СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2013, № 6, с. 36-42

Ветеринарная вирусология, микробиология

УДК 636.52/.58:619:578.82/.83(470) *doi: 10.15389/agrobiology.2013.6.36rus*

О РАСПРОСТРАНЕНИИ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА ПТИЦ В ПТИЦЕВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

В.А. ПЛОТНИКОВ[1], Т.В. ГРЕБЕННИКОВА[1], Е.К. ДУДНИКОВА[1], М.И. ШУЛЬПИН[2], С.П. ЛАЗАРЕВА[2], З.Б. НИКОНОВА[2], А.Э. МЕНЬЩИКОВА[2], С.Н. НОРКИНА[1], Т.И. АЛИПЕР[1]

В период с 2005 по 2011 год в 46 административных регионах России методами ИФА и ПЦР проведен мониторинг 223 птицеводческих хозяйств различного направления, а также племенных стад на наличие вируса лейкоза птиц (ВЛП, Avian leucosis virus — AVL) и антител к нему. Антитела к ВЛП были выявлены в 90 %, к подтипу ВЛП-J — в 70 % обследованных птицефабрик как яичного, так и бройлерного направления. Вирус ВЛП подтипа J обнаружен в племенных стадах яичного направления (линии Hysex, Rodonit, Ross 308). При исследовании выделены и охарактеризованы по молекулярно-генетическим свойствам 12 полевых изолятов ВЛП, циркулирующих на территории Российской Федерации. Полевые изоляты сформировали две группы. В первой группе представлены эндогенные и экзогенные рекомбинантные ВЛП, которые выделяются на территории США, Китая, Франции и Японии, начиная с 1993 года. Вторую филогенетическую группу образовали изоляты ВЛП подгруппы J, полученные на территории Китая, Франции и США. В каждую из филогенетических групп входят выделенные нами образцы.

Ключевые слова: вирус лейкоза птиц, ИФА, ПЦР.

Лейкозом птиц (пролиферативное заболевание гемопоэтической системы) называют доброкачественные и злокачественные новообразования, которые вызывают вирусы лейкоза птиц (ВЛП), относящиеся к роду *Alpharetrovirus* из семейства *Rertoviridae*. На основании различий по последовательностям гена гликопротеина вирусной оболочки *env*, схемам проникновения в восприимчивый организм, инфекционности для ряда мишеней (in vitro и in vivo) ВЛП подразделяют на шесть патогенных подгрупп — A, B, C, D, E (1) и J (2). Вирусы из подгрупп A, B, C, D, J относятся к экзогенным, из подгруппы E — к эндогенным.

У кур экзогенные ВЛП приводят к развитию лимфоидного и миелоидного лейкоза, эритробластоза, миелобластоза, миелоцитоматоза, опухолей соединительной и эндотелиальной ткани, остеопетроза, менингиом и глиом. Формы новообразований, индуцируемые ВЛП, зависят от штамма вируса, дозы и способа заражения, генотипа, пола и возраста восприимчивого организма (2). Из этих видов опухолей наиболее распространен лимфоидный лейкоз (ЛЛ), или В-клеточная лимфома, первично образующаяся в фабрициевой сумке и инициирующая метастазы в висцеральных органах (2, 3). От кур, пораженных лимфоидным лейкозом, в большинстве случаев выделяют вирус подгруппы A (2). Представители подгруппы J (описаны сначала в Англии в 1989 году, а позже и в других странах) первично были обнаружены у кур мясных пород при массовом заболевании миелоидным лейкозом (МЛ) (4-7).

Экзогенные ВЛП передаются как вертикально, так и горизонтально (при условии полной инфекционности вируса), эндогенные — обычно через зародышевые клетки обоих полов (8). Среди эндогенных многие генетически дефектны и не могут обеспечить развитие инфекционных вирионов. Однако некоторые все же способны экспрессироваться в эмбрионах или у вылупившихся птенцов с образованием инфекционной формы (3).

Несмотря на применяемые методы контроля за этой инфекцией, она широко распространена во всем мире и наносит значительный ущерб

промышленному птицеводству. В основном экономические потери обусловлены уменьшением продуктивности (отбраковка бройлеров при забое, уменьшение яйценоскости и снижение качества яиц) и высокой смертностью птицы, которая составляет примерно 1-2 %, но в некоторых случаях достигает 20 % и более (9). Исследования эпизоотологической ситуации по лейкозу птиц в России пока что немногочисленны (10).

