

Б. Б. БАЙМАХАНОВА^{1*}, А.Б. СЕЙДАЛИНА¹, С.А. СУЛЕЙМЕНОВА¹,
Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹,
А.И. КЫДЫРМАНОВ¹, С.Р. ФЕРЕЙДОУНИ²

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Венский университет ветеринарной медицины, Вена, Австрия

*e-mail: bbbayken@mail.ru

ГЕПАТИТ Е ПТИЦ В КАЗАХСТАНЕ

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.05

Аннотация

В статье описаны исследования вируса гепатита Е, обнаруженного в птицеводческом хозяйстве пригорода г.Алматы (Казахстан), во время вспышки заболевания неизвестной этиологии у цыплят месячного возраста. В паренхиме печени и почек выявлены зернистая дистрофия и некротические изменения, резкое увеличение размера селезенки и лимфоидных фолликул. При ОТ-ПЦР к консервативному фрагменту гена хеликазы вируса гепатита Е в четырех исследованных образцах обнаружена РНК вируса, подтверждающая наличие возбудителя.

Ключевые слова: птица, вирус гепатита Е, ОТ-ПЦР, гистологические исследования.

Вирусный гепатит Е (ВГЕ) – это инфекционное заболевание птиц, млекопитающих животных и человека, вызываемое РНК-содержащим вирусом семейства *Hepeviridae*. У домашних кур гепатит Е зарегистрирован во многих странах мира с 80-х годов прошлого столетия – в Австралии, США, Испании, России, Венгрии, Италии, Китае [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7], Корею, Чехии, Англии, Украине, Польше, Израиле [8] по сегодняшний день.

Впервые болезнь была отмечена у цыплят с синдромом большой печени и селезенки (Big liver and spleen – BLS) в Австралии [9]. В США и Канаде также зарегистрировано заболевание, известное как синдром гепато-спленомегалии без каких-либо известных возбудителей и провоцирующих факторов. Молекулярно-генетические исследования показали, что возбудители BLS в Австралии и гепато-спленомегалии в США являются различными вариантами ВГЕ почти идентичными по нуклеотидной последовательности. На основе значительного сходства их геномов с таковыми ВГЕ человека и других животных возбудитель BLS обозначен отдельно как ВГЕ птиц.

Заражение домашних птиц гепатитом Е происходит алиментарно, возможен также трансвариальный путь передачи вируса [10]. Заболевание у кур развивается с 24-недельного возраста, и у большинства клинически не проявляется. Снижаются продуктивность и яйценоскость поголовья, у некоторых наблюдается сонное состояние, происходит массовый падеж здоровой с виду птицы [11]. Часто вирусный гепатит Е сопровождается желточным перитонитом. Диагностировать инфекцию можно по патолого-морфологическим изменениям с обязательным подтверждением с помощью ИФА или ПЦР.

Целью данного исследования явилось определение возможной роли ВГЕ в смертности и снижении продуктивности у кур с синдромом гепато-спленомегалии в птицеводческих хозяйствах РК.

Материалы и методы исследования

Для вирусологических, гистологических и гематологических исследований от больных и павших птиц собраны клоакальные, трахеальные смывы, кусочки внутренних органов и образцы крови.

Смывы собирали стерильными ватными тампонами, помещали во флаконы со средой 199, содержащей комплекс антибиотиков (пенициллин 2000 ед/мл, стрептомицин 2 мг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, нистатин 50 ед/мл) и бычий сывороточный альбумин (0,5%/л). Для помета и клоакальных смывов концентрацию антибиотиков увеличивали в пять раз. Пробы до вирусологических исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Для гистологических и патологоанатомических исследований тушки вскрывали, при внешнем осмотре учитывали размеры тела, вес, упитанность, состояние кожи, слизистых оболочек. Из павших цыплят получены кусочки внутренних органов (печень, почка, селезенка, легкие, кишечник). Ткани фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, после промывки в воде проводили обезвоживание в спиртах восходящей крепости, пропитывали парафином. Затем готовили гистосрезы толщиной 3–5 мкм, окраску срезов проводили гематоксилином и эозином по Ван-Гизону, окрашивали по общепринятой методике [12], микрофото препаратов снимали при помощи микроскопа марки «Leica» EVOS XL Core, (Thermo Fisher Scientific). Мазки крови от больных цыплят фиксировали в 96% спирте и окрашивали по Романовскому [13]. Для молекулярно-генетических исследований пробы органов и тканей гомогенизировали в криопробирках с транспортировочной средой при помощи нержавеющей стальных шариков в автоматическом высокоскоростном гомогенизаторе закрытого типа TissueLyzer II (QIAGEN). Выделение РНК из гомогенатов органов проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК экстрагировали из 140 мкл клинических образцов и элюировали в окончательном объеме 60 мкл деионизированной воды.

