

УДК 636.52/.58:619:578.891:578.5

## **СИНДРОМ БОЛЬШОЙ ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКИ – НОВАЯ ВИРУСНАЯ БОЛЕЗНЬ КУР В РОССИИ**

**В.Н. ИРЗА, А.В. СПРЫГИН**

Впервые в России с помощью ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) идентифицирован возбудитель синдрома большой печени и селезенки — заболевания кур родительского стада бройлеров. На птицефабрике у пораженной птицы отмечали снижение яйценоскости и повышенный отход, при вскрытии наблюдали кровянистую жидкость в брюшной полости, гепато- и спленомегалию, подкапсульные гематомы печени, печень имела ломкую консистенцию. Вирусы, вызывающие сходные клинические признаки (аденовирус, вирус болезни Марека и вирус лейкоза), обнаружены не были. Секвенирование фрагмента гена капсидного белка ORF2 выявленного нами вируса и последующее сравнение с аналогичными последовательностями из базы данных GenBank (NCBI) подтвердили идентичность агента вирусу гепатита Е. Результаты секвенирования ампликона продемонстрировали 61,6–78,6 % гомологии с последовательностями из GenBank для гена капсидного белка ORF2 вируса гепатита Е.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит Е кур, гепато- и спленомегалия, генетическая идентификация.

**Keywords:** avian hepatitis E virus, hens, hepato- and splenomegaly, genetic identification.

Вирусный гепатит Е кур (avian hepatitis E virus, aHEV) — относительно новое заболевание кур, которое может проявляться в виде двух форм: как болезнь большой печени и селезенки (big liver and spleen disease, BLS) (1) или как синдром гепатит-спленомегалии (hepatit-splenomegaly, HSS) (2). При вирусном гепатите Е кур отмечается снижение яйценоскости и повышается смертность. Гистологически заболевание характеризуется неспецифическим гепатитом, однако при HSS отмечают фибринOIDНЫЙ некроз, инфильтрацию лимфоцитами, перифлебит и накопление гомогенного эозинофильного белка в синусах печени.

Вирус гепатита Е (HEV), принадлежащий к семейству *Hepieviridae*, — икосаэдрический, безоболочечный, содержащий одноцепочечную РНК вирус с положительной полярностью (3). К настоящему времени идентифицированы четыре генотипа вируса гепатита Е, из которых 3-й и 4-й генотипы поражают сельскохозяйственных животных (соответственно свиней и кур). Однако 4-й генотип вирусу гепатита Е кур присвоен предварительно и этот вирус занимает в настоящее время промежуточное положение в семействе (8). Возможно, что в будущем ему будет присвоен статус рода.

Вирусный гепатит кур зарегистрирован в Австралии (4), США (5, 6), Испании (7), Венгрии (9), Италии (10) и Китае (11). В России случаи гепатита Е кур пока не идентифицированы с помощью молекулярно-биологических методов, однако есть сообщения, что на птицефабриках России вирус уже циркулирует и даже имеются данные о серопозитивности около 18,3 % кур (12).

Целью нашей работы была генетическая идентификация возбудителя вируса гепатита Е кур в России.

**Методика.** В течение 2009–2010 годов проводили патологоанатомические исследования и ПЦР-анализ биологического материала (образцы ткани печени и желчь) от кур-несушек с признаками гепато- и спленомегалии, содержащихся на бройлерной птицефабрике, где в родительском стаде отмечалось снижение яйценоскости и повышение смертности.

Суммарную РНК получали из гомогената желчи и печени с ис-

пользованием набора для выделения нуклеиновых кислот с сорбентом NucleoS+ («Биоком», г. Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя. Гнездовую полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) выполняли согласно описанному протоколу с помощью прибора «Терцик» («ДНК-технологии», г. Москва), применяя праймеры на ген хеликазы и капсидного белка (13). Для проведения реакции использовали реактивы и Таq-полимеразу фирмы «Promega» (США). Продукты ПЦР разделяли в 1 % агарозном геле с бромистым этидием; результат считали положительным при наличии ампликонов ожидаемой длины (13). Все положительные образцы секвенировали с использованием соответствующих праймеров на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Bio-systems», США).

Полученные последовательности сравнивали с референтными последовательностями из GenBank (National Center for Biotechnology Information — NCBI). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы Clustal W, построение дендрограмм — используя алгоритм «neighbour-joining» со значением бутстреп-параметра 1000 повторов (MEGA 3.1).