Мы изучили распространение вируса лейкоза птиц в птицеводческих хозяйствах на территории Российской Федерации и охарактеризовали молекулярно-генетические свойства полученных изолятов.

Методика. Обследование проводили в 2005-2011 годах в 223 птицеводческих хозяйствах (86 — яичного, 107 — бройлерного и 21 — племенного направления) из 46 регионов России. Обследовали птицу следующих линий: Hysex white, Hysex brown, Lohmann white, Lohmann brown, Lohmann LSL, Lohmann NIC, Shaver white, Shaver brown, Rodonit (яичное направление) и Ross 308, Cobb, Hubbard F 15 (ISA) (бройлерное направление). Всего на наличие ВЛП и антител к ВЛП подгруппы J проанализировали более 10 000 образцов сыворотки крови, полученной от клинически здоровых кур. Сыворотку крови при транспортировке помещали на лед и в дальнейшем содержали при –20 °С до проведения исследований. Пробы, используемые для тестирования методом ИФА, хранили в фосфатном буферном растворе (pH 7,0) с 0,1 % Tween 80, предназначенные для анализа методом ПЦР — в замороженном состоянии без добавления реагентов.

Для обнаружения вирусов в пробах и подтверждения их наличия в выделенных препаратах применяли коммерческий набор ИФА-АВИВАК-ВЛП для выявления группоспецифического антигена ВЛП p27 (ООО НПП «АВИВАК», Россия) по методике производителя. Содержание антител против ВЛП подгруппы J определяли с помощью набора Avian leucosis virus subgroup J antibody test kit для иммуноферментного анализа («Sinbiotics», Франция) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

При выделении вирусов в качестве вируссодержащего материала в основном использовали лейкоцитарную фракцию крови (отбирали образцы крови птицы с клиническими признаками неопластических заболеваний, положительные по группоспецифическому p27-антигену ВЛП при ИФА-тестировании) и клоакальные смывы от инфицированных особей. Первичную культуру фибробластов, полученных от 11-суточных SPF (specific pathogen free — свободных от возбудителей инфекционных болезней) куриных эмбрионов («Lohmann Tierzucht», Германия), инокулировали вируссодержащим материалом и помещали в CO_2-инкубатор на 10-14 сут при температуре 37 °С (контроль — неинокулированные куриные фибробласты), через 10-14 сут полученную культуральную жидкость и суспензию клеток анализировали на наличие ВЛП методами ИФА и ПЦР. Каждый ВЛП$^+$-изолят проверяли на наличие вируса болезни Марека (серотипы 1, 2 и 3), вируса ретикулоэндотелиоза, а также на бактериальную контаминацию с использованием моноклональных и поликлональных антител (ADOL — USDA-ARS Avian disease and Oncology Laboratory, США).

Выявление генома ВЛП и дифференциацию вирусов проводили с применением коммерческого ПЦР-набора Тест-система для детекции и дифференциации ВЛП («ВетБиоХим», Россия) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-фрагменты разделяли при помощи гель-электрофореза и очищали, используя набор для выделения из геля Geneclean kit («Qbiogene Inc.», Канада). Первичную структуру полученных ДНК-фрагментов определяли на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI 377 («Applied Biosystem», США) и анализировали с использованием компьютерных программ Mac-

Vector/AssemblyLign (Oxford Molecular Group, США) и PHYLIP (University of Washington, США).

Результаты. Согласно принятому в настоящее время территориально-административному делению, в Российской Федерации имеется 83 региона, включая области, республики, края, автономные области и автономные края (в отдельные регионы выделены города Москва и Санкт-Петербург, которые при мониторинге не учитывали). Мы изучали эпизоотологическую ситуацию в отношении лейкоза птицы в 46 регионах (табл. 1).

1. Наличие («+») или отсутствие («–») p27-антигена вируса лейкоза птиц (ВЛП) и антител к ВЛП подгруппы J в обследованных промышленных птицеводческих хозяйствах разного направления (по регионам России и годам наблюдения)

