

На правах рукописи

СЕРОВА Наталья Юрьевна

**ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА
ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте птицеводства – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (ВНИВИП), г. Санкт-Петербург

Научный руководитель -

Джавадов Эдуард Джавадович
доктор ветеринарных наук, профессор,
академик РАН

Официальные оппоненты:

Косовский Глеб Юрьевич
доктор биологических наук, профессор РАН,
Врио директора Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Научно-
исследовательский институт пушного
звероводства и кролиководства имени В.А.
Афанасьева» (ФГБНУ НИИПЗК)

Андрейчук Дмитрий Борисович
кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник Федерального государственного
бюджетного учреждения «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (ФГБУ
«ВНИИЗЖ»)

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ФГБНУ ВНИТИБП)

Защита диссертации состоится «24» ноября 2017 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (ФГБОУ ВО СПбГАВМ) по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5, тел/факс (812) 388-36-31

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5.

Автореферат размещен на сайтах: ВАК Минобразования и науки РФ: <http://vak.ed.gov.ru> «21» сентября 2017 г. и ФГБОУ ВО СПбГАВМ: <http://spbavm.ru> «21» сентября 2017 2017 г.

Автореферат разослан: «___» _____ 2017г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Белова Лариса Михайловна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Инфекционный бронхит кур (ИБК) – высококонтагиозная болезнь, которая широко распространена в птицеводческих хозяйствах РФ (Абдуллоев Х.С., 2015., Бочков Ю.А., 2002, Джавадов Э.Д., 2013, Овчинникова Е.В., 2006, Vochkov Y.A., 2006). Возбудитель ИБК – РНК-содержащий вирус, семейства Coronaviridae, чрезвычайно изменчив, поэтому небольшие замены в гене S1 приводят к появлению новых серотипов вируса, что затрудняет правильную постановку диагноза и не позволяет своевременно провести эффективную специфическую профилактику против данной болезни (Овчинникова Е.В., 2006, Cavanagh D., 1988, 1992, 1997, Jackwood M.W., 2012, Kamble N.M., 2016, Umar S., 2016).

На территории РФ циркулируют вирусы ИБК разных серогрупп. Большая часть изолятов (около 40%) имеет высокое генетическое родство со штаммами серотипа Массачусетс (Бочков Ю.А., 2002, Овчинникова Е.В., 2006., 2012). Некоторая часть гомологична Европейским (D274, 4/91, В/648), китайским и корейским штаммам (Абдуллоев Х.С., 2015., Чупина О.А.). Кроме того, выделяются энзоотичные для России изоляты, имеющие более 20% отличий от всех представленных в Genbank (Овчинникова Е.В., 2006., 2012).

Хотя инфекционный бронхит в первую очередь респираторное заболевание, он также является одной из важных причин снижения яичной продуктивности. Некоторые штаммы вызывают нефрозную патологию со значительной смертностью молодняка. Основной ущерб птицеводств обусловлен неэффективностью производства (Джавадов, Э.Д., 2013, Awad F., 2014, Cavanagh D., 2007, De Wit J.J., 1992).

Существующие методы выделения и идентификации вируса ИБК имеют некоторые недостатки. Вирусологические методы выделения вируса требуют большого количества времени, реакция нейтрализации трудоемка и

долговременна, антиген-улавливающий и блокирующий варианты непрямого метода ИФА требует использования моноклональных антител (Lougovskaia, N.N., 2002, Nagano, H., 1990, Naqi, S.A., 1993), что не всегда возможно, реакция диффузионной преципитации малочувствительная (De Wit J.J., 1992).

В связи с вышеизложенным, актуальным является усовершенствование существующих методов выделения и идентификации изолятов вируса ИБК, изучение их биологических свойств для разработки эффективных схем вакцинации.

Степень разработанности темы исследования. Первые публикации по инфекционному бронхиту кур появились в 1930-1940-х гг. в США. В нашей стране первые исследования по изучению вируса ИБК начаты в 1960-х гг. (Чистова З.Я., 1971, Мазурина М.Г., 1973, Сюрин В.Н., 1973). Исследования были посвящены вопросам эпизоотологии ИБК, изучению биологических свойств изолятов вируса, определению патогенности штаммов вируса ИБК и определению типовой принадлежности изолятов посредством реакции нейтрализации.

Вопросам диагностики молекулярно-генетическими методами посвящены ряд зарубежных и отечественных работ (Бочков Ю.А., 2002, Овчинникова Е.В., 2012, Cavanagh D., 1999, Bande F., 2016). В 1999 году в России был разработан метод ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к S1 гену (Бочков Ю.А., 2002). В 2010 г, по имеющимся публикациям, были разработаны Методические указания по выявлению вируса ИБК с использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Овчинникова Е.В., 2012). В методе предложено использование системы праймеров и зонда, специфичных к нетранслируемому участку генома, предложенных Callison A.A. et al, 2006.