Вирусоспецифические РНК выявляли в биопробе в одношаговой обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции с применением набора Access One-Step RT-PCR Kit (Promega) согласно инструкции с использованием праймеров к консервативному фрагменту гена хеликазы ВГЕ AHEV F: 5'- TGT TAT TCAC CCAC CAA GAAC GTCTG - 3'; Helic R: 5'- CCTCAGTGGACCGTATATCGACCC, охватывающему фрагмент в 452 пар оснований.

Реакцию проводили в термоциклере Eppendorf Gradient при следующих параметрах: обратная транскрипция при 48°C 45 мин, начальная 2 мин денатурация при 95°C и амплификация в 40 циклов, включающая денатурацию (94°C, 60 сек), отжиг праймеров (42°C, 60 сек) и удлинение цепи (72°C, 60 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин.

Результаты и обсуждение

Летом 2014 г. в одном из птицев хозяйств пригорода г.Алматы обнаружено заболевание неизвестной этиологии, сопровождавшееся гибелью цыплят месячного возраста. У больных птиц отмечали общее угнетение, постепенное ослабление с летальным исходом.

При вскрытии трупов установлены: значительное увеличение объема (в 4–6 раз) печени, тестоватость консистенции, подкапсульные кровоизлияния в ней. Селезенка была увеличена в 3–4 раза, и на разрезе находились полупрозрачные зерна. У птиц наблюдались сгустки крови, серозная жидкость в области грудной полости.

В мазках крови находили множество зернистых лейкоцитов и отмечали уменьшение количество лимфоцитов. В паренхиме печени и почек выявлены зернистая дистрофия и некротические изменения. Многие кровеносные сосуды были сдавленными и пустыми, балочное строение печени повсеместно было нарушено, в пространствах наблюдалось отложение амилоида. В междольковой соединительной ткани печени находили очаги клеточной инфильтрации, состоящие из лимфоцитов и эозинофилов с примесью плазматических клеток (рисунок 1); выявлены гнездные скопления клеточных элементов в мезенхиме, также отмечено резкое увеличение размера селезенки и лимфоидных фолликулов.

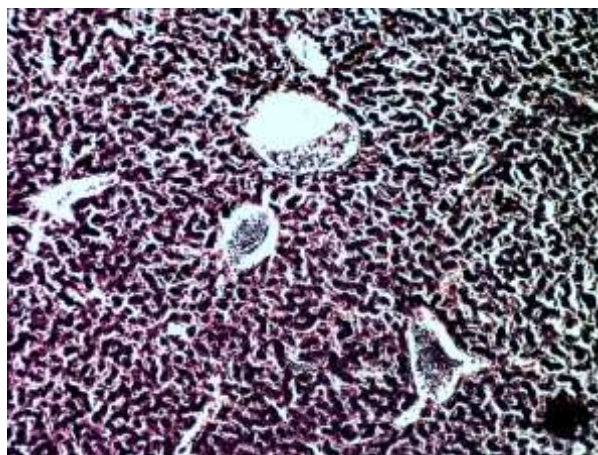
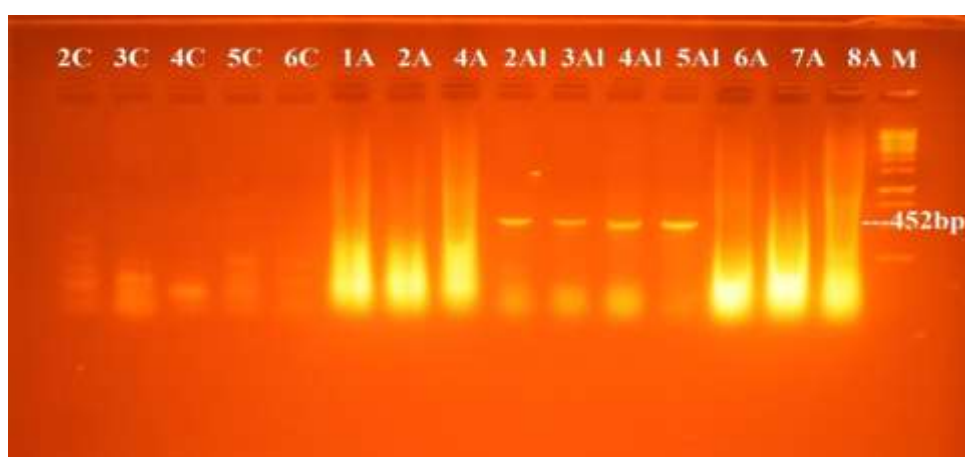