Регион	Год	Число хозяйств							
		всего	по направлениям						
			мясное		яичное		племенное		
			+	–	+	–	+	–	
Амурская область	2005-2006	2	2 (J)						
Астраханская область	2007	2			2 (p27)				
Республика Башкортостан	2006-2008	4			1 (p27)		2 (p27); 1 (J)		
Белгородская область	2005-2009	13	6 (J)	3 (p27); 1 (J)	2 (J)		2 (J)		
Брянская область	2007	1	1 (p27)						
Владимирская область	2005-2007, 2011	9	2 (p27); 1 (J)		4 (p27)			2 (p27)	
Волгоградская область	2005-2008	7	1 (p27); 5 (J)	1 (p27); 2 (J)	1 (p27)				
Вологодская область	2005-2008	6	1 (p27); 1 (J)	1 (p27); 1 (J)	2 (p27)				
Воронежская область	2006	1	1 (p27)						
Ивановская область	2006, 2008	2	1 (p27)		1 (p27)				
Калининградская область	2005	1				1 (p27)			
Калужская область	2008	1	1 (J)						
Кировская область	2005-2008	4	1 (J)	1 (J)	1 (p27)		1 (p27)		
Республика Коми	2005	1			1 (p27)				
Костромская область	2005-2006	2	1 (J)			1 (J)			
Краснодарский край	2005-2006, 2010	12	3 (p27); 6 (J)		1 (p27)		3 (p27); 5 (J)		
Красноярский край	2006-2007	3	1 (p27)		2 (p27)				
Курганская область	2005-2007	3	2 (p27); 1 (J)						
Курская область	2005-2009	5	1 (p27); 2 (J)		3 (p27); 2 (J)				
Липецкая область	2006-2007, 2010	5	5 (p27); 2 (J)	1 (J)					
Республика Марий Эл	2005	1			1 (p27); 1 (J)				
Республика Мордовия	2006, 2010	2			1 (p27)	1 (p27)			
Московская область	2005-2008, 2010	6	2 (J)		3 (p27)		1 (p27); 1 (J)		
Нижегородская область	2005-2007, 2011	18			12 (p27); 4 (J)	1 (J)	1 (p27); 1 (J)	1 (J)	
Новгородская область	2005-2008	5	1 (J)		4 (p27)	1 (J)			
Новосибирская область	2006	1		1 (J)					
Омская область	2005-2006, 2008	3	1 (p27); 1(J)	1 (J)					
Оренбургская область	2007-2008	2	2 (J)						
Орловская область	2005-2008	5	2 (p27); 4 (J)	1 (p27); 1 (J)					
Пермская область	2005-2009	9	4 (J)		4 (p27)	2 (J)			
Пензская область	2007	1	1 (p27)						
Псковская область	2006	1			1 (p27)				
Ростовская область	2005-2006, 2008	8	3 (p27); 4 (J)		3 (p27); 1 (J)				
Рязанская область	2005-2007, 2009	6	1 (J)		1 (p27)		4 (p27); 2 (J)		
Самарская область	2005-2009	9	5 (p27); 7 (J)						
Саратовская область	2005-2007	9		2 (J)	2 (p27)		2 (p27); 5 (J)	1 (p27); 1 (J)	
Свердловская область	2005-2008	5	1 (J)				4 (p27); 1 (J)		
Ставропольский край	2006-2009	7	2 (p27); 1 (J)		4 (p27)				
Тамбовская область	2007	1	1 (J)						
Республика Татарстан	2005-2007	4	1 (J)	1 (J)	2 (p27)				
Тверская область	2005-2007	4	1 (p27); 3 (J)						

Продолжение таблицы 1

Тульская область	2005, 2007-2009	8	1 (p27); 2(J)	1 (p27)	4 (p27); 1 (J)			
Тюменская область	2008	1	1 (J)					
Удмуртская Республика	2005-2006	3			2 (p27)	1 (p27)		
Челябинская область	2005-2009	8	2 (J)		2 (p27); 2 (J)		2 (p27); 2 (J)	
Чувашская Республика	2006-2007	2	2 (J)					
Ярославская область	2005-2008, 2010	10	1 (J)		5 (p27); 1 (J)		4 (J)	
Всего	2005-2011	223						

В промышленных птицехозяйствах примерно в 50 % регионов России провели мониторинг антител к ВЛП, в 37 % — исследовали наличие вирусов ВЛП. В 58 % регионов при этом использовали ИФА, в 42 % — ПЦР. Из обследованных хозяйств 50 % составили бройлерные, 40 % — яичные и 10 % — племенные (по птице как бройлерного, так и яичного направления).

Широкий анализ банка сывороток, собранных за период с 2005 по 2011 год, подтвердил, что практически на всех обследованных птицефабриках яичного направления (97 %) и более чем в 50 % бройлерных хозяйств поголовье инфицировано ВЛП. Антитела против ВЛП подгруппы J выявили в образцах сывороток, собранных на 70 % обследованных птицефабрик как яичного, так и бройлерного направления. В сыворотках, полученных из 8 хозяйств (9 % от обследованных), антитела против ВЛП-J не обнаружили. Отметим, что здесь отбор образцов проводился однократно и серопозитивные особи, возможно, будут выявлены в дальнейшем, поскольку в 11 хозяйствах (13 %) специфические антитела детектировали только при повторных исследованиях.