В работах отечественных авторов описано широкое распространение вариантных изолятов вируса ИБК, описаны молекулярно-генетические свойства рекомбинантных вирусов ИБК, циркулирующих на территории РФ

(Овчинникова Е.В., 2006, 2012). Высокая изменчивость коронавируса птиц, постоянно возникающие новые варианты требует специфичного и чувствительного метода ОТ-ПЦР, позволяющего проводить массовые исследования для контроля циркулирующих вариантов вируса ИБК, с использованием отечественных реактивов и препаратов.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось усовершенствование метода индикации и идентификации вируса инфекционного бронхита кур с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции для последующего изучения изолятов, циркулирующих на территории РФ.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

- выделить изоляты вируса инфекционного бронхита кур;
- изучить физико-химические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур;
- усовершенствовать тест-систему для индикации и идентификации вируса ИБК с помощью ОТ-ПЦР и оценить возможность использования данного метода для лабораторной диагностики ИБК при исследовании патологического материала;
- определить молекулярно-генетические характеристики и провести филогенетический анализ изолятов вируса ИБК, выявленных на территории Российской Федерации.

Научная новизна. Усовершенствован метод индикации и идентификации вируса инфекционного бронхита кур с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием отечественных препаратов, и реактивов. Впервые выявлены и идентифицированы вариантные изоляты вируса инфекционного бронхита кур, которые представляют интерес для дальнейшего изучения. Впервые определена нуклеотидная последовательность фрагментов S1 и 3'UTR

участков 11 полевых изолятов вируса ИБК. Проведено сравнение полученных последовательностей с опубликованными в GenBank различных изолятов и штаммов вируса ИБК.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных исследований усовершенствован метод диагностики инфекционного бронхита кур методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции по выявлению вируса ИБК и коронавируса индеек в патологическом материале.

Разработаны и утверждены методические положения для выявления вируса инфекционного бронхита птиц методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Выделенные изоляты могут использоваться для разработки живых и инактивированных вакцин с целью профилактики ИБК, для создания опытных образцов рекомбинаций S1 участков генетически различных серовариантов вируса ИБК.

Методология и методы исследования.

Методологические подходы в решении задач основаны на знании природы и происхождении, структуры, химического состава, морфологических, биологических, физико-химические свойств и проблем экологии вируса инфекционного бронхита кур. При выборе методов исследований и анализе полученных результатов учитывалось распространение вируса ИБК, предпочтительные методы выделения вируса ИБК из патологического материала, генетика вируса ИБК.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты выделения и идентификации изолятов вируса ИБК;
- результаты изучения устойчивости изолятов к физико-химическим факторам;
- метод ОТ-ПЦР для обнаружения генома вируса ИБК в пробах патологического материала;

– результаты сравнительного анализа фрагмента гипервариабельной области гена S1 изолятов вируса и филогенетический анализ изолятов вируса ИБК, выявленных в ходе массовых исследований.

Степень достоверности и апробация результатов.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертационной работе научно обоснованы, достоверны и вытекают из результатов собственных исследований. Исследования проведены на большом количестве экспериментального материала (куриные эмбрионы и образцы патологического материала, n=4123). Для оценки возможности использования усовершенствованного метода индикации и идентификации вируса инфекционного бронхита кур осуществлен и использован комплекс исследований, включающих вирусологические и молекулярно-биологические методы.

Основные результаты проведенных исследований доложены и опубликованы в материалах научных конференций: 45 конференции молодых ученых и аспирантов по птицеводству (ВНИТИП, Сергиев Посад, 2002 г.), Международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИВИП (ВНИВИП, Санкт-Петербург-Ломоносов, 14-16 сентября, 2004 г.), «Балтийском форуме ветеринарной медицины и продовольственной безопасности 2016» (Санкт-Петербург, 28-30 сентября 2016 г.), 4-м Международном конгрессе ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства» (Санкт-Петербург, 17-19 октября 2016 г.), Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов (Екатеринбург, 7-9 июня 2017 г.), а также на заседаниях Ученого и Методического советов отдела вирусологии и ОБП ВНИВИП в 1999-2002 и 2013-2016 гг.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в которых изложены основные положения и выводы по работе, из них 3 статьи – в

периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Структура диссертации.

