

# ІЗОЛЯЦІЯ ПАТОГЕННОГО ПОЛІОМАВІРУСУ ГУСЕЙ В УКРАЇНІ

Г. В. Білецька

Державна дослідна станція птахівництва НААН

*Представлені результати виділення патогенного поліомавірусу гусей в одному із гусівничих господарств України. Наявність геному поліомавірусу підтверджена молекулярно-генетичними дослідженнями. При експериментальному інфікуванні гусенят вірус-вміщуючою суспензією спостерігали їх 100 % загибель, при інфікуванні ембріонів гусей — виражені патолого-анатомічні зміни, характерні для прояву геморагічного нефрит-ентериту гусей. Проведені дослідження вказують на появу нового небезпечного захворювання гусей в Україні та нагальну потребу диференціації вірусних збудників ентеритів гусей.*

В останні роки в Україні збільшилися випадки захворювання гусенят старше 4-тижневого віку з клінічними та патологоанатомічними ознаками, характерними для хвороби Держі — парвовірусної інфекції, відомої в Україні та країнах близького зарубіжжя під назвою вірусний ентерит гусей. Якщо враховувати, що для цього захворювання існує вікова стійкість, яка настає у гусенят в 25-добовому віці, то прояв захворювання у птиці старшого віку можна вважати не типовим. Крім того, випадки захворювання спостерігались у гусенят, одержаних від батьківських стад, вакцинованих проти цієї хвороби, що допускало існування іншої етіології захворювання.

Аналіз літературних даних свідчив про те, що причиною ентериту, поряд із парвовірусом, може бути інший вірусний агент — поліомавірус гусей (*Goose Hemorrhagic Polyomavirus, GHPV*).

Вперше поліомавірус було ідентифіковано у 2000 році завдяки використанню молекулярно-генетичних методів ідентифікації геному вірусу, хоча захворювання було описано ще у 1969 році в Угорщині [1]. Захворювання, яке спричинено поліомавірусом — геморагічний нефрит-ентерит гусей (*Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese, HNEG*) за останні 10–12 років реєстрували у Франції, Німеччині, Угорщині [1–4]. Загибель гусенят від цієї хвороби може досягати 70 % і більше. До хвороби чутливий молодняк гусей до 10-тижневого віку.

При захворюванні у гусенят спостерігаються риніт, кон'юнктивіт, нервові явища, діарея. Патологоанатомічні зміни подібні парвовірусній інфекції, а саме: геморагічний ентерит кишківника, збільшення печінки та селезінки, асцит, набряки підшкірної сполучної тканини, запалення нирок. У гусенят, які загинули внаслідок хронічного перебігу, знаходять вісцеральну подагру та урати в суглобах, що є наслідком дисфункції нирок та підвищення концентрації сечової кислоти в крові. В багатьох тканинах у інфікованих гусенят спостерігаються геморагії [3, 5].

Типові клінічні ознаки і патологоанатомічні зміни у хворих гусенят 3–6-тижневого віку, які надходили у лабораторію профілактики захворювань птиці і молекулярної діагностики Інституту тваринництва НААН протягом 2012 року наводили на думку про появу геморагічного нефрит-ентериту гусей в Україні та розповсюдження поліомавірусу, який викликає це захворювання. Для підтвердження цього висновку була здійснена спроба ідентифікації і виділення збудника, що і було метою досліджень.

**Матеріали і методи.** Для проведення досліджень використовували тканини кишківника, печінки і шлунка загиблих гусенят 30-добового віку з характерною для вірусного ентериту патологоанатомічною картиною. Трупні гусенят надійшли з господарства, яке проводило щеплення батьківського стада проти вірусного (парвовірусного) ентериту.

3 органів готували 10 % суспензію на фізіологічному розчині і обробляли хлороформом за методом Н. Feldman та S. S. Wany [6]. Підготовлений патматеріал контролювали на відсутність контамінації аеробної та анаеробної мікрофлори і використовували для молекулярно-генетичних досліджень індикації геномів парвовірусу та поліомавірусу та інфікування 14-добових гусячих ембріонів.

