УДК 619:616.98:578.834.11636.52/.58:577.21
DOI 10.29326/2304-196X-2018-3-26-30-34

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ СТРАН СНГ В 2015–2017 ГГ.

Л. О. Щербакова[1], С. Н. Колосов[2], З. Б. Никонова[3], Н. Г. Зиняков[4], Е. В. Овчинникова[5], И. А. Чвала[6]

[1] Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: scherbakova@arriah.ru*

[2] Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: kolosov@arriah.ru*

[3] Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: nikonova@arriah.ru*

[4] Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: zinyakov@arriah.ru*

[5] Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: ovchinnikova@arriah.ru*

[6] Заместитель директора по НИР и мониторингу, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, *e-mail: chvala@arriah.ru*

РЕЗЮМЕ

Вирус инфекционного бронхита кур является причиной значительного экономического ущерба в птицеводстве, однако борьба с ним затруднена в связи с его высокой изменчивостью. Частота мутаций вируса, изолированного от вакцинированных птиц, достигает 1,5% в год в гипервариабельной области гена S1. В результате многолетнего наблюдения за циркуляцией изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в отдельных птицеводческих хозяйствах, было замечено, что со временем на птицефабрике может происходить смена генетических линий вируса. Это обусловливает необходимость постоянного мониторинга изолятов вируса для оптимизации схемы профилактики. В работе представлены результаты исследования 840 проб биологического материала, отобранного от кур из птицефабрик России и некоторых стран СНГ в 2015–2017 гг. Среди 311 положительных проб выявлено 147 изолятов вируса инфекционного бронхита кур, большая часть которых относится к 8 генетическим линиям генотипа GI: GI-1, GI-12, GI-13, GI-14, GI-16, GI-19, GI-22, GI-23. Кроме этого, были выявлены изоляты, являющиеся рекомбинантами, и вариантные изоляты, не относящиеся ни к одному из известных генотипов.

Ключевые слова: вирус инфекционного бронхита кур, генетический анализ, генотип.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус инфекционного бронхита кур (ИБК) распространен повсеместно и встречается во всех странах, где развито птицеводство. Он относится к отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Coronavirinae*, роду *Gammacoronavirus*. Геном представлен одноцепочечной (+)РНК. Основными мишенями для вируса ИБК являются реснитчатый эпителий верхних дыхательных путей, эпителиальные клетки яйцеводов и почек.

Огромному разнообразию вируса ИБК способствует ряд факторов, таких как большое количество кур, содержащихся на птицефабриках с очень высокой плотностью, использование в хозяйствах живых вакцин разных серотипов и коциркуляция на птицефабриках генетически разнородных популяций вируса. Эволюционный процесс вируса ИБК происходит достаточно быстро. Непрерывное появление точечных мутаций, инсерций и делеций, а также рекомбинаций (в случае одновременного размножения в одном хозяине генетически отличающихся изолятов) – все это приводит к появлению новых вариантов вируса [4]. Частота мутаций в гипервариабельной области гена S1 вируса ИБК, изолированного от вакцинированных птиц, достигает 1,5% в год, но при отсутствии поствакцинального иммунитета вирус эволюционирует более медленными темпами (0,3%) [11].

Высокая вариабельность генома вируса ИБК приводит к сложностям в классификации вируса. Постоянно появляются новые варианты вируса. Многие из них неспособны к воспроизводству или выживают только в течение короткого промежутка времени. Некоторые из вновь появившихся вариантов вируса ИБК становятся экономически значимыми, нанося существенный

урон птицеводческим хозяйствам. Они могут распространяться по разным регионам мира или могут поражать кур на ограниченной географической территории.

Еще 10 лет назад было выявлено всего несколько генотипов вируса ИБК: Massachusetts, D274, Connecticut, Holte, Arkansas, Taiwan-1, Taiwan-2, Grey, 793B, QX, Italy-02, Q1, Variant-1, Variant-2, B1648, D1466 и т. д. За последнее десятилетие количество новых генотипов значительно увеличилось. При большом разнообразии уже известных генотипов выявляются изоляты, не относящиеся ни к одному из ранее выявленных генотипов вируса ИБК. Такие изоляты принято называть вариантными.

В 2016 г. V. Valastro и соавт. [14] предложили рациональную и стандартизированную номенклатуру генетических групп вируса ИБК на основе сравнения 1286 последовательностей гена S1, исключая нуклеотидные последовательности рекомбинантных форм вируса ИБК. Всего было идентифицировано шесть генотипов (GI–GVI), включающих 32 генетические линии вируса ИБК.