Диссертация изложена на 106 страницах печатного текста и состоит из следующих разделов: введение, основная часть, заключение, список сокращений, словарь терминов, список литературы и приложения.

Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 24 рисунками и 1 формулой. Список литературы включает 92 источника, из которых 61 зарубежный.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Все экспериментальные исследования выполнены в отделе вирусологии Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП).

Патологический материал для выделения эпизоотических штаммов вируса инфекционного бронхита брали от кур и цыплят различного возраста птицефабрик Саратовской, Омской, Пермской, Ленинградской, Свердловской, Челябинской областей.

Вирус. В работе использовали вакцинные штаммы «Н-120», «4/91», патогенный штамм «Чапаевский». Инфекционный титр вируса $10^{7,5}$ - $10^{8,5}$ ЭИД₅₀/см³. Эпизоотические изоляты, выделенные из внутренних органов цыплят и кур.

Инкубационные яйца и цыплята:

- 9-10-суточные СПФ-развивающиеся эмбрионы кур (РЭК) и коммерческие РЭК 9-10-суточной инкубации, полученные из

птицехозяйств благополучных по острым инфекционным заболеваниям;

– СПФ-цыплята 1-25-суточного возраста.

Праймеры. В работе применяли несколько систем праймеров специфичных к S1 и 3'UTR участкам генома вируса ИБК. Концентрация каждого праймера 2,0 О.Е./см³, синтез праймеров осуществляла компания ООО «Бигль» (Санкт-Петербург).

Отбор и подготовка патологического материала. Патологический материал брали от больной птицы в период проявления у них клинических признаков (почки, лёгкие, трахею). Гомогенизировали с соблюдением правил асептики и антисептики и хранили при минус 20°С до завершения исследований.

Выделение изолятов вируса ИБК. Полученной суспензией патологического материала заражали 10-15 развивающихся эмбрионов кур 9-10-дневной инкубации в дозе 0,2 см³ в аллантоисную полость. Эмбрионы инкубировали в термостате при 37±0,5°С и влажности 60-70%. Гибель развивающихся эмбрионов кур в первые 24 ч после заражения считали неспецифической. Через 72 ч после заражения собирали аллантоисную жидкость, обрабатывали антибиотиками и хранили при -20°С. Часть зараженных эмбрионов оставляли на инкубацию до 8 суток. После чего вскрывали и оценивали. При наличии гибели эмбрионов, отставания в росте, «карликовости», мумификации, шарообразной формы – эмбрионы считали, как положительные. Для исследуемого материала проводили по 4-6 пассажей на развивающихся эмбрионах кур, используя для заражения аллантоисную жидкость от эмбрионов предыдущего пассажа.

Биологическую активность вирусосодержащей жидкости проверяли путем титрования его на 9-суточных развивающихся эмбрионах кур. Готовили десятикратные разведения вирусосодержащего материала, заражали

по 4 развивающихся эмбриона кур в аллантоисную полость в дозе 0,2 см³. Зараженные эмбрионы кур инкубировали в течение 8 сут. По истечении которых проводили оценку изменений. Титр инфекционной активности вируса считали по методу Кербера.

Определение терморезистентности изолятов изучали при температурах 45°C и 56°C в течение 30, 60 и 90 минут. Выдерживая пробирки с вирусодержащей жидкостью в водяной бане при указанных временных интервалах. Затем проводили титрование прогретого и непрогретого вируса на развивающихся эмбрионах кур (РЭК) 8-9-суточного возраста.

Определение чувствительности вируса к эфиру и хлороформу проводили, выдерживая в пробирках вирусодержащую жидкость с диэтиловым эфиром (20%) и хлороформом (10%) в течение 18 часов при 4°C. Инфекционную активность обработанного и контрольного вируса определяли методом титрования на развивающихся эмбрионах кур.

Конструкция праймеров. Последовательности олигонуклеотидных праймеров рассчитывались с помощью программы jPCR версия 3.09 (PrimerDigital Ltd) на основе сравнения и анализа нуклеотидных последовательностей известных штаммов, опубликованных в международной базе данных GenBank.

Выделение суммарной РНК из суспензии гомогената внутренних органов и вирусодержащей экстраэмбриональной жидкости проводили, используя комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-сорб»

Обратная транскрипция. Комплементарную ДНК получали, используя комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L», согласно инструкции производителя.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с использованием праймеров

специфичных к 3'UTR участку и гену S1 вируса ИБК. Температурно-временной режим подбирали в зависимости от системы праймеров.

Детекция продуктов амплификации. Визуализацию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1-2%-ном агарозном геле с 0,001% содержанием интеркалирующего красителя бромид этидия в трисборатном буфере (ТБЕ).

