

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

Красков Дмитрий Андреевич

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ И РАЗРАБОТКА
СПОСОБОВ ДИАГНОСТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ЭНТЕРИТА ИНДЕЕК

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор, академик РАН
Джавадов Эдуард Джавадович

Санкт-Петербург, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	14
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Геморрагический энтерит индеек, история возникновения, распространение в мире и наносимый экономический ущерб.....	14
1.2 Биологические свойства вируса геморрагического энтерита индеек.....	17
1.2.1 Классификация вируса.....	17
1.2.2 Морфология, химический состав и физико-химические свойства вируса	17
1.2.3 Репликация вируса	20
1.3 Эпизоотология, патогенез и клинические признаки геморрагического энтерита индеек.....	22
1.3.1 Эпизоотология	22
1.3.2 Патогенез.....	23
1.3.3 Клинические признаки	26
1.4 Патологоморфологические изменения	27
1.4.1 Макроскопические поражения	27
1.4.2 Микроскопические поражения	28
1.5 Лабораторная и дифференциальная диагностика.....	29
1.6 Общая и специфическая профилактика, лечение	33
1.6.1 Общая профилактика	33
1.6.2 Специфическая профилактика.....	34
1.6.3 Лечение.....	38
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41

2.1 Материалы и методы исследований.....	41
2.1.1 Изучение биологических свойств вируса	42
2.1.1.1 Изучение концентрации вируса.....	42
2.1.1.2 Макроскопические изменения	43
2.1.1.3 Микроскопические изменения.....	43
2.1.1.4 Материнский иммунитет	44
2.1.2 Разработка реакции диффузионной преципитации и реакции латекс-агглютинации для серологической диагностики геморрагического энтерита индеек	45
2.1.2.1 Подготовка компонентов для серологических реакций	45
2.1.2.2 Разработка серологического способа диагностики: реакция диффузионной преципитации	47
2.1.2.3 Разработка серологического способа диагностики:	48
реакция латекс-агглютинации.....	48
2.1.3 Подбор праймеров, реакционной смеси и температурно-временного режима этапов амплификации полимеразной-цепной реакции в классическом варианте для молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек	54
2.1.4 Математическая и статистическая обработка результатов.....	55
2.2 Результаты собственных исследований.....	55
2.2.1 Исследование макроскопических изменений	55
2.2.2 Исследование микроскопических изменений	61
2.2.3 Концентрации вируса в органах-мишенях при заражении индейки в различном возрасте	67
2.2.4 Концентрации вируса в органах-мишенях в различные дни после заражения	67

2.2.5 Определение периода полураспада материнских антитела к вирусу геморрагического энтерита индекса	68
2.2.6 Разработка серологических способов диагностики.....	69
2.2.6.1 Реакция диффузионной преципитации	69
2.2.6.2 Реакция латекс-агглютинации	75
2.2.7 Подбор праймеров, реакционной смеси и температурно-временного режима этапов амплификации полимеразной-цепной реакции в классическом варианте.....	80
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	85
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	93
6 ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	94
БЛАГОДАРНОСТЬ.....	95
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97
ПРИЛОЖЕНИЯ	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Развитие индейководческой промышленности в Российской Федерации имеет позитивную тенденцию. Так в 2025 году было произведено около 455 тыс. тонн продукции, что на 17 тыс. тонн больше, чем в 2024 году и на 33 тыс. тонн больше, чем в 2023 году. По мнению экспертов объём индейководческой продукции к 2030 году составит около 650 тыс.тонн [22,23,27].

Положительная динамика развития индейководства в России связана со многими полезными свойствами мяса птицы (диетическое, с низким уровнем холестерина, содержит полезные макро- и микроэлементы, является гипоаллергенным) [11].

Также в РФ появились свои племенные индейководческие птицефабрики с нарастающим темпом производства инкубационного яйца, что значительно повышает независимость России от других стран [13]. На сегодняшний день обеспечением инкубационным яйцом индейки в нашей стране занимаются следующие племенные птицефабрики (показатели на 2023 год):

- 1) Морозовская – 2305251 штук яиц;
- 2) Индюшкин двор (ГК ДАМАТЕ) – 10562479 штук яиц;
- 3) Племенная индейка (ГК ДАМАТЕ) – 4305541 штук яиц [26].

Благодаря расширению тенденции к увеличению количества птицефабрик (в том числе индейководческих), что уверенно идет к прогрессу в отрасли, а также наращивание производства для экспорта, индейководческая промышленность в Российской Федерации имеет стремительные темпы роста [18].

К сожалению, расширение этой отрасли приводит к повышению рисков возникновения инфекционных болезней [7].

Наиболее актуальным для промышленного индейководства является профилактика опасных болезней (список МЭБ) - ньюкаслской болезни (НБ), гриппа птиц (ГП), инфекционного энцефаломиеелита птиц (ИЭМ), респираторного микоплазмоза вызываемого *Mycoplasma gallisepticum* (MG). В этот список также входит одна из самых экономически значимых болезней индеек – геморрагического энтерита индеек (ГЭИ).