Целью данной работы является проведение филогенетического анализа изолятов вируса ИБК, выявленных на птицефабриках РФ в 2015–2017 гг., с использованием новой классификации, а также выявление новых генетических линий вируса ИБК, появившихся в последние годы, с целью оптимального выбора вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали 840 проб внутренних органов (легкие, трахеи, почки, кишечник), инкубационные яйца, фекалии кур разных возрастов, полученные из птицефабрик Российской Федерации и Республик Беларусь, Таджикистан и Казахстан в 2015–2017 гг.

Реакции ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили в соответствии с методическими указаниями [1, 2].

Для генотипирования вируса ИБК использовали сравнительный анализ фрагмента гена S1 примерно 500 н. о. (позиция 112–653 н. о. на гене S относительно штамма H-120). Для анализа использовали нуклеотидные последовательности прототипных штаммов, предложенных V. Valastro и соавт. [14].

Определение нуклеотидной последовательности осуществляли по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченых терминирующих нуклеотидов на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями штаммов вируса ИБК, опубликованными в международной базе данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3.

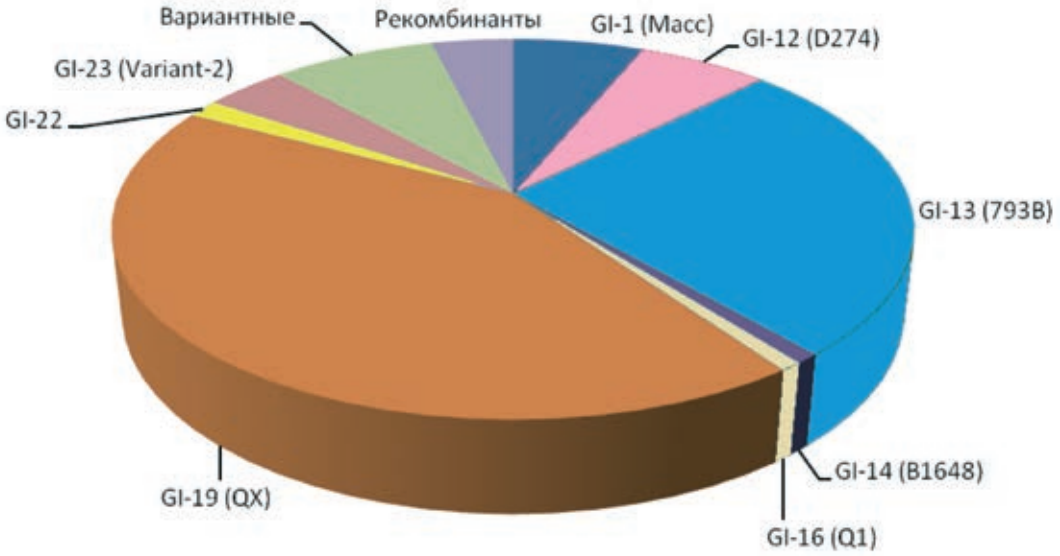
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За 2015–2017 гг. методом ПЦР было исследовано 840 проб биологического материала от птиц из более чем 50 хозяйств 26 регионов России, а также из Республик Беларусь, Таджикистан и Казахстан. Положительный результат получен в 420 случаях (50%). Геном вируса ИБК выявляли в яйце и во внутренних органах кур в возрасте до 578 сут.

Для определения и сравнительного анализа структуры фрагмента гена S1 были выбраны 311 проб, положительных в ОТ-ПЦР. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена S1 показал, что из числа положительных проб в 164 были выявлены вакцинные штаммы вируса ИБК (4/91, D274, H-120, Ma5). В 147 пробах были выявлены изоляты вируса ИБК, относящиеся к разным генетическим линиям (рис. 1). Филогенетический анализ этих изолятов показал, что большая часть из них относится к восьми генетическим линиям генотипа GI: GI-1 (Масс), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-14 (B1648), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-22, GI-23 (Variant-2). Кроме того, были выявлены изоляты, являющиеся рекомбинантами, и вариантные изоляты, не относящиеся ни к одному известному генотипу (рис. 1, 2). Изоляты генетических линий GI-16 (Q1), GI-22 и GI-23 (Variant-2) на птицефабриках РФ выявлены впервые.