Очистка продуктов ПЦР и концентрирование ДНК. Вырезанный из геля продукт ПЦР фильтровали через колонки со стекловатой. После чего ДНК осаждали 96%-ным этанолом в присутствии 10 М ацетата аммония.

Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей. Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили на ДНК-анализаторе MegaBACE 1000 согласно инструкции производителя. Для обработки и просмотра результатов секвенирования использовали MegaBACE Sequencing Analysis Software v.4.0.

Анализ нуклеотидных последовательностей, контроль качества и филогенетический анализ. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ MEGA 6 и UGENE v.1.22.0. Контроль качества проводили с помощью программы FASTQ. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW и алгоритма множественного выравнивания. Построение дендрограмм проводили с помощью алгоритма Neighbor-Joining (в том числе с использованием бутстрэп-анализа) программы MEGA 6.

Статистическая обработка результатов исследований. Использовали общепринятые в биологии методы статистической обработки данных. Вычислительные операции и графические построения выполняли с помощью программного приложения Microsoft Office Excel.

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Выделение изолятов вируса ИБК

Для выделения изолятов вируса использовали патологический материал, отобранный от кур с клиническими признаками инфекционного бронхита кур (трахея, легкие, почки и яичники). В результате последовательных многократных пассажей суспензии патологического материала, на развивающихся эмбрионах кур выделены вирусные агенты характерные для инфекционного бронхита. Они вызывали характерные изменения развивающихся эмбрионов кур (отставание в росте, "карликовость", перекручивание шеи, мумификация, шарообразная форма, кисты), и гибель. Патогенность изолятов подтверждали биопробой на 20-суточных цыплятах. Изоляту, выделенному от кур птицефабрики Омской области присвоили название "RF/09/00". Изоляту, выделенному от кур Саратовской области присвоили название "RF/12/01". Биологическая активность изолята "RF/09/00" к 5 пассажиру составила $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$, биологическая активность изолята "RF/12/01" к 6 пассажиру составила $4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты выделения изолятов вируса ИБК на РЭК

Изолят	Возраст птицы	Патологический материал	Пассаж начала падежа	Пораженность РЭК	Биологическая активность $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$
RF/09/00	8 мес.	Яичники	3/7%*	5/68%**	5/5,5***
		Почки	4/9%*	-	-
RF/12/01	20-30 дн.	Трахея, легкие	4/6,3%*	6/45%**	6/4,5***

Примечание: *- пассаж/количество павших РЭК; ** - пассаж/количество РЭК с характерными изменениями; *** - пассаж/титр биологической активности, $\text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$.

2.2.2 Изучение чувствительности изолятов вируса к некоторым химическим и физическим факторам

При изучении чувствительности изолятов вируса к химическим и физическим факторам обращали внимание на определение устойчивости к действию эфира, хлороформа, и действию температуры. После обработки диэтиловым эфиром изолят «RF/12/01» снижал свою инфекционную активность на 3,6 lg ЭИД₅₀/см³, изолят «RF/09/00» – на 3,9 lg ЭИД₅₀/см³. После экспозиции с хлороформом оба изолята полностью теряли свою инфекционность (Рисунок 1).

Опыты по изучению терморезистентности показали, что при температуре 56°C инфекционность изолятов вируса быстро уменьшалась в течение первых 30 минут. Через 30 минут выдержки у изолята «RF/12/01» инфекционность упала на 5,3 lg ЭИД₅₀/см³ и у «RF/09/00» – на 4,9. В течение часового периода инкубации изоляты полностью потеряли инфекционность (Рисунок 2).

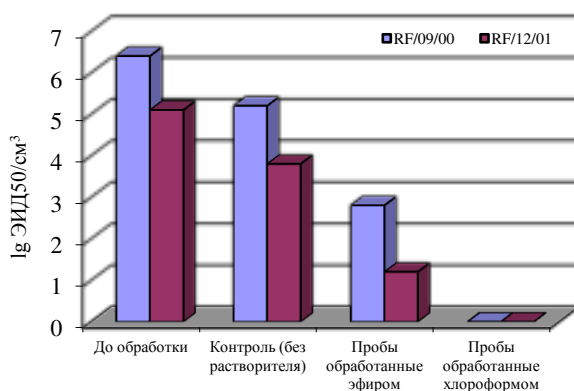


Рисунок 1 – Определение чувствительности изолятов RF/09/00 и RF/12/01 к органическим растворителям