Для анализа соотношения инфицированной и сероположительной по ВЛП птицы в зависимости от возраста и направления использования собранные сыворотки ранжировали по семи возрастным группам для яичных и бройлерных хозяйств. Увеличение доли положительных по ВЛП образцов (рис. 1, А) наблюдали до возраста 101-130 сут, далее этот показатель постепенно уменьшался. Наибольший рост числа образцов, в которых детектировали ВЛП, в птицеводческих хозяйствах яичного направления отмечали в одной возрастной группе (101-130 сут, до 67 %), бройлерного — в двух группах (41-100 сут, 68 %; 101-130 сут, 66 %).

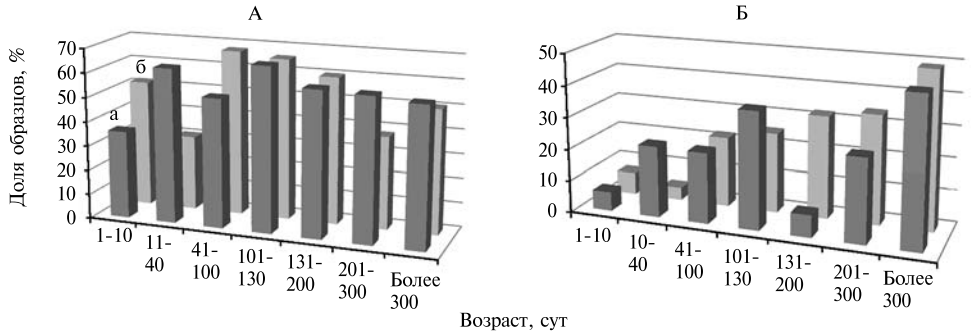

Рис. 1. Доля образцов, позитивных по вирусу лейкоза птиц (ВЛП) (А) **и содержащих антитела к ВЛП подгруппы J** (Б)**, от общего числа образцов сыворотки крови, взятых в обследованных промышленных птицеводческих хозяйствах из 46 регионов России, в зависимости от возраста птицы и направления ее использования:** а — яичное направление, б — бройлеры (2005-2011 годы).

Количество антител против ВЛП-J (см. рис. 1, Б) у птицы из хозяйств яичного направления повышалось до 130-суточного возраста, после чего доля серопозитивных особей резко снижалась (до 7 %) и затем дости-

2. Изоляты вируса лейкоза птиц, выделенные при обследовании промышленных птицеводческих хозяйств в 46 регионах России

Обозначение, №	Место и время обнаружения
132	Липецкая область, июнь 2010 года
346	Московская область, январь 2010 года
138	Ростовская область, сентябрь 2010 года
130	Свердловская область, январь 2010 года
76	Ростовская область, март 2010 года
11	Владимирская область, июнь 2011 года
9	Владимирская область, июнь 2011 года
7	Владимирская область, июнь 2011 года
5	Владимирская область, июнь 2011 года
2	Владимирская область, июнь 2011 года
3	Владимирская область, июнь 2011 года
8	Нижегородская область, март 2011 года

гала максимального значения (46 %) в старшей возрастной группе (более 300 сут). В бройлерных хозяйствах титр антител с возрастом птицы постоянно увеличивался. Наибольший процент сероположительных по ВЛП-J образцов для обоих типов птицеводческих хозяйств отмечали в старшей возрастной группе (более 300 сут): для яичного и бройлерного направления значения составили соответственно 46 и 49 % (см. рис. 1).

Наличие ВЛП подтипа J было подтверждено в хозяйствах племенного яичного направления (линии Hysex, Rodonit, Ross 308) и получены полевые изоляты вируса.