Доминирующей группой является генетическая линия GI-19 (QX). Вирус данной линии выявляли у птиц разного возраста. Минимальный возраст птицы, у которой был выявлен изолят вируса ИБК генотипа GI-19 (QX), составлял 8 сут, максимальный – 578 сут. Впервые ви-

Рис. 1. Генетические линии вируса ИБК, выявленные в 2015–2017 гг.



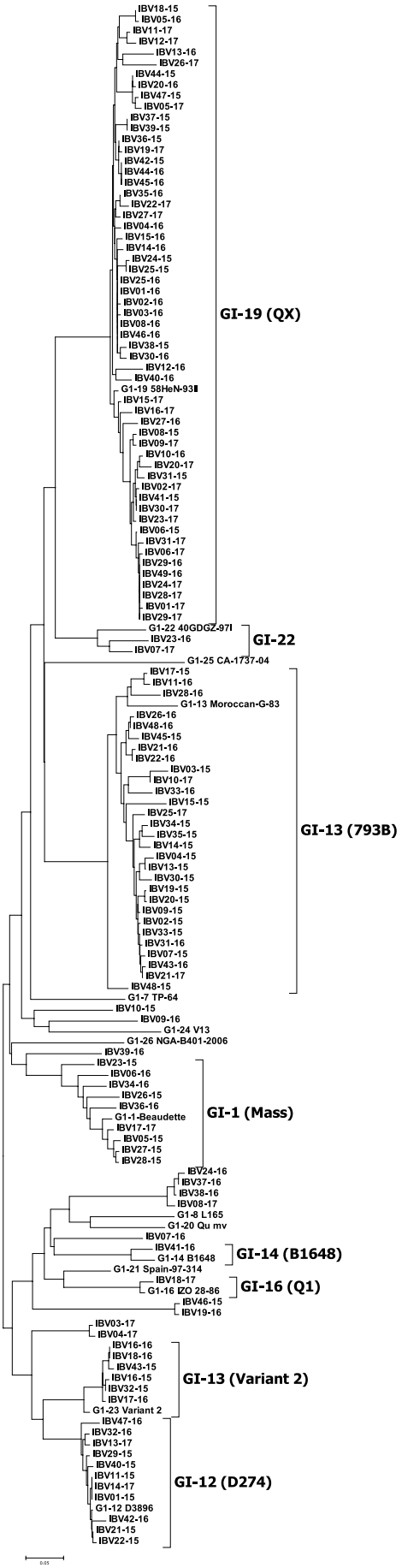


Рис. 2. Филогенетические связи штаммов и изолятов вируса ИБК на основе анализа фрагмента гена S1

рус GI-19 (QX) был изолирован в Китае [10]. В настоящее время вирус GI-19 (QX) широко распространен в Европе, Юго-Восточной Азии, Африке и на Ближнем Востоке [6]. Представители генетической линии GI-19 (QX) впервые были выявлены на территории РФ еще в 2001 г. [13].

Сравнительный анализ изолятов вируса ИБК, выявленных в течение трех лет, с 2015 по 2017 г., показывает, что каждый год кроме генетической линии GI-19 (QX) выявляются изоляты GI-1 (Масс), GI-12 (D274), GI-13 (793B) (рис. 2). Вероятно, часть изолятов, относящихся к этим трем генетическим линиям, может являться производной от вакцинных штаммов, применяемых на птицефабриках РФ в течение многих лет. Наиболее широко используются живые вакцины, полученные на основе штаммов H-120, MA5, D274 и 4/91.

Изоляты генотипа GI-14 (B1648) на российских птицефабриках выявляются спорадически. Нефропатогенный штамм вируса ИБК GI-14 (B1648) впервые был выделен в 1984 г. в Бельгии. Несмотря на интенсивную вакцинацию, GI-14 (B1648) и его варианты по-прежнему циркулируют в Европе и Северной Африке [8].

В 2015 г. на птицефабриках Казахстана и в 2016 г. в РФ был выявлен вирус генетической линии GI-23 (Variant-2). Ранее случаев выявления данного генотипа вируса ИБК на территории этих двух стран не было. Линия GI-23 представляет собой кластер уникального типа, географически ограниченный странами Среднего Востока. Штаммы, принадлежащие к этой линии, были обнаружены в 1998 г. в Израиле и продолжают циркулировать в этом регионе [7, 12]. Некоторые из них стали доминирующими для большинства ферм, вызывая респираторную и почечную патологии у кур [9].