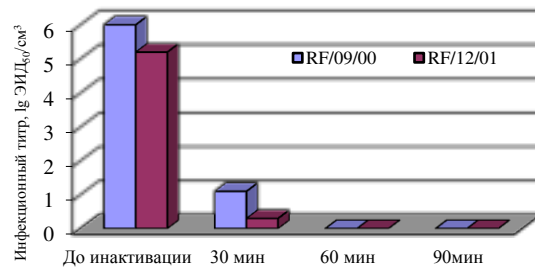


Рисунок 2 – График инаktivации изолятов вируса ИБК при 56°С

При температуре 45°С через 30 минут инфекционность изолята «RF/12/01» снизилась на 3,2 lg ЭИД₅₀/см³ и на 3,3 lg ЭИД₅₀/см³ – у «RF/09/00». Через 60 мин изоляты полностью теряли свою инфекционную активность (Рисунок 3).

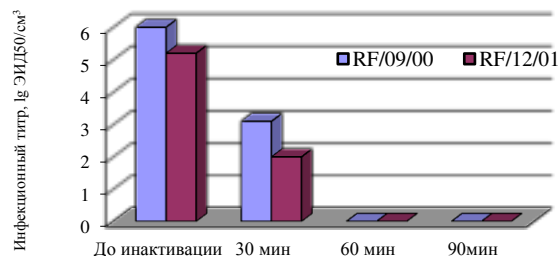


Рисунок 3 – График инаktivации изолятов вируса ИБК при 45°С

2.2.3 Метод выявления вируса инфекционного бронхита с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Ген S1 вируса ИБК интересен для проведения филогенетического анализа. Но в связи с его высокой изменчивостью, значительно усложняющей выявление генома вируса ИБК при массовых исследованиях, оптимальным участком для определения специфических праймеров был определён консервативный нетранслируемый (3'UTR) участок

Был проведен анализ международной базы данных NCBI с учетом, сходства геномов (до 90%) вируса инфекционного бронхита кур, коронавирусов индеек, уток, гусей, фазанов и пингвинов, которые были объединены в один вид – коронавирус птиц (Taxonomic proposal to the ICTV Executive Committee, 2008.085-126V). Определены последовательности олигонуклеотидных праймеров (3'UTR-F GAGCGCCAAAACAACAGCG, 3'UTR-R CATTTCCCTGGCGATAGAG) и проверены на отсутствие комплементарности друг другу. Праймеры фланкируют участок длиной 433 п.н. на 3'UTR участке генома вируса инфекционного бронхита кур (NC_001451.1 Avian infectious bronchitis virus), и участок 277 п.н. на 3'UTR участке генома коронавируса индеек (NC_010800.1 Turkey coronavirus).

После ряда опытов по подбору оптимальных концентраций и соотношений компонентов реакционной смеси и матричной кДНК был определен состав ПЦР-смеси. При сравнении 10x KCl ПЦР буфера (Mg^{+2} 2.5 mM) и 2,5-х ПЦР-смеси-2red, наилучшие результаты по чувствительности реакции показал 2,5-кратная ПЦР-смесь. Общий объем реакционной смеси для одной пробы, на основе 2,5х ПЦР-смеси составил 25 мкл, концентрация ионов Mg^{+2} составила 2,2 mM, дезоксинуклеозидтрифосфатов 0,32 mM, каждого праймера по 0,2 pM и 1 ед. Taq-ДНК полимеразы.

Таблица 2 – Расположение и размеры участков, ограниченных праймерами, относительно референсных геномов

Праймер	Ген	Размер (п.н.)	Участки генома	Референсный геном
3'UTR-F	3'UTR	433	26930-26948	NC_001451.1 Avian infectious bronchitis virus
3'UTR-R			27362-27344	
3'UTR-F	3'UTR	277	27111-27129	NC_010800.1 Turkey coronavirus

Специфичность метода была проверена на различных образцах биологического материала, содержащие разные штаммы вируса ИБК и нескольких видах РНК-содержащих вирусов (вирус НБ, МПВИ, вирус ИББ,

реовирус). Чувствительность метода составила $3,3 \times 10^2$ копии/мкл или $3,3 \times 10^5$ копий молекул кДНК вируса/мл.



Рисунок 4 – Фотографии почек кур, с характерными для ИБК макроскопическими изменениями

Для оценки значимости метода для диагностических исследований в лабораторных условиях, была изучена возможность выявления фрагментов консервативного участка генома вируса ИБК в образцах патологического материала, который был получен от птиц с признаками ИБК из различных птицеводств РФ.

Для исследований, от павших или вынужденно убитых кур, отбирали почки, с характерными признаками инфекционного бронхита (увеличенные, анемичные, с пестрым рисунком) (Рисунок 4).