Виділення ДНК вірусів проводили наборами «ДНК Сорб-Б». Для індикації парвовірусу використовували специфічні праймери GPV-F та GPV-R, які фланкують ділянку гену VP3, для індикації поліомавірусу — специфічні праймери GHPV-F та GHPV-R, які фланкують ділянку гену VP1. ПЛР проводили за допомогою реагентів DreamTaq Green PCR MasterMix (2x) (ThermoScientific) з використанням термоциклера «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) за методикою дуплексної ПЛР, розробленою в лабораторії профілактики захворювань птиці і молекулярної діагностики Інституту тваринництва [7].

Електрофорез продуктів ампліфікації проводили з використанням 1,5 % агарозного гелю протягом 45 хв. при 120 V. Проби фарбували з використанням етидію броміду в ультрафіолетовому спектрі. Розмір ампліфікованих фрагментів визначали з використанням маркера молекулярних мас M-100. Присутність у пробах геному парвовірусу реєстрували за наявністю фрагментів ДНК розміром 539 п.н., поліомавірусу — 144 п.н.

Інфікування ембріонів проводили на хоріоалантоїсну оболонку нативною суспензією та розведеною до  $10^{-2}$  в дозі 0.2 см<sup>3</sup>, гусенят — внутрішньоочеревинно нерозведеною суспензією в дозі 0.2 см<sup>3</sup>.

Титрування вірусу проводили на 14-добових гусячих ембріонах. Титр вірусу обчислювали за методом Ріда і Менча [8].

**Результати й обговорення.** Аналіз електрофореграми, одержаної в результаті проведення дуплексної ПЛР із дослідною суспензією органів, вказував на наявність в пробі поліомавірусу, оскільки розмір ампліфікованого фрагменту складав 144 п.н., а не 539 п.н., характерного для парвовірусу.

Для підтвердження висновку, що причиною загибелі гусенят був саме поліомавірус, було проведено експериментальне відтворення хвороби на добових гусенятах. Інфікування нативним матеріалом (дослідною суспензією органів) із додаванням антибіотиків викликало загибель гусенят на 18–19 добу. При патологоанатомічному розтині спостерігали геморагічний ентерит кишківника, збільшення печінки, асцит, запалення нирок.

Ізоляцію вірусу проводили на ембріонах гусей 14-добової інкубації (табл.). При інфікуванні нативною суспензією спостерігали загибель 50 % ембріонів на 3 добу.

Таблиця

**Результати інфікування 14-добових ембріонів гусей суспензією органів гусенят із наявністю геному поліомавірусу (GHPV)**

Матеріал для інфікування	Доза, см <sup>3</sup>	Відхід ембріонів у процесі інкубації	Відхилення в розвитку
Нативна суспензія	0.2	4/4*	4/4
Розведення $10^{-2}$	0.2	4/0	4/4
Фізіологічний розчин (контроль)	0.2	4/0	4/0

*Примітка:* \*) - чисельник – загальна кількість ембріонів; знаменник – кількість загиблих ембріонів або ембріонів з відповідними патолого-анатомічними ознаками

При зменшенні дози інфікування в 100 разів, загибелі ембріонів не спостерігали, проте при їх розтині на 27 добу інкубації (13 добу після інфікування) спостерігали яскраво виражені патолого-анатомічні зміни, а саме: відкладення сечокислих солей на різних частинах тіла ембріона, рихлість тільця ембріону, набряки підшкірної клітковини, особливо в області голови, крапкові крововиливи на ХАО, гіперемія потиличної частини голови, асцит, зміна структури нирок: гіпертрофія і кровонаповнення, набряки суглобів ніг, збільшення

прямої кишки. Аналогічні зміни були описані S. Bernath та ін. [9] як характерні для прояву геморагічного нефрит-ентериту гусей на ембріонах.

Від загиблих ембріонів на 3 добу було відібрано алантоїсну рідину, в якій визначали титр вірусу шляхом титрування на 14-добових гусячих ембріонах. Титр вірусу становив 3.1 ІgЕЛД<sub>50</sub>.