В 2017 г. появились представители двух новых для РФ генетических линий вируса ИБК: GI-16 (Q1) и GI-22. Генетическая линия вируса ИБК GI-16 (Q1) была обнаружена у кур в Италии, Испании, Китае, в большинстве стран Латинской Америки и Ближнего Востока [6]. Результаты экспериментов, проводимых с вирусом GI-16 (Q1), впервые были опубликованы L. Yu и соавт. [5]. Вирус был изолирован из железистого желудка молодых несушек. При экспериментальном заражении у птиц проявлялись респираторные признаки заболевания, диарея, поражение железистого желудка. Смертность достигала очень высокого уровня (75–100%). В почках повреждений обнаружено не было. В то же время эксперименты с чилийскими изолятами генетической линии GI-16 (Q1) не выявили репликации вируса в железистом желудке, но показали, что вирус вызывает патологию в дыхательных путях и почках.

Изоляты генетической линии GI-22 выделили в Китае в результате вспышек ИБК у бройлеров и несушек с признаками поражения почек. Многочисленные эпидемиологические исследования, проведенные в Китае, показали, что генетические линии GI-22 и GI-19 являются доминирующими в этой стране.

О большом генетическом разнообразии циркулирующих изолятов вируса ИБК свидетельствует выявление в птицеводческих хозяйствах вариантных изолятов вируса ИБК, отличающихся по структуре гена S1 от всех известных генетических линий. Вариантные изоляты вируса ИБК были выявлены в Красноярском крае, Ленинградской и Владимирской областях, а также на территории Казахстана и Таджикистана. В 2016 г. из образцов внутренних органов кур одной из птице-