Рисунок 1 – Печень павшего цыпленка. Дискомплексация балок и некрозы гепатоцитов. Гематоксилин-эозин. М ×10

Патологические и гистологические изменения с преимущественным поражением печени и селезёнки, массовость заболевания указывали на возможность поражения птиц вирусной инфекцией характеризующейся гепатолиенальным синдромом.

С целью установления возможного инфицирования цыплят ВГЕ птиц проводили ОТ-ПЦР к консервативному фрагменту гена хеликазы ВГЕ. В четырех исследованных образцах обнаружена РНК вируса, охватывающая фрагмент в 452 пары оснований (рисунок 2).



Примечание – М молекулярный маркер, 2С по 6С пробы птиц, 1А по 8А пробы из птицефабрики №1, 2А1, 3А1, 4А1, 5А1 пробы птицефабрики №2

Рисунок 2 – фрагмент РНК вируса, охватывающий 452 пары оснований

В пробах птицефабрики №2. – 2А1, 3А1, 4А1, 5А1 обнаружена РНК ВГЕ, в остальных пробах РНК данного вируса отсутствовала.

Заключение

Вирус гепатита Е связан с синдромом большой печени и селезёнки (BLS), также называемым синдромом гепато-спленомегалии. Впервые он обнаружен у кур в Австралии в 1980-х гг. [1], в Европе зарегистрирован в Италии и Венгрии в 2004–2005 гг. [14, 15]. В Польше ветеринары наблюдали случаи заболевания BLS в 2007 г., хотя первые частичные последовательности генов польских изолятов ВГЕ описаны и представлены в GenBank в 2010 г. [16].

По данным Х. J Meng, Н L Shivoprosad [17] от субклинических форм птичьего ВГЕ страдают преимущественно взрослые несушки, бройлеры и работники ферм, при этом

производство яиц снижается до 20% в неделю, а смертность увеличивается до 1%, возбудитель также выделяется от здоровых кур [18].

Помимо других факторов (например, иммунного статуса птиц), генетические различия между изолятами ВГЕ могут быть причиной различной степени их патогенности и инфекционной дозы [19].

Обнаруженные в нашем исследовании увеличенные печень и селезёнка, субкапсулярные кровоизлияния в печени и кровянистая жидкость в висцеральной полости являются типичными патологическими повреждениями при ВГЕ. Таким образом, описанные выше патологоанатомические и гистологические изменения, а также результаты ПЦР анализа органов больных цыплят свидетельствуют о наличии ВГЕ птиц в хозяйствах на территории РК.

Финансирование

Настоящее исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант №AP08053014).