В результате исследования 105 образцов патологического материала, РНК вируса ИБК была идентифицирована в 25 образцах. При положительных результатах получали ампликоны размером 277-433 п.н (Рисунок 5).

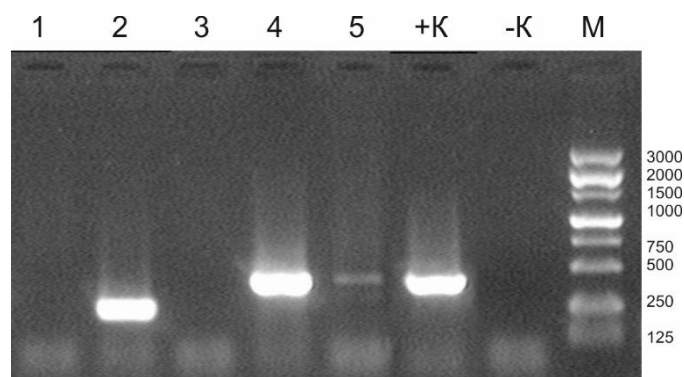


Рисунок 5 – Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР, с 3'UTR праймерами специфичными к консервативному участку генома вируса ИБК. Цифрами обозначены дорожки: 1 – 5 – полевые пробы; +К – положительный контроль; -К – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК

Секвенирование выделенных ПЦР-продуктов с праймером 3'UTR-F подтвердило их принадлежность к вирусу ИБК.

2.2.4 Идентификация изолятов методом геномного секвенирования.

Филогенетический анализ

Для анализа использовали гипервариабельный фрагмент гена S1, т.к. транслируемый структурный белок именно этой области содержит антигенные детерминанты, индуцирующие выработку вируснейтрализующих антител.

Пробы экстраэмбриональной жидкости РЭК, зараженных изолятами были исследованы методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с праймерами, ограничивающими вариабельную область гена S1 вируса инфекционного бронхита кур. Амплифицированные фрагменты были секвенированы с последующим сравнительным анализом с известными зарубежными и российскими штаммами вируса ИБК. Всего было секвенировано 7 фрагментов гена S1 вируса ИБК (6 изолятов «RF/12/01», «RF/09/00», «RF/466/16», «RF/467/16», «ГС-11», «RF/432/2016» и 1 вариантный штамм «РВ-07»).

Для секвенирования и сравнительного анализа гипервариабельного участка изолятов были использованы фрагменты области гена S1 длиной 701 п.н. (позиция на геноме 20281-20981 п.н) относительно штамма Mass41 (GenBank: GQ504725.1) и длиной 1155 п.н. (позиция на геноме 20249- 21403) относительно штаммов и изолятов вируса ИБК (GenBank: KP118893.1, GenBank: KP036504.1 и др.).

Как видно из дендрограммы, (Рисунок 6) изолят «ГС-11» входит в один кластер генотипа 793В, 96% гомологии со штаммом 4/91. Штамм «РВ-07» показал 99% гомологии с изолятом выделенным в Польше в 2010 г., принадлежащим генотипу 793В (GenBank: KT886452).

Изоляты выделенные в Челябинской области «RF/467/16» и «RF/466/16» показали гомологию с изолятом из Саратовской области «RF/12/01». Изоляты образуют собственную генетическую группу, отличную от известных зарубежных и российских штаммов вируса ИБК. В эту же группу вошел изолят из Азербайджана, взятый из международной базы данных (GenBank: EF066522).

В результате анализа установлено, что изолят «RF/09/00» показал родство (77%) с изолятом «RF/19/99» (GenBank: AJ458942.1), выделенным в Иркутске коллегами из ВНИИЗЖ, образуя генетическую группу отличную от известных штаммов вируса ИБК.

Изолят «RF/432/2016» на 98% показал гомологию со штаммом «Н-120».