Ряд таких вирусов, как вирус геморрагического энтерита индеек (ВГЭИ), астровирус индеек 2-го типа (АВИ-2), коронавирус индеек (КВИ), а также бактериальные возбудители, такие как *Salmonella spp.* и *Lawsonia intracellularis* вызывают кишечные заболевания у индеек в связи с чем происходит ухудшение конверсии корма и уменьшение прироста массы тела, что и влияет на экономические показатели птицефабрики [94, 95, 101, 147].

Геморрагический энтерит индеек (ГЭИ) — это экономически значимое острое желудочно-кишечное заболевание, вызываемое вирулентными штаммами аденовируса группы II. Чаще всего острая инфекция наблюдается у индеек старше 4 недель. Она вызывает угнетение, повреждение кишечника и кровотечения, за которыми следует гибель инфицированных птиц [111].

Повсеместно распространённый ВГЭИ обладает иммуносупрессивным действием и, следовательно, может вызывать вторичные бактериальные инфекции у поражённых индеек. Клиническая картина заболевания обычно сохраняется в стаде в течение 7–10 дней, а летальность может продолжаться ещё 2–3 недели в случае наложения секундарной микрофлоры [54].

Было установлено, что ГЭИ тесно связан с другими представителями II группы аденовирусов, такими как вирус мраморной селезенки фазанов (ВМСФ) и вирус гепато- спленомегалии кур (ВГСК). Кроме того, изоляты ВМСФ, поражающие фазанов, могут инфицировать индеек, а изоляты ГЭИ, поражающие индеек, могут инфицировать фазанов, что свидетельствует об их близком родстве [111]. Что касается ГЭИ, было высказано предположение, что птицы в возрасте 2–4 недель обычно устойчивы к инфекции, однако птицы могут заразиться, если уровень материнских антител находится на низком уровне, а вирусная нагрузка в окружающей среде высока [126].

За последние несколько десятилетий произошла череда событий, которые способствовали изучению ВГЭИ. Способы диагностики ГЭИ перешли от традиционных методов к молекулярным, обладающим более высокой чувствительностью и специфичностью [54].

К сожалению, на данный момент в Российской Федерации мало изучены биологические свойства патогенных штаммов ВГЭИ, циркулирующих на птицефабриках, а также практически нет разработанных отечественных способов серологической и молекулярно-биологической диагностики [8,13,24]. Именно поэтому изучение биологических свойств ВГЭИ, циркулирующего в России, и разработка нами его способов диагностики является актуальной и приоритетной задачей для отечественной ветеринарной науки в отрасли индейководства.

Степень разработанности темы. Диагностика геморрагического энтерита индеек (ГЭИ) проводится на основании сочетания клинических признаков, гистологических поражений и выявления вирусного антигена и антител серологическими и молекулярными методами. При изучении биологических свойств и для диагностических целей лучшим источником ВГЭИ является либо содержимое кишечника или образцы из селезенки [73]. Для выделения и накопления ВГЭИ используют лимфобластоидную линию В-клеток индюшиного происхождения (MDTC-RP19), которая была создана: «USDA Regional Poultry Research Laboratory», в 1982 году. Если клеточная линия недоступна, вирус можно культивировать в 4-6-недельных индюшатах путем инокуляции кишечного содержимого кишечника или селезенки перорально или внутривенно. Для обнаружения вируса используется тест преципитации в агаровом геле и микродиффузионные тесты, с помощью которых образец ткани селезенки осаждается сыворотками с наличием антител к вирусу ГЭИ [56, 57, 111]. Аналогичным образом, присутствие вирусного антигена в тканях может быть определено с помощью иммунофлуоресценции или иммунопероксидазного метода. К сожалению, в Российской Федерации, нет ни одного отечественного серологического метода диагностики, кроме иммуноферментного набора разработанного компанией «Вектор Бест». Тем не менее, ряд зарубежных научных учреждений проводят исследования (ICAR-Indian Veterinary Research Institute, Veterinary College and Research Institute, Avian Viral Diseases Programme Compton Laboratory, Berkshire , UK).

Цель и задачи исследований. Целью исследования стало изучение биологических свойств возбудителя и разработка способов диагностики геморрагического энтерита индеек. В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать макро- и микроскопические изменения в органах мишенях, вызванных репликацией вируса.
2. Определить концентрации вируса в органах-мишенях при заражении индейки в разном возрасте и различные дни после заражения.
3. Изучить период полураспада материнских антител к вирусу геморрагического энтерита индеек.
4. Разработать реакции диффузионной преципитации и латекс-агглютинации для серологической диагностики геморрагического энтерита индеек.
5. Подобрать праймеры, реакционную смесь и температурно-временной режим этапов амплификации полимеразной-цепной реакции в классическом варианте для молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек.