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, 2003: 1184-1186 (doi: 10.1016/S0378-1135(99)00067-X).
- 2 Shivaprasad 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.
- 3 Peralta B., Biarnes M., Ordonez G., Porta R., Martin M., Mateu E., Pina 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 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.010).
- 4 Irza V., Sprygin A. Big liver and spleen syndrome is a new viral disease in Russian chicken flocks // Agricultural Biology, 2012, 4: 73-77 (<http://www.agrobiology.ru/4-2012irza-eng.html>).
- 5 Morrow C.J., Samu G., Matrai E., Klausz A., 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 (doi: 10.1080/03079450802356946).
- 6 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G. Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy // Ital. J. Anim. Sci., 2005, 4: 303-305.
- 7 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.
- 8 Marek A., Bilic L., Prokofieva L., Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes // Vet. Microbiol., 2010, 145: 54-61 (doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014).
- 9 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 Aug 16; Vol.68(1-2). P.119-25.
- 10 Agunos A.C. Avian hepatitis E virus in an outbreak of hepatitis-splenomegaly syndrome and fatty liver haemorrhage syndrome in two flaxseed-fed layer flocks in Ontario / A.C.Agunos, D.Yoo, S.A.Youssef, D.Ran, B.Binnington, D.B.Hunter // Avian Pathology. – 2006. – V. 35. – № 5. – P. 404-412.
- 11 Кравчинский К. Гепатит Е / К.Кравчинский // Гепатология. – 1993. – № 17. – С. 932-941.
- 12 Шалгимбаева С.М., Кобегенова С.С., Нуршин К.А. «Микротехника негізери» // Алматы 2007. С.19.
- 13 Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Окраска мазков по Романовскому // В кн. Клиническая гематология животных. М.Колос. 1974, С.69-70.
- 14 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G., Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy // J Anim Sci. 2005; Vol.4. P.303–305.
- 15 Morrow CJ, Samu G, Matrai E, Klausz A, Wood AM, 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. Vol. 37. P.527-535. doi: 10.1080/03079450802356946.

16 Marek A., Bilic I., Prokofieva I., Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes // *Vet Microbiol.* 2010; Vol. 145, P.54-61. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014.

17 Meng X.J., Shivaprasad H.L. Avian Hepatitis E Virus Infections // In D.E. Swayne (Ed.). *Diseases of Poultry* 2013. P.494-512.

18 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 // *Journal of General Virology.* 2004. Vol. 85. P.693-700. 10.1099/vir.0.19582-0

19 Billam P., Sun Z.F., Meng X.J. Analysis of the complete genomic sequence of an apparently avirulent strain of avian hepatitis E virus (avian HEV) identified major genetic differences compared with the prototype pathogenic strain of avian HEV // *Journal of General Virology*, May 2007. Vol. 88 P.1538-1544. 10.1099 / vir.0.82754-0

Б. Б. БАЙМАХАНОВА^{1*}, А.Б. СЕЙДАЛИНА¹, С.А. СУЛЕЙМЕНОВА¹,
Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.О. ҚАРАМЕНДИН¹,
А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹, С.Р. ФЕРЕЙДОУНИ²

¹Микробиология және вирусология ғылыми өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Вена ветеринариялық медицина университеті, Вена, Австрия

*e-mail: bbbayken@mail.ru

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ҚҰСТАРДЫҢ Е ГЕПАТИТИ

Түйін

Мақалада бір айлық тауықтарда этиологиясы белгісіз ауру ошағы кезінде Алматы (Қазақстан) қаласының маңындағы құс фабрикасында анықталған Е гепатиті вирусын зерттеу сипатталған. Бауыр мен бүйрек паренхимасында түйіршікті дистрофия және некроздық өзгерістер, көкбауыр мен лимфоидты фолликулалардың күрт ұлғаюы анықталды. Е гепатиті вирусының геликаз генінің консервативті фрагментіне КТ-ПТР төрт үлгіде вирустық РНҚ анықталуы, қоздырғыштың болуын растайды.

Түйінді сөздер: құс, гепатит Е вирусы, КТ-ПТР, гистологиялық зерттеулер

IRSTI: 34.25.00

B.B. BAIMAKHANOVA^{1*}, A.B. SEIDALINA¹, S.A. SULEIMENOVA¹,
E.T. KASYMBEKOV¹, E.YA. KHAN¹, K.O. KARAMENDIN¹,
A.I. KYDYRMANOV¹, S.R. FEREIDOUNI²

¹Scientific Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria.

*e-mail: bbbayken@mail.ru

AVIAN HEPATITIS E IN KAZAKHSTAN

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.05

Abstract

The article describes the study of hepatitis E virus detected in a poultry farm in the suburbs of Almaty (Kazakhstan), during an outbreak of a disease of unknown etiology in 30-day old chickens. In the parenchyma of the liver and kidneys, granular dystrophy and necrotic changes, a sharp increase in the size of the spleen and lymphoid follicles were revealed. Viral RNA were revealed In reverse transcription

polymerase chain reaction with primers directed to the conservative fragment of the hepatitis E virus helicase gene in four samples, confirming with the presence of the pathogen.