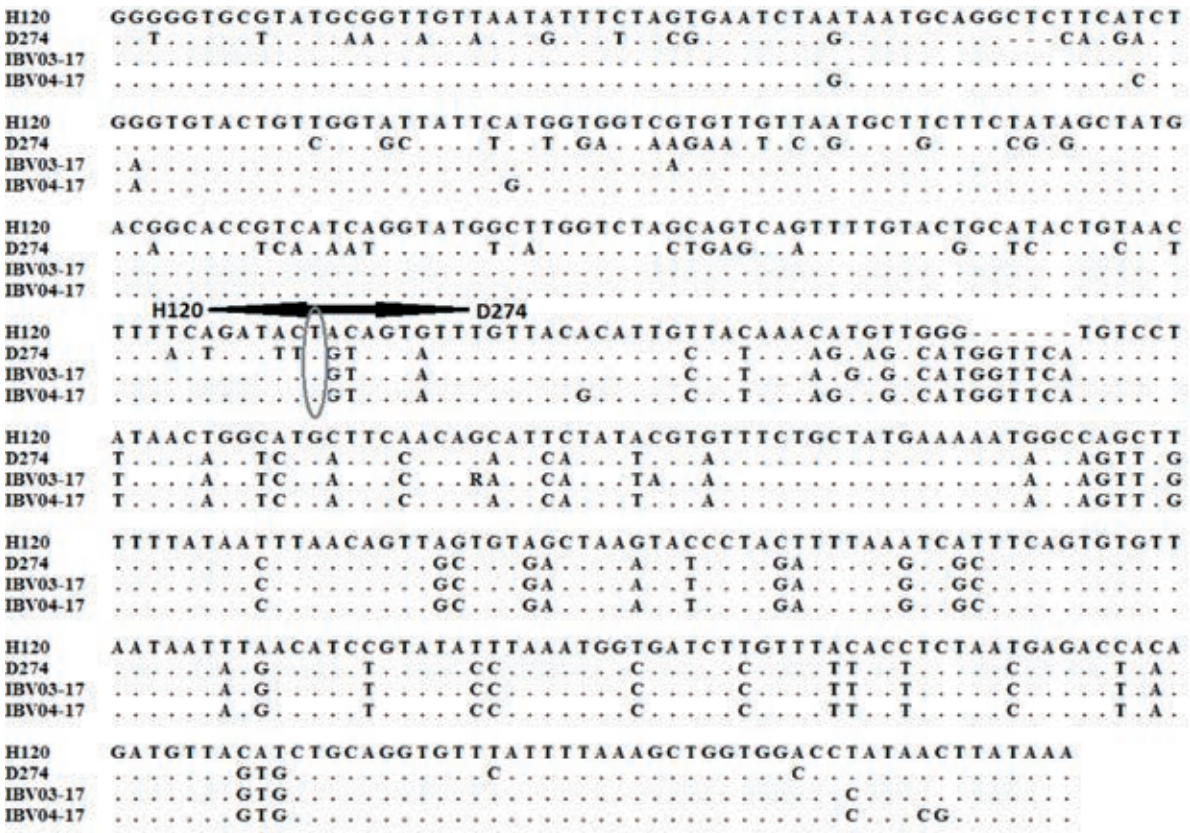


Рис. 3. Выравнивание последовательностей фрагмента гена S1 рекомбинантных изолятов (IBV03-17 и IBV04-17) и предполагаемых родительских форм (вакцинные штаммы H-120 и D274)

На рисунке указана точка рекомбинации.

фабрик Ленинградской области выявили вариантный изолят вируса ИБК IBV24-16 одновременно с вакцинными штаммами 4/91 и H-120. Повторные исследования, проведенные на той же птицефабрике через 3 и 9 месяцев, показали, что выявленные вариантные изоляты IBV37-16 и IBV08-17 отличаются от IBV24-16 на 1,5 и 3% соответственно.

Вариантный изолят IBV19-16, выявленный на птицефабрике во Владимирской области, циркулирует здесь не менее 10 лет. На других птицефабриках Российской Федерации аналогичные изоляты выявлены не были.

Вариантные изоляты обладают способностью инфицировать птиц, несмотря на вакцинацию. Превалирование некоторых вариантов эндемично в отдельных географических областях. Они могут циркулировать в стаде птиц в течение некоторого времени, а потом исчезнуть. Другие варианты могут стать доминирующими и быстро распространяться на большие расстояния.

В течение последних лет для профилактики ИБК стали использовать комбинации различных вакцин и увеличили количество вакцинаций. Считается, что повторные вакцинации различными штаммами могут создать более эффективную защиту против большого разнообразия антигенных вариантов вируса ИБК.

Таким образом, в одной пробе наряду с изолятами нередко выявляются и вакцинные штаммы. В 30% случаев вместе с изолятами GI-19 (QX) одновременно выявляли вакцинные штаммы генетических линий GI-1 (Масс) или GI-13 (793B). В одной из проб одновременно были выявлены два вакцинных штамма H-120 GI-1 (Масс) и 4/91 GI-13 (793B) и изолят GI-19 (QX).

При одновременной репликации вируса ИБК разных генетических линий в одном организме хозяина могут происходить рекомбинации, приводящие к появлению новых вариантов вируса. За период 2015–2017 гг. выявлено три вируса, у которых нуклеотидная последовательность гена S1 состояла из фрагментов двух родительских вирусов: GI-13 (4/91) и GI-12 (D274), GI-13 (4/91) и GI-1 (Масс), GI-1 (Масс) и GI-12 (D274). Ранее были описаны случаи выявления рекомбинантов, где родительскими вирусами были полевые вирусы генотипов QX и Масс, а также вакцинные штаммы D274, 4/91 и H-120 в разных комбинациях между собой, включая комбинацию из двух вакцинных штаммов H-120 и D274 [3].

В 2017 г. в двух пробах, полученных с птицефабрики из Марий Эл, были выявлены два изолята вируса ИБК (IBV03-17 и IBV04-17), часть гена S1 которых имела происхождение от вируса генетической линии GI-13 (D274), а другая часть – от GI-1 (Масс) (рис. 3). Нуклеотидные последовательности фрагмента гена S1 обоих изолятов отличались друг от друга по 10 н. о., из них восемь нуклеотидных замен были несинонимичными. Интересным является факт, что изолят IBV03-17 был выявлен из проб внутренних органов несушки в возрасте 224 сут, а изолят IBV04-17 – из инкубационного яйца. Даже если в популяции кур в данный момент циркулирует вирус одного генотипа, вирусная популяция тем не менее не является однородной. В инфицированном