*Результаты.* В 2009–2010 годах наше внимание привлекла необычная болезнь кур-несушек из родительского стада бройлеров — синдром большой печени и селезенки. Ветеринарные врачи птицефабрик направляли образцы патологического материала на исследование с целью исключения болезни Марека, лейкозов и аденоизвирусных инфекций, поскольку при этих заболеваниях отмечаются сходные изменения. При патологоанатомическом исследовании печени кур с признаками гепато- и спленомегалии мы наблюдали клинические проявления, характерные для вирусного гепатита Е (рис. 1, см. 3-ю страницу обложки).

При тестировании на другие патологические агенты (вирусы болезни Марека, лейкоза, возбудители аденоизвирусных инфекций) был получен отрицательный результат (данные не представлены). Идентификацию вируса гепатита Е кур с помощью гнездовой ПЦР проводили с использованием обеих пар праймеров (12), однако положительный результат дали только праймеры на ген капсидного белка ORF 2 (рис. 2). Мы предполагаем, что отсутствие положительной реакции на ген хеликазы вируса гепатита Е кур связано с высокой генетической вариабельностью выявленного нами изолята, однако для доказательства этого требуется дополнительный генетический анализ.

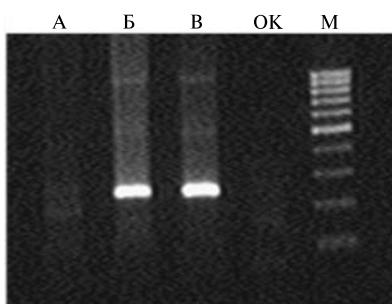
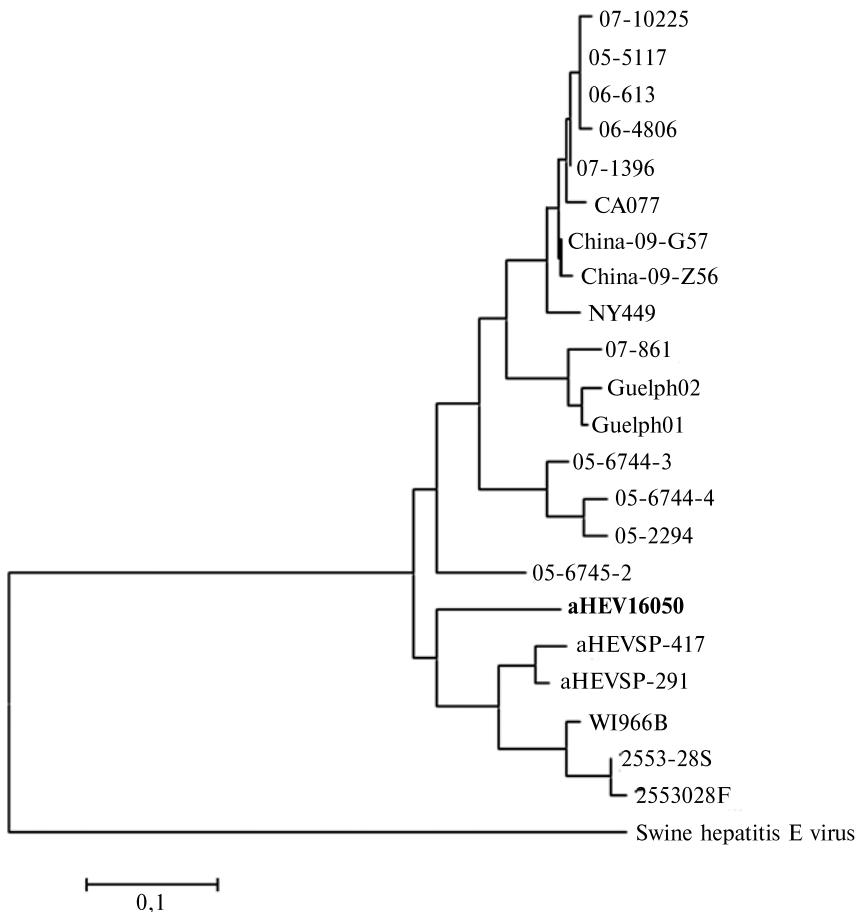


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), полученных при анализе образцов патологического материала (ткани печени и желчь от кур с признаками гепато- и спленомегалии из родительского стада бройлерного хозяйства на территории Российской Федерации) на наличие вируса гепатита Е кур (aHEV): А — отсутствие продуктов амплификации ДНК гена хеликазы вируса гепатита Е кур; Б и В — положительный результат амплификации ДНК гена капсидного белка ORF2 вируса гепатита Е кур (длина фрагмента 242 п.н.); ОК — отрицательный контроль; М — маркер молекулярных масс с шагом 100 п.н. (100 bp DNA Ladder, UAB «Fermentas», Литва).