Keywords: poultry, hepatitis E virus, RT-PCR, histological studies

Hepatitis E virus (HEV) is an infectious disease of birds, mammals and humans caused by RNA-containing virus of the family *Hepeviridae*. In domestic chickens, hepatitis E has been registered in many countries of the world - in Australia, USA, Spain, Russia, Hungary, Italy, China [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7], Korea, Czech Republic, England, Ukraine, Poland, Israel [8].

The disease was first reported in chickens with Big liver and spleen syndrome (BLS) in Australia [9]. A disease known as hepatosplenomegaly syndrome has also been reported in the United States and Canada without any known causative agents or provoking factors. Molecular genetic studies have shown that the causative agents of BLS in Australia and hepatosplenomegaly in the United States are different variants of HEV with almost identical nucleotide sequences. Based on the significant similarity of their genomes to those of human and other animal HEVs, the causative agent of BLS is designated separately as avian HEV.

Infection of poultry with hepatitis E occurs in the alimentary way, transovarian route of virus transmission is also possible [10]. The disease in chickens develops from 24 weeks of age, and most chickens have no clinical manifestations. The productivity and egg production of the livestock are reduced, some have a sleepy state, there is a mass death of a healthy-looking bird [11]. Often viral hepatitis E is accompanied by yolk peritonitis. The infection can be diagnosed by pathological and morphological changes with mandatory confirmation by ELISA or PCR.

The purpose of this study was to determine the possible role of HEV in mortality and loss of productivity in chickens with hepatosplenomegaly syndrome in poultry farms of Kazakhstan.

Materials and research methods

Cloacal and tracheal wipes, pieces of internal organs and blood samples were collected from sick and dead birds for virological, histological and hematological studies.

Washouts were collected with sterile cotton swabs, placed into vials with medium 199 containing a complex of antibiotics (penicillin 2000 U/ml, streptomycin 2 mg/ml, gentamicin 50 µg/ml, nystatin 50 U/ml) and bovine serum albumin (0.5% /l). For litter and cloacal washings, the concentration of antibiotics was increased five times. Samples were stored in liquid nitrogen (-196°C) before virological studies.

For histological and pathoanatomical studies, the carcasses were dissected; during an external examination, the body size, weight, fatness, condition of the skin, mucous membranes were taken into account. Pieces of internal organs (liver, kidney, spleen, lungs, intestines) were obtained from dead chickens. The tissues were fixed in a 10% neutral formalin solution, after washing in water, they were dehydrated in alcohols of increasing strength, and soaked in paraffin. Then, histosections 3-5 µm thick were prepared, the sections were stained with hematoxylin and eosin according to Van Gieson, stained according to the generally accepted method [12], microphotograph preparations were taken using a Leica EVOS XL Core microscope (Thermo Fisher Scientific). Blood smears from sick chickens were fixed in 96% alcohol and stained according to Romanovsky [13]. For molecular genetic studies, samples of organs and tissues were homogenized in cryovials with a transport medium using stainless steel balls in an automatic high-speed homogenizer of a closed type TissueLyzer II (QIAGEN). RNA isolation from organ homogenates was performed using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden) according to the manufacturer's recommendations. RNA was extracted from 140 µl of clinical samples and eluted in a final volume of 60 µl of deionized water.

Virus-specific RNA was detected in a bioassay in a one-step reverse transcription-polymerase chain reaction using the Access One-Step RT-PCR Kit (Promega) according to instructions using primers to the conserved fragment of the AHEV helicase gene: 5'-TGT TAT TCAC CCAC CAA GAAC GTCTG -3'; Helic R: 5'-CCTCAGTGGACCGTATCATGACCC, spanning a 452 base pair fragment.

The reaction was performed in an Eppendorf Gradient thermocycler under the following parameters: reverse transcription at 48°C 45 min, initial 2 min denaturation at 95°C, and amplification in 40 cycles including denaturation (94°C, 60 sec), primer annealing (42°C, 60 sec) and chain extension (72°C, 60 sec) followed by final elongation at 72°C, 10 min.

Results and discussion

In the summer of 2014, a disease of unknown etiology, accompanied by the death of one-month-old chickens, was found in one of the poultry farms in the suburbs of Almaty. The sick birds showed general depression, gradual weakening with lethal outcome.