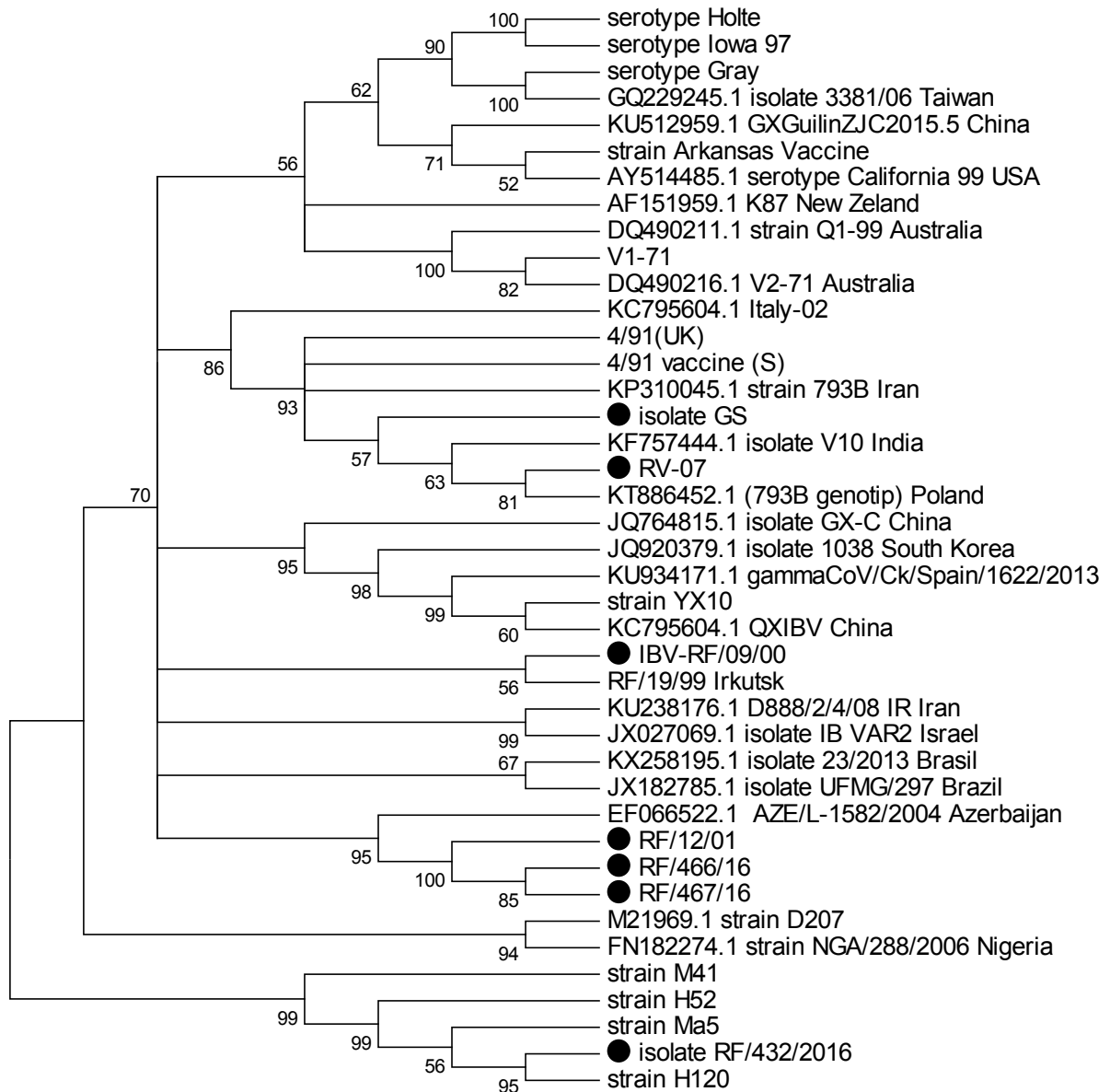


Рисунок 6 – Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей переменной области гена S1 зарубежных штаммов вируса ИБК и изолятов «RF/12/02», «RF/09/00», «RF/466/16», «RF/467/16», «ГС-11», «штамма РВ-07» построенная с использованием программы «MEGA 6»

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Вирусологические исследования с учетом эпизоотических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений, подтвержденные методом ОТ-ПЦР позволили установить на птицефабриках

Омской, Саратовской и Челябинской областей неблагополучие, что свидетельствовало о широком распространении ИБК.

2 Изоляты характеризуются патогенностью для куриных эмбрионов и цыплят различного возраста. Биологическая активность изолята «RF/12/01» к 6-му пассажу составила $4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$. Изолята «RF/09/00» к 5-му пассажу $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$.

3 Подтверждена чувствительность изолятов вируса ИБК к органическим жирорастворителям. Изоляты снижают свою инфекционную активность при обработке диэтиловым эфиром 20% концентрации в течение 18 часов при 4°C в 2,5 раза. После обработки хлороформом (10%) вирус теряет свою инфекционную активность на 100%.

4 Выявлена термолабильность изолятов вируса ИБК. В течение 1 часа, изоляты снижают свою активность на 100% при температурах 56°C и 45°C .