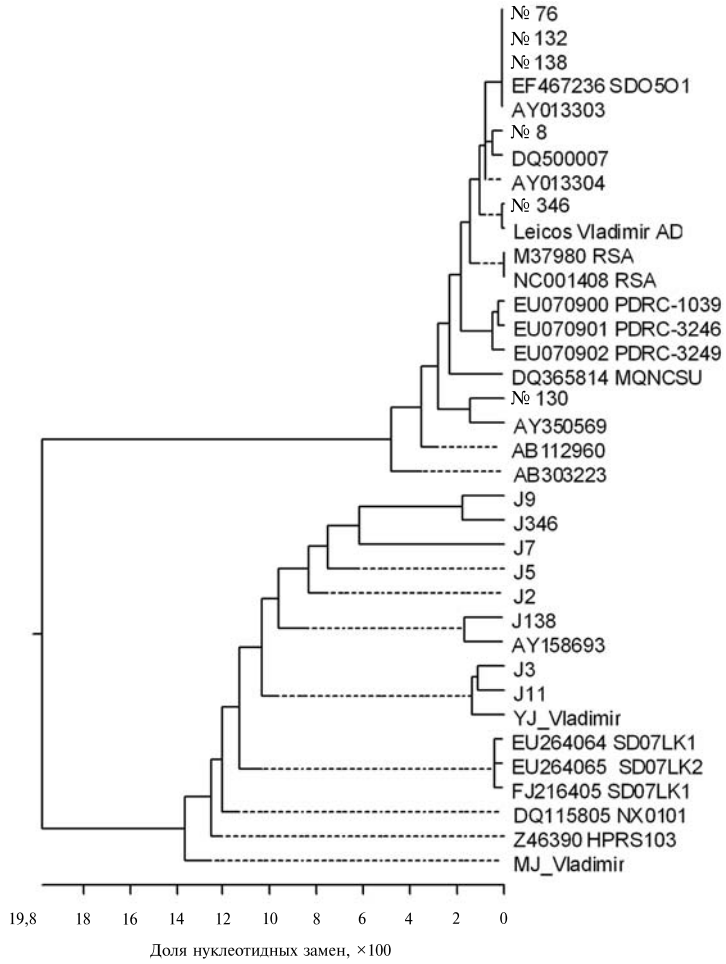

Рис. 2. Дендрограмма, характеризующая генетические различия между изолятами вируса лейкоза птиц (ВЛП) **разного происхождения** (построена на основании первичной структуры фрагмента кДНК гена *env* ВЛП)**:** №№ 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 76, 130, 132, 138, 346 — выделены при обследовании промышленных птицеводческих хозяйств в 46 регионах России; изоляты MJ_Vladimir и YJ_Vladimir выделены во Всероссийском НИИ здоровья животных (г. Покров, Московская обл.) и предоставлены для сравнительного нуклеотидного анализа.

Кроме того, всего нам удалось выделить 12 полевых изолятов ВЛП (табл. 2) (11). У них был амплифицирован вирус-специфический вариабельный фрагмент кДНК гена *env*.

Результаты анализа нуклеотидных последовательностей полученных ампликонов и их сравнения с последовательностями, описанными для зарубежных штаммов ВЛП, отражает дендрограмма, характеризующая генетические различия (рис. 2). Нуклеотидные последовательности выделенных ранее зарубежных штаммов ВЛП получали из банка данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).

Изоляты №№ 8, 76, 130, 132, 138 и 346 образовали одну филогенетическую группу с известными ранее изолятами (AY013303, EF467236, DQ500007, AY013304, EU070900, EU070901, EU070902, M37980, NC_001408, DQ365814, AY350569, AB303223, AB112960) при внутригрупповых различиях, не превышающих 5 %. В этой группе представлены эндогенные и экзогенные рекобинантные ВЛП, которые выделены на территории США, Китая, Франции и Японии, начиная с 1993 года. Изоляты №№ 2, 3, 5, 7, 9, 11, 138 и 346 образуют вторую филогенетическую группу с изолятами ВЛП подгруппы J, полученными на территории Китая, Франции и США (внутригрупповые различия превышают 10 %). В целом исследуемые изоляты сформировали две обширные группы, в каждую из которых входят выделенные нами образцы.

Итак, в 90 % обследованных нами птицеводческих хозяйств были выявлены антитела к вирусу лейкоза птиц (ВЛП), в 70 % хозяйств как яичного, так и бройлерного направления — антитела к ВЛП подгруппы J. Процент инфицирования поголовья в птицеводческих хозяйствах этих направлений увеличивается с возрастом поголовья при максимуме в возрасте 101-130 и более 300 сут. С использованием первичной культуры куриных фибробластов выделены 12 изолятов ВЛП, которые идентифицированы методами ИФА и ПЦР. В результате филогенетического анализа полученных изолятов установлено, что они незначительно отличаются от описанных на территории других стран, что может указывать на наличие общего предшественника.