At autopsy, the following were established: a significant increase in the volume (4-6 times) of the liver, testiness of the consistency, subcapsular hemorrhages in it. The spleen was enlarged 3-4 times, and translucent grains were found on the section. Blood clots and serous fluid in the thoracic cavity were observed in the birds.

In blood smears, many granular leukocytes were found and a decrease in the number of lymphocytes was noted. In the parenchyma of the liver and kidneys, granular dystrophy and necrotic changes were revealed. Many blood vessels were compressed and empty, hepatic bar structure was disturbed everywhere, amyloid deposition was observed in spaces between them. In the interlobular connective tissue of the liver, foci of cell infiltration were found, consisting of lymphocytes and eosinophils with an admixture of plasma cells (Figure 1); nested accumulations of cellular elements in the mesenchyme were revealed, and a sharp increase in the spleen and lymphoid follicles was also noted.

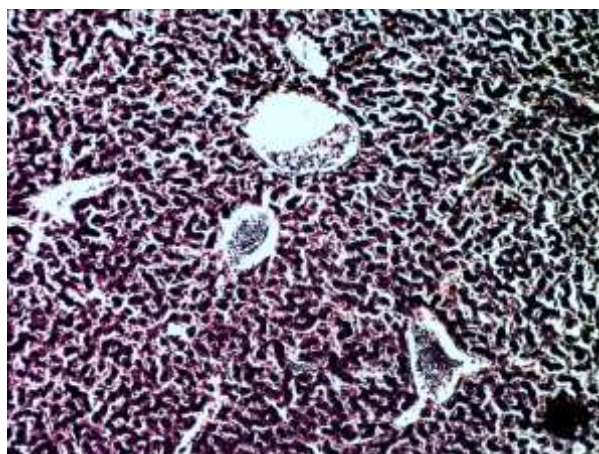
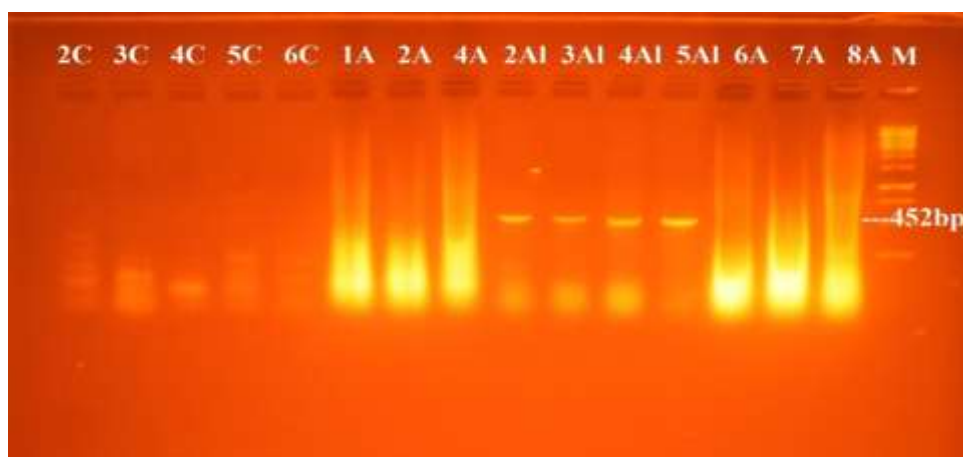


Figure 1 - Liver of a fallen chicken. Discomplexation of bars and necrosis of hepatocytes.
Hematoxylin-eosin. M $\times$ 10

Pathological and histological changes with a predominant lesion of the liver and spleen, the mass nature of the disease indicated the possibility of birds being affected by a viral infection characterized by hepatolienal syndrome.

In order to determine the possible infection of chickens with avian hepatitis E viruses, PCR was performed to identify the pathogen. During RT-PCR to a conservative fragment of the HEV helicase gene revealed viral RNA covering a fragment of 452 base pairs in the four samples examined (Figure 2).



Note - M molecular marker, 2C to 6C bird samples, 1A to 8A samples from poultry farm #1, 2Al, 3Al, 4Al, 5Al samples from poultry farm #2

Figure 2 – RNA fragment of the virus covering 452 base pairs

In the samples of poultry farm No. 2. – 2Al, 3Al, 4Al, 5Al HEV RNA was detected, in other samples RNA of this virus was absent.