5 Усовершенствован метод выявления РНК коронавируса птиц за счет использования видоспецифичных праймеров к консервативному нетранслируемому участку 3'UTR вируса и оптимизированных параметров реакции, что обеспечивает образование специфичных ампликонов длиной 277-433 п.н. Чувствительность метода показала выявление $3,3 \times 10^5$ копий молекул кДНК в 1 см^3 . Специфичность доказана секвенированием амплифицированных фрагментов и апробацией на референсных образцах генетического материала штаммов вируса ИБК (4/91 793В, D1466, Massachusetts 41, D388 QX).

6 В результате исследования усовершенствованным методом ОТ-ПЦР 105 образцов патологического материала от домашней птицы РНК вируса ИБК была обнаружена в 25 образцах.

7 Генотипировано шесть изолятов вируса ИБК. Установлена гомология изолятов «RF/466/16», «RF/467/16» и «RF/12/01», которые образуют собственную генетическую группу. Определено родство изолята «ГС-11» и

штамма «РВ-07» с генотипом 793В (4/91). Выявлена гомология изолята «RF/09/00» с изолятом «RF/19/99» (GenBank: AJ458942.1), выделенным в Иркутске. Установлено родство изолята «RF/432/2016» со штаммом «Н-120» (98%).

8 Фрагменты последовательностей четырёх изолятов депонированы в международных базах данных. Нуклеотидная последовательность вариабельной области гена S1 изолята «RF/12/01» депонирована в EMBL (Genbank: AJ550983). Последовательности вариабельной области гена S1 изолятов «RF/09/00», «RF/467/2016» и штамма «ГС-11» депонированы в банке данных NCBI («IBV/RF/467/2016» - Genbank: KY120168, «RF/09/00» - Genbank: KY120169, «ГС-11» – Genbank: KY211873).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1 В результате проведенных исследований предложены, одобрены Учёным советом и утверждены директором ВНИВИП нормативные документы: «Выявление вируса инфекционного бронхита птиц с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (Методические положения)».

2 Для практического использования предлагаются изоляты вируса инфекционного бронхита кур «RF/12/01», «RF/09/00», «RF/467/2016», «ГС-11»:

- для использования в учебном процессе на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов птицеводств и лабораторий;
- для продолжения изучения изолятов ИБК, с целью паспортизации и изготовления живых и инактивированных вакцин из вариантных штаммов ИБК;
- для продолжения изучения изолятов с целью создания рекомбинаций S1 участков генетически различных вирусов ИБК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 **Серова, Н.Ю.** Биологические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур / Н.Ю.Серова // Тезисы докладов Всероссийской конференции молодых ученых и аспирантов по птицеводству. – Сергиев Посад. – 2002. – С. 35 -36.

2 **Серова, Н.Ю.,** Коровин Р.Н. Биологические свойства вируса инфекционного бронхита кур / Н.Ю.Серова, Р.Н.Коровин // Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве; Матер. междунар. юбилейной научно-практ. конф. – СПб-Ломоносов, 2004 – С.75.

3 **Коровин, Р.Н.** Биологические свойства вируса инфекционного бронхита кур / **Р.Н.Коровин**, И.П.Николаева, **Н.Ю.Серова**, Ю.А.Бочков, В.В.Дрыгин // **Ветеринария** - №8. – 2005. – С. 28 – 31.

4 **Серова, Н.Ю.** Выявление вируса инфекционного бронхита птиц с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции / Н.Ю.Серова, Г.Н.Самусева, М.Е.Дмитриева, Д.Т.Гоголадзе // **Актуальные вопросы ветеринарной биологии** – №3. – 2016. – С. 25-29.

5 **Серова, Н.Ю.** Инфекционный бронхит кур (Обзор) / Серова Н.Ю., Джавадов Э.Д., Гоголадзе Д.Т. // **Международный вестник ветеринарии.** - №3. – 2016. – С. 14-19.

6 **Серова, Н.Ю.** Молекулярно-генетическая идентификация коронавируса птиц на основе обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции / Н.Ю.Серова // XII Международная научно-практическая конференция Балтийский форум ветеринарной медицины и продовольственной безопасности 2016: Тезисы конференции. URL: <http://baltvetforum.ru.swtest.ru/молекулярно-генетическая-идентифика/> (дата обращения 30.09.2016).

7 **Серова, Н.Ю.** Метод молекулярно-генетической идентификации коронавируса птиц / Н.Ю.Серова // 4-й Международный конгресс

ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства»: Тезисы конференции. – СПб., 2016. – С. 170-171.

8 Серова, Н.Ю. Идентификация коронавируса птиц молекулярно-генетическим методом. / Н.Ю.Серова, Д.Т.Гоголадзе // Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. – Екатеринбург, 2017. – С. 330-333.