[1]ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения РФ,
123098 Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, 16,
e-mail: plotnvadim@yandex.ru, t_grebennikova@mail.ru, dudnikova@narvac.com, snork9@list.ru;

[2]ФГБУ Федеральный центр охраны здоровья животных,
600901 Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
e-mail: shulpin@arriah.ru

Поступила в редакцию 10 сентября 2013 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2013, № 6, pp. 36-42

ABOUT SPREADIANG THE AVIAN LEUKOSIS VIRUSES IN POULTRY FARMS IN RUSSIAN FEDERATION

V.A. Plotnikov[1], T.V. Grebennikova[1], E.K. Dudnikova[1], M.I. Shulpin[2], S.P. Lazareva[2], Z.B. Nikonova[2], A.E. Menshikova[2], S.N. Norkina[1], T.I. Aliper[1]

[1]*D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology*, 16, ul. Gamalei, Moscow, 123098 Russia, e-mail plotnvadim@yandex.ru, t_grebennikova@mail.ru, dudnikova@narvac.com, snork9@list.ru;

[2]*Federal Center for Animal Health Contro*l, FGBU VNIIZZh, mkr. Yurievets, Vladimir, 600901 Russia, e-mail shulpin@arriah.ru

Received September 10, 2013 doi: 10.15389/agrobiology.2013.6.36eng

A b s t r a c t

In 2005-2011, in 46 administrative regions of the Russian Federation the monitoring of 223 poultry farms (broiler and egg production, and also the breeding farms) has been carried out to de-

tect Avian Leukosis Virus (ALV) and antibodies to ALV subgroup J using PCR and ELISA. A total number of samples tested was more then 10,000. Antibodies to ALV and ALV subgroup J were identified at 90 and 70 % of examined farms (for broiler production as well as egg production), respectively. ALV subgroup J was found at breeding farms and egg farms (the Hysex, Rodonit, Ross 308 lines). Twelve Russian ALV field isolates have been obtained, and their molecular genetic properties were characterized. The field isolates formed two phylogenetic groups. In the first group the endogenous and exogenous recombinant VLP which are being isolated in the United States, China, France and Japan since 1993 are represented. The second phylogenetic group consists of ALV subgroup J isolates obtained in China, France and the United States. Each group contains the Russian isolates we obtained.

Keywords: avian leukosis virus, ELISA, PCR.

REFERENCES

1. Coffin J.M. *Structure and classification of retroviruses. The Retroviridae*. Plenum Press, NY, 1992. Vol. 1: 19-49.
2. Payne L.N., Fadly A.M. Leukosis/sarcoma group. In: *Diseases of Poultry*. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. Mc Dougald, Y.M. Saif (eds.). Iowa, 1997. Vol. 10: 414-466.
3. Ewert D.L., DeBoer G.F. *Avian lymphoid leukosis: Mechanism of lymphomagenesis. Immunodeficiency Disorders*. Boston, 1988: 37-53.
4. Fadly A.M., Smith E.J. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukosis in meat-type chickens in the United States. *Avian Dis.*, 1999, 43: 391-400.
5. Payne L.N., Brown S.R., Bumstead N., Howes K., Frazier J.A., Thouless M.E. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *J. Gen. Virol.*, 1991, 72: 801-807.
6. Payne L.N., Gillespie A.M., Howes K. Induction of myeloid leukosis and other tumors with the HPRS-103 strain of ALV. *Vet. Rec.*, 1991, 129: 447-448.
7. Payne L.N., Gillespie A.M., Howes K. Myeloid leukemia and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. *Leukemia*, 1992, 6: 1167-1176.
8. Crittenden L.B. Exogenous and endogenous leukosis virus genes — A review. *Avian Pathology*, 1981, 10: 101-112.
9. Gavora J.S. Influence of avian leukosis virus infection on production and mortality and the role of genetic selection in the control of lymphoid leukosis. In: *Avian leukosis*. G.F. de Boer (ed.). Martinus Nijhoff Puplishing, Boston, 1986: 241-260.
10. Grebennikova T.V., Alekseev K.P., Vlasova A.N., Pokrovskaya M.A., Bogos'yan A.A., Zaberezhnyi A.D., Aliper T.I., Nepoklonov E.A. *Ptitsa i ptitseprodukty*, 2003, 6: 35-37.
11. Plotnikov V.A., Grebennikova T.V., Dudnikova E.K., Norkina S.N., Aliper T.I. *Voprosy virusologii*, 2012, 5: 38-43.