Conclusion

Hepatitis E virus is associated with large liver and spleen syndrome (BLS), also called hepato-splenomegaly syndrome. It was first discovered in chickens in Australia in the 1980s. [1], in Europe it was registered in Italy and Hungary in 2004-2005. [14, 15]. In Poland, veterinarians observed cases of BLS in 2007, although the first partial gene sequences of Polish HEV isolates were described and presented in GenBank in 2010 [16].

According to X. J. Meng, H. L. Shivoprosad [17], subclinical forms of avian HEV predominantly affect adult layers, broilers and farm workers, with egg production decreasing to 20% per week and mortality increasing to 1%; the pathogen is also isolated from healthy hens [18].

In addition to other factors (e.g., the immune status of birds), genetic differences between HEV isolates may account for their varying degrees of pathogenicity and infective dose [19].

Enlarged liver and spleen, subcapsular hemorrhages in the liver, and bloody fluid in the visceral cavity found in our study are typical pathological lesions in HEV. Thus, the pathoanatomical and histological changes described above, as well as the results of PCR analysis of the organs of sick chickens, indicate the presence of avian HEV in farms in the territory of the Republic of Kazakhstan.

Funding

This study is funded by the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant no. AP08053014).

References:

- 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, 2003: 1184-1186 (doi: 10.1016/S0378-1135(99)00067-X).
- 2 Shivaprasad 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.
- 3 Peralta B., Biarnes M., Ordonez G., Porta R., Martin M., Mateu E., Pina 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 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.010).

- 4 Irza V. , Sprygin A. Big liver and spleen syndrome is a new viral disease in Russian chicken flocks // *Agricultural Biology*, 2012, 4: 73-77 (<http://www.agrobiology.ru/4-2012irza-eng.html>).
- 5 Morrow C.J., Samu G., Matrai E., K1ausz A., 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 (doi: 10.1080/03079450802356946).
- 6 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G. Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2005, 4: 303-305.
- 7 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.
- 8 Marek A., Bilic L, Prokofieva L, Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes. *Vet. Microbiol.*, 2010, 145: 54-61 (doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014).
- 9 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 Aug 16; Vol.68(1-2). P.119-25.
- 10 Agunos A.C. Avian hepatitis E virus in an outbreak of hepatitis-splenomegaly syndrome and fatty liver haemorrhage syndrome in two flaxseed-fed layer flocks in Ontario / A.C.Agunos, D.Yoo, S.A.Youssef, D.Ran, B.Binnington, D.B.Hunter. *Avian Patology*. 2006. V.35. № 5: 404-412.
- 11 Kravchinskij K. Gepatit E. K.Kravchinskij. *Gepatologiya*. 1993. 17: 932-941.
- 12 S. Halgimbaeva S.M., Kobegenova S.S., Nurshin K.A. «Mikrotehnika negizeri». *Almaty*. 2007: 19.
- 13 Kudryavcev A.A., Kudryavceva L.A. Okraska mazkov po Romanovskomu. V kn. *Klinicheskaya gematologiya zhivotnyh*. M.Kolos. 1974, S.69-70.
- 14 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G., Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy. *J Anim Sci*. 2005; Vol.4. P.303–305.
- 15 Morrow CJ, Samu G, Matrai E, Klausz A, Wood AM, 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. Vol. 37: 527-535. doi: 10.1080/03079450802356946.
- 16 Marek A., Bilic I., Prokofieva I., Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes. *Vet Microbiol*. 2010; Vol. 145, P.54-61. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014.
- 17 Meng X.J., Shivaprasad H.L. Avian Hepatitis E Virus Infections. In D.E. Swayne (Ed.). *Diseases of Poultry* 2013: 494-512.
- 18 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. *Journal of General Virology*. 2004. Vol. 85. P.693-700. 10.1099/vir.0.19582-0
- 19 Billam P., Sun Z.F., Meng X.J. Analysis of the complete genomic sequence of an apparently avirulent strain of avian hepatitis E virus (avian HEV) identified major genetic differences compared with the prototype pathogenic strain of avian HEV. *Journal of General Virology*, May 2007. Vol. 88 P.1538-1544. 10.1099. vir.0.82754-0