Положительные результаты амплификации подтвердило секвенирование с использованием прямого и обратного праймеров на ген ORF2. На основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена кап-

капсидного белка ORF2 была построена дендрограмма (рис. 3). Интересно, что обнаруженный нами изолят вируса гепатита Е кур, обозначенный как aHEV16050, не вошел ни в одну из генетических групп, представленных на дендрограмме. Более того, у aHEV16050 генетическая гомология по последовательностям из GenBank для гена ORF2 вируса гепатита Е составила 61,6-78,6 %.



**Рис. 3. Дендрограмма, отражающая филогенетическое родство между изолятами вируса гепатита Е, выявленным у кур из родительского стада в бройлерном хозяйстве на территории Российской Федерации (aHEV16050), и другими известными изолятами.** Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbour-joining» на основании нуклеотидной последовательности фрагмента гена капсидного белка ORF2. Для сравнения в качестве внешней группы выбрана аналогичная последовательность вируса гепатита Е свиней.

Последовательность, которая была получена нами для изолята вируса гепатита Е, выявленного у кур из родительского стада в бройлерном хозяйстве на территории Российской Федерации, в настоящее время депонирована в базе данных GenBank под номером JQ814691.

Важно отметить, что детекция вируса гепатита Е кур осуществляется главным образом методом ОТ-ПЦР, поскольку размножение вируса в культуре клеток и с использованием куриных эмбрионов представляет значительные трудности (14, 15).

Таким образом, описан первый случай генетической идентификации вируса гепатита Е кур в России. Полученные результаты позволят практикующим ветеринарным врачам правильно диагностировать сходные клинические проявления у поголовья на птицефабрике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Payne C.J. Big liver and spleen disease. In: Diseases of poultry /Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne (eds.). Ames, Iowa State Press, 2005: 1184-1186.
2. Shiva prasad H.L. Hepatitis splenomegaly syndrome. In: Diseases of poultry /Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne (eds.). Ames, Iowa State Press, 2003: 1186-1188 (on CD-ROM not in book).
3. Emerson S.U., Anderson D., Arankalle A. et al. Genus *Hepivirus*. In: Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses /C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball (eds.). Elsevier, Academic Press, London, United Kingdom, 2004: 853-857.
4. Payne C.J., Ellis T.M., Plant S.L., Gregory A.R., Wilcox G.E. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet. Microbiol.*, 1999, 68: 119-125.
5. Haqshenas G., Shiva prasad H.L., Woolcock P.R., Read D.H., Meng X.J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.*, 2001, 82: 2449-2462.
6. Haqshenas G., Huang F.F., Fennoy M., Guenette D.K., Pierson F.W., Larsen C.T., Shiva prasad H.L., Toth T.E., Meng X.J. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J. Gen. Virol.*, 2002, 83: 2201-2209.
7. Peralta B., Barnes M., Ordóñez G., Porta R., Martín M., Mateu E., Piña S., Meng X.J. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet. Microbiol.*, 2009, 137: 31-36.
8. Meng X.J., Anderson D.A., Arankalle V.A., Emerson S.U., Harrison T.J., Jameel S., Okamoto H. *Hepeviridae*. In: Virus taxonomy, 9<sup>th</sup> Report of the ICTV. King AMQ /M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz (eds), Elsevier Academic Press, London., 2011: 1021-1028.
9. Morrow C.J., Samu G., Mátrai E., Klausz Á., Wood A.M., Richter S., Jaskulska B., Hess M. Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary. *Avian Pathol.*, 2008, 37: 527-535.
10. Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoci G. Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2005, 4: 303-305.
11. Zhao Q., Zhou E.M., Dong S.W. et al. Analysis of avian hepatitis E virus from chickens, China. *Emerg Infect Dis.*, 2010, 16(9): 1469-1472.
12. Токарев О.И. Патоморфологическая характеристика тимуса и селезенки кур при вирусном гепатите Е. Автoref. канд. дис. Воронеж, 2012.
13. Sun Z.F., Larsen C.T., Dunlop A., Huang F.F., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J. Gen. Virol.*, 2004, 85: 693-700.
14. Haqshenas G., Shiva prasad H.L., Woolcock P.R., Read D.H., Meng X.J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.*, 2001, 82: 2449-2462.
15. Payne C.J., Plant S.L., Ellis T.M., Hillier P.W., Hopkinson W. The detection of the big liver and spleen agent in infected tissues via intravenous chick-embryo inoculation. *Avian Pathol.*, 1993, 22: 245-256.