хозяине вирус ИБК существует в виде набора вирионов, содержащих слегка измененные, но близкородственные геномы, так называемые квазивиды. Квазивиды образуются в результате мутаций и рекомбинаций, которые происходят в результате ошибки репликации вирусного генома. Генетические изменения, активно происходящие в популяции, позволяют вирусу ИБК быстро адаптироваться к хозяину путем отбора наиболее подходящей вирусной субпопуляции. Такой отбор обеспечивает долгосрочное выживание вируса в организме и популяции хозяина, приводит к изменениям в патогенезе вируса и появлению новых вариантов вируса ИБК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате филогенетического анализа изолятов вируса ИБК, выявленных в 2015–2017 гг., было показано, что на территории РФ циркулируют полевые вирусы, относящиеся к восьми генетическим линиям генотипа GI: GI-1 (Macc), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-14 (B1648), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-22, GI-23 (Variant-2). Изоляты генетических линий GI-16 (Q1), GI-22 и GI-23 (Variant-2) на птицефабриках РФ выявлены впервые. Кроме того, были выявлены изоляты, являющиеся рекомбинантами, и вариантные изоляты, не относящиеся ни к одному известному генотипу.

Несмотря на многократную вакцинацию против ИБК с использованием штаммов H-120 и 4/91, продолжается распространение изолятов генетической линии GI-19 (QX) на птицефабриках РФ. Вероятно, необходимо пересмотреть стратегию вакцинации против ИБК на тех птицефабриках, где выявлены изоляты GI-19 (QX).

Анализ изолятов вируса ИБК, выявленных в отдельных птицеводческих хозяйствах в течение нескольких лет, показал, что со временем на птицефабрике происходит смена генетических линий вируса, что обусловливает необходимость постоянного мониторинга циркулирующих изолятов вируса ИБК для дальнейшей оптимизации схемы профилактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Индикация генома вируса инфекционного бронхита кур с помощью полимеразной цепной реакции / Ю. А. Бочков, В. В. Дрыгин, А. В. Борисов [и др.] // Совр. аспекты вет. патологии ж-ных: докл. конф. – Владимир, 1998. – С. 173–183.

2. Методические указания по выявлению генома вируса инфекционного бронхита кур с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Е. В. Овчинникова, Л. О. Щербакова, А. В. Андриясов [и др.]. – Владимир, ФГУ «ВНИИЗЖ», 2010. – 10 с.

3. Овчинникова Е. В. Молекулярно-биологические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных на территории России в период с 2005 по 2011 гг.: дис. … канд. биол. наук. – Владимир, 2012. – 116 с.

4. Cavanagh D., Gelb Jr. J. F. Infectious bronchitis // Diseases of Poultry / ed Y. M. Saif. – 12th ed. – Hoboken, Wiley-Blackwell, 2008. – P. 117–135.

5. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens / L. Yu, Y. Jiang, S. Low [et al.] // Avian Dis. – 2001. – Vol. 45, No. 2. – P. 416–424.

6. Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach / J. J. de Wit, C. Cazaban, R. Dijkman [et al.] // Avian Pathol. – 2018. – Vol. 47, No. 2. – P. 140–151; DOI: 10.1080/03079457.2017.1387231.

7. Ganapathy K., Ball C., Forrester A. Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014 // Virus Res. – 2015. – Vol. 210. – P. 198–204; DOI: 10.1016/j.virusres.2015.07.019.

8. Genetic characterization of the Belgian nephropathogenic infectious bronchitis virus (NIBV) reference strain B1648 / V. R. Reddy, S. Theuns, I. D. Roukaerts [et al.] // Viruses. – 2015. – Vol. 7, No. 8. – P. 4488–4506; DOI: 10.3390/v7082827.

9. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel / R. Meir, E. Rosenblut, S. Perl [et al.] // Avian Dis. – 2004. – Vol. 48, No. 3. – P. 635–641.

10. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China / S. Liu, J. Chen, Z. Han [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – Vol. 35, No. 5. – P. 394–399; DOI: 10.1080/03079450600920984.

11. Lee C. W., Jackwood M. W. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus // Virus Res. – 2001. – Vol. 80, No. 1–2. – P. 33–39.

12. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014–2015 / H. Najafi, A. G. Langeroudi, M. Hashemzadeh [et al.] // Arch. Virol. – 2016. – Vol. 161, No. 1. – P. 53–62; DOI: 10.1007/s00705-015-2636-3.

13. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia / Y. A. Bochkov, G. V. Batchenko, L. O. Scherbakova [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – Vol. 35, No. 5. – P. 379–393.

14. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification / V. Valastro, E. C. Holmes, P. Britton [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2016. – Vol. 39. – P. 349–364; DOI: 10.1016/j.meegid.2016.02.015.

Поступила 05.06.18
Принята в печать 10.08.18