S. Differentiation of infectious bursal disease viruses by restriction enzyme analysis of RT-PCR amplified VP1 gene sequence *Comp Immunol, Microbiol, & Inf Dis.* 2003;26:47–53.
129. Vakharia, V. N., He J., Ahamed B., Snyder D. B. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 1994;31:265-273
130. Valli A., Busnadiago I., Maliogka V. The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes. *PLoS One.* 2012;7(8):67–71.
131. Van Loon, A. A., De Haas N., Zeyda I. E. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J Gen Virol.* 2002;83:121-129.
132. Vasconcelos A.C., Lam K.M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology.* 1994;75(7):1803–1806.
133. Villegas P., Banda A., Saif Y.M. et al. The White Book of Gumboro Disease 2006 / Laboratorios Hipra, S.A., 2006. – 97 p.
134. Virus Taxonomy – Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Ed. by A.M.Q. King – Academic Press, 2012. – P. 478-507.
135. Vukea P.R., Willows-Munro S., Horner R.F., Coetzer T.H. Phylogenetic analysis of the polyprotein coding region of an infectious South African bursal disease virus (IBDV) strain. *Infect Genet Evol.* 2014;21:279–286.
136. Wang S., Teng Q., Jia L. Infectious bursal disease virus influences the transcription of chicken γ c and γ c family cytokines during infection. *PLoS One.* 2014;9(1):1–8.

137. Wang Y.S., Fan H.J., Li Y. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus. *Vaccine*. 2007;25(22):4447–4455.
138. Wang, N.; Zhang, L.; Chen, Y.; Lu, Z.; et al. Cyclophilin A Interacts with Viral VP4 and Inhibits the Replication of Infectious Bursal Disease Virus. *BioMed Res. Int*. 2015;1-11.
139. Wei L., Hou S. S., Zhu J. et. al. Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85 alpha subunit of PI3K. *Virology*. 2011;417:211-220.
140. Withers D.R., Young J.R., Davison T.F. Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression in the chick is associated with the presence of undifferentiated follicles in the recovering bursa. *Viral Immunol*. 2005;18(1)127–137.
141. Wu C.C., Rubinelli A.P., Lin T.L. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*. 2007;51(2):515–526.
142. Wu Y. P., Hong L. L., Ye J. X., et. al. The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Arch Virol*. 2009;154:873-1882.
143. Xia, R. X., Wang H. Y. Huang G. M, Zhang M. F. Sequence and phylogenetic analysis of a Chinese very virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol*. 2008;153:1725-1729.
144. Yamaguchi T., Setiyono A., Kobayashi M. Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian Dis*. 2000;44(2):284–290.
145. Yamagushi, T., Ogava M., Miyoshi M., Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol*. 1997;142:1441-1458
146. Yamazaki K., Ohta H., Kawai T., Yamaguchi T., Obi T., Takase K. Characterization of variant infectious bursal disease virus from a broiler farm in Japan using immunized sentinel chickens. *J Vet Med Sci*. 2017;79:175–183.

147. Yip C. W., Hon C. C., Zeng F. Y., Leung F. C. C. Cell culture-adapted IBDV uses endocytosis for entry in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. *Virus Res.* 2012;65:9-16.
148. Yu F., Qi X. L., Yuwen Y. Q., et. al. Molecular characteristics of segment B of seven very virulent infectious bursal disease viruses isolated in china. *Virus Genes.* 2010;41:246-249.
149. Yuan W. F., Zhang X. Y., Xia X. L., Sun H. C. Inhibition of infectious bursal disease virus infection by artificial microRNAs targeting chicken heat-shock protein 90. *J Gen Virol.* 2012;93:876-879
150. Zachar T., Popowich S., Goodhope B., et. al. A 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan, Canada. *Can J Vet Res* 2016;80:255–261.
151. Zhang, L.; Ren, X.; Chen, Y.; Gao, Y.; et al. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-2 contributes to the replication of infectious bursal disease virus via interaction with the capsid protein VP2. *Viruses.* 2015;7:1474–1491.
152. Zhu L.Q., Wu S.L., Zhang G.P. The cellular receptors for infectious bursal disease virus. *African Journal of Biotechnology.* 2008;7(25):4832–4835.
153. Бессарабов Б.Ф., Воронин Е.С. Инфекционные болезни животных /; под ред. А.А. Сидорчука. — М.: Колос, 2007. — 671 с.
154. Бородавка О. С. Диференційна діагностика штамів вірусу інфекційної бурсальної хво-роби методом ПЛР / О. С. Бородавка // Сучасна ветеринарна медицина. — 2007. — №4. С.8–11.
155. Герман В.В. Инфекционная бурсальная болезнь в птицеводствах Украины / В.В.Герман, В.А. Бусол Л.А. и др. // Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы: Материалы междунар. науч. конф., 20–22сент. —Х., 1995. —С.109–113.
156. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки у нормі та при патології. — Житомир.: Полісся, 2005. — 288 с.

157. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з інфекційною бурсальною хворобою (хвороба Гамборо) *Гол.держ.інспектор вет.медицини*; Інструкція від 10.10.2000 №47.
158. Мазур Т.В. Особливості специфічної профілактики хвороби Гамборо (ІБХ) серед курей-бройлерів кросу Кобб-500 / Т.В. Мазур, Н.Г. Сорокіна, О.К. Гальчинська // Науковий вісник ветеринарної медицини – 2014. – №14. – С. 80-84.
159. 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.
160. 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.
161. Пастиря 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.
162. 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.
163. Посібник для лабораторій з валідації методів та пов'язаних питань. – Eurachem, 1998 р., ISBN 0-948926-12-0 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.eurachem.ul.pt
164. Рева. О.Н. Филогенетический анализ. Краткий курс лекций / О.Н. Рева. – К.: ВПЦ Київський університет ім. Шевченка. – 2009. – С. 38.

165. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / Рокицкий П. Ф. – Минск: «Вышэйшая школа», 1973.- 316 с.
166. Рула О.М. Шляхи забезпечення епізоотичного благополуччя птахогосподарств України щодо інфекційної бурсальної хвороби (Хвороби Гамборо). *Ветеринарна медицина*; 2012:96:230-232.

ДОДАТОК А

Список публікацій за темою дисертації та відомості про апробацію результатів досліджень

Статті у наукових виданнях України, що входять до наукометричних баз даних:

1. 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).*
2. 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).*

Статті у наукових фахових виданнях:

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., Иващенко О.А., Нечипуренко О.О., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Патоморфологічні зміни у лімфоїдній тканині бурси Фабріціуса курей, викликані різними вакцинними та польовими штамми 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).*

Матеріали та тези наукових та науково-практичних конференцій

1. 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.
2. 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.
3. Pastyria Anna, Sobko Iryna, Andriichuk Olena, Polischuk Valeriy Sequence analyses and comparison of VP2 gene of IBVD isolates and vaccine strains used in Ukraine //, WVPA Congress 4-8 September 2017, Edinburgh, Great Britain.
4. Пастиря 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.

Апробація результатів досліджень:

1. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Шевченківська весна: Біологічні науки». 6-8 квітня 2016 року, м. Київ. (заочна участь).
2. VIII International conference “Bioresources and viruses”, 12-14 September, 2016, Kyiv, Ukraine. (усна доповідь).
3. WVPA Congress 4-8 September 2017, Edinburgh, Great Britain. (усна доповідь).
4. XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (ТМУ), м. Одеса, 11-15 вересня 2017 р. (заочна участь).