ФГБУ Федеральный центр охраны  
здоровья животных,  
600901 г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЭЖ»,  
e-mail: sprygin@arriah.ru, irza@arriah.ru

Поступила в редакцию  
25 марта 2012 года

## HEPATITIS SPLENOMEGLY SYNDROME, A NEWLY IDENTIFIED HEN VIRAL DISEASE IN RUSSIA

V.N. Irza, A.V. Sprygin

S u m m a r y

For the first time in Russia, the viral agent of hepatitis splenomegaly syndrome, a disease

of laying hens from broilers' parental flock, has been identified by the use of RT-PCR (reverse transcription — polymerase chain reaction). On a poultry farm a low laying ability and high death of sick birds were examined, and the dissection revealed the bloody liquid in abdominal cavity, the hepatomegaly, the hepatic subcapsular hematomas and a breakable consistence of the liver. The viruses that cause similar clinical symptoms (adenovirus, Marek's disease virus, leucosis virus) were not found. The sequence analysis of DNA fragment of ORF2 capsid protein gene of isolated virus and subsequent comparison with analogous sequences from GenBank database (NCBI) confirmed the identity of the agent to hepatitis E virus. Amplicon sequencing showed 61.6-78.6 % homology to the sequences from GenBank for capsid protein ORF2 gene of hepatitis E virus.

## Научные собрания



### МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ» (20-22 марта 2012 года, г. Москва)

Мероприятие проводилось в рамках традиционного Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (организатор — ЗАО «Экспо-биохим-технологии»). Пленарное заседание конференции посвящалось фундаментальным исследованиям в биофармацевтике (научные руководители — академик РАН, заместитель директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Председатель научного Совета Пущинского научного центра РАН А.И. Мирошников (г. Москва), академик РАН, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН В.В. Власов (г. Новосибирск).

На секции «Фармацевтические биотехнологии в ветеринарии» (научный руководитель — академик РАСХН, профессор, директор Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности А.Я. Самуиленко) рассматривались вопросы разработки и моделирования управляемых процессов культивирования микробов при производстве бактериальных препаратов, обеспечения безопасной работы биопредприятий, животноводческих комплексов и перерабатывающих предприятий АПК, качества биофармпрепаратов для животноводства России, стандартов для оценки качества антирабических вакцин.

Тематика докладов секции «Биофармацевтические препараты» — рекомбинантные терапевтические белки, белки плазмы крови, вакцины, терапевтические моноклональные антитела, лекарства на основе растительного сырья. В рамках секции «Биотехнология генно-инженерных продуцентов» обсуждался опыт промышленного производства генно-инженерных лекарственных препаратов, секция «Клеточные технологии в медицине» посвящалась вопросам применения стволовых клеток (мезенхимальные стволовые клетки, коррекция репродуктивных функций, нейральные стволовые клетки в терапии, фундаментальные основы модуляции функций эндогенных стволовых клеток). На секции «Современные подходы к разработкам биофармацевтических средств» рассматривались особенности организации доклинической и клинической оценки эффективности и безопасности биофармпрепаратов.

Специальные секции посвящались вопросам биоинформатики (внутриклеточные сети, системная биология сложных заболеваний, информационные и вычислительные Интернет-ресурсы для медицины и фармацевтики) и современным инструментальным методам исследования (микроскопия, масс-спектрометрия). В тематике секции «Фармацевтические кластеры и развитие фармацевтической промышленности. Интеллектуальная собственность» были отражены особенности формирования кластеров, экономика и менеджмент, стандартизация биофармацевтических продуктов, регистрация импортных и отечественных биофармпрепаратов в РФ.

На конференции состоялся конкурс молодых ученых, который традиционно проводится в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Одновременно с конференцией проводилась выставка, на которой были представлены современные технологические разработки и проекты, а также приборы, оборудование, реактивы для биофармацевтических исследований.

Информация и контакты: <http://www.mosbiotechworld.ru>

## Новые книги

Кульчин Ю.Н., Вознесенский С.С., Безвербный А.В. **Фотоника биоминеральных и биомиметических структур и материалов.** М.: изд-во «Физматлит», 2011, 224 с.

Монография, в которой проанализировано текущее состояние, результаты комплексных исследований природных биоминералов позволяет с единых позиций взглянуть

на проблемы биоминерализации в живой природе и поиск путей ее биомиметического моделирования применительно к перспективам развития такой многообещающей области исследований, какой являетсяnano- и микрофотоника. Книга может быть полезна специалистам, работающим в области биофизики, фотоники, nano- и биотехнологий.