## В И С Н О В К И

Проведені дослідження підтвердили наявність патогенного поліомавірусу в одному із гусівничих господарств України та появу нового небезпечного захворювання гусенят в Україні. Виділений польовий ізолят вірусу характеризується високою патогенністю: при експериментальному інфікуванні добових гусенят вірус спричиняє їх 100 % загибель при відносно швидкій реплікації вірусу — 18 діб; при інфікуванні гусячих ембріонів викликає виражені патолого-анатомічні зміни, характерні для прояву геморагічного нефрит-ентериту гусей. У випадку прояву ознак ентериту у гусенят у господарстві необхідно проводити диференційну діагностику для визначення етіологічного агенту та з'ясування причини захворювання гусенят.

**Перспективи подальших досліджень.** Поява нового небезпечного захворювання гусенят в Україні викликає необхідність вивчення ступеню його розповсюдження та розробки заходів боротьби.

## ISOLATION OF PATHOGENIC GOOSE POLYOMAVIRUS IN UKRAINE

*A. V. Beletska*

State Poultry Research Station of NAAS

### S U M M A R Y

The results of the isolation of pathogenic *Goose hemorrhagic polyomavirus* in one of geese farms of Ukraine are present. The availability of genome *polyomavirus* confirmed by molecular-genetic research. In experimental infection goslings with homogenates of organs 100% of the deaths was observed; in the infection of embryos geese - special pathological feature of haemorrhagic nephritis enteritis of geese. The present study shows the emergence of a new dangerous diseases geese in Ukraine and the urgent need of differentiation of viral pathogens enteritis geese.

## ИЗОЛЯЦИЯ ПАТОГЕННОГО ПОЛИОМАВИРУСА ГУСЕЙ В УКРАИНЕ

*A. B. Белецкая*

Государственная опытная станция птицеводства НААН

### А Н Н О Т А Ц И Я

Представлены результаты выделения патогенного полиомавируса гусей в одном из гусеводческих хозяйств Украины. Наличие генома полиомавируса подтверждено молекулярно-генетическими исследованиями. При экспериментальном инфицировании гусят вируссодержащей суспензией наблюдали их 100 % гибель, при инфицировании эмбрионов гусей — выраженные патологоанатомические изменения, характерные для проявления геморагического нефрит-энтерита гусей. Проведенные исследования указывают на появление нового опасного заболевания гусей в Украине и насущную необходимость дифференциации вирусных возбудителей энтеритов гусей.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *J. L. Guerin*. A novel polyomavirus goose hemorrhagic polyomavirus is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese / J. L. Guerin, J. Gelfi, L. Dubois [et al] // *J. of Virol.* — 2000. — V.74 (10). — P. 4523–4529.
2. *V. Palya*. Epizootic occurrence of haemorrhagic nephritis enteritis infections of geese / V. Palya, E. Ivanics, R. Glavits [et al] // *Avian Pathol.* — 2004. — V. 33(2). — P. 244–250.
3. *C. Lacroux*. Pathology of spontaneous and experimental infections by Goose haemorrhagic polyomavirus / C. Lacroux, O. Andreoletti, B. Payre[et al] // *Avian Pathol.* — 2004. — V. 33 (3). — P. 351–358.
4. *Reimar J.* Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family/ J. Reimar, M. Hermann // *J. Virol.* — 2007. — V. 81 (21). — P. 11554–11559.
5. *Schettler C. H.* Clinical picture and pathology of haemorrhagic and enteritis in geese / *Tierartzl. Prax.* — 1980. — 8. — P. 313–320.
6. *Антонов Б. И., Борисова В. В., Каменева Л. П.* Лабораторные исследования в ветеринарии: Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни. Справочник / Антонов Б. И., Борисова В. В., Каменева Л. П. // М.: Агропромиздат, 1987. — 240 с.
7. Спосіб диференційної діагностики ентеритів гусей з використанням дуплексної полімеразної реакції. Патент на корисну модель № 87312 / Кулібаба Р. О., Юрко П. С., Білецька Г. В., Терещенко О. В. (Україна); Опубл. 10.02.2014. — Бюл. № 3. — 3 с.
8. *Сюрин В. Н.* Ветеринарная вирусология / Сюрин В. Н., Белоусова Р. В., Фомина Н. В. // М.: Колос.-1984.
9. *S. Bernath*. Pathology of goose hemorrhagic polyomavirus infection in goose embryos / S. Bernath, A. Farsang, A. Kovacs [et al] // *Avian Pathol.* — 2006. — V. 35(1). — P.49–52.