Научная новизна работы. Впервые в Российской Федерации изучены биологические свойства возбудителя и разработаны способы диагностики ГЭИ.

Разработаны и апробированы реакции диффузионной преципитации и латекс-агглютинации для серологической диагностики ГЭИ с целью выявления вируса в патологическом материале и антител в сыворотки крови.

Разработаны и синтезированы праймеры и этапы амплификации, которые апробированы в классическом варианте ПЦР для молекулярно-биологической диагностики ГЭИ.

Научная новизна работы подтверждена справкой о депонировании штамма вируса геморрагического энтерита индеек «ДК-24», семейства *Adenoviridae*, рода *Siadenovirus* №110 и патентом на изобретение RU №2853352 – Штамм вируса геморрагического энтерита индеек «ДК-24», зарегистрированный в Государственном реестре РФ 23 декабря 2025 г.

А также двумя зарегистрированными базами данных RU №2025622616 (база данных способов серологической диагностики геморрагического энтерита индеек с помощью реакции диффузной преципитации (включая авторский)) и RU № 2026622485 (способы молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек с помощью полимеразной цепной реакции (включая авторский)).

Теоретическая и практическая значимость. Учитывая рост народонаселения, глобальная птицеводческая промышленность имеет важное значение для обеспечения достаточного количества продовольствия в будущем. Иммунодепрессивные болезни оказывает выраженное негативное воздействие на показатели сохранности поголовья птиц, что обуславливает значительный экономический ущерб и представляет потенциальную угрозу для национальной продовольственной безопасности. В этиологии ряда инфекционных патологий индеек ведущую роль играют вирусы, индуцирующие иммунодефицит, среди которых одним из наиболее значимых выступает ВГЭИ. В связи с этим совершенствование методов профилактики и контроля иммуносупрессивных болезней является приоритетной задачей для промышленного птицеводства. Наиболее важным из данных методов является знание биологических свойств возбудителя и своевременная диагностика болезни. В промышленном птицеводстве России практически нет современных знаний о ВГЭИ, а также есть только один метод диагностики — это ИФА набор компании Вектор-бест. Который обладает как рядом преимуществ, так и рядом недостатков по сравнению с наборами, разработанными нами. Поэтому изучение биологических свойств возбудителя, а также разработка качественных диагностических наборов для диагностики геморрагического энтерита индеек и их применение на птицефабриках имеет как фундаментальное, так и большое прикладное значение.

Проведенные исследования были поддержаны грантом Российского научного фонда №24-26-20116 «Разработка отечественных серологических тест-систем для диагностики иммунодепрессивных болезней птиц».

Получена справка о депонировании штамма вируса геморрагического энтерита индеек «DK-24», семейства Adenoviridae, рода *Siadenovirus* №110

(коллекции штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБНУ «ФЦТРБ – ВНИВИ») для производства диагностикумов, инактивированных и рекомбинантных вакцин, выделенный Джавадовым Э.Д. и Красковым Д.А.

Получен патент на изобретение RU №2853352 – Штамм вируса геморрагического энтерита индеек «DK-24», зарегистрированный в Государственном реестре РФ 23 декабря 2025 г.

Зарегистрировано две базы данных: RU №2025622616 - «База данных способов серологической диагностики геморрагического энтерита индеек с помощью реакции диффузной преципитации (включая авторский)», зарегистрированная в Государственном реестре РФ 18 июня 2025 г. и RU № 2026622485 – «Способы молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек с помощью полимеразной цепной реакции (включая авторский)», зарегистрированная в Государственном реестре РФ 01 июня 2026 г.

Получена справка о внедрение результатов диссертационного исследования в образовательную программу ФГБОУ ВО СПбГУВМ, что демонстрирует актуальность и значимость данных исследований.

Методология и методы исследований. В работе использовали методологические принципы, учитывающие условия изучения биологических свойств и разработки лабораторных способов диагностики возбудителей инфекционных болезней птиц

В работе использованы следующие методы исследований: аналитический, эпизоотологический, клинический, патологоанатомический, серологический, молекулярно-биологический, вирусологический и статистический.

Объектом исследования служили индюшата кросса «БИГ-6» (тяжелый кросс), которые подвергались заражению для дальнейшего исследования биологических свойств возбудителя. Предметом являлся штамм ВГЭИ «DK-24», который был использован для изучения биологических свойств, а также для создания лабораторных способов диагностики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее восприимчивый возраст к заражению у индеек кросса «БИГ-6» к штамму «ДК-24» ГЭИ составляет 28-35 дней.
2. Пик концентрации ВГЭИ в органах мишенях выявлен на 5,5 день после заражения.
3. При заражении ВГЭИ (штамм «ДК-24») у индейки выявлены характерные изменения в органах-мишенях (селезенка, клоакальная сумка, двенадцатиперстная кишка), а также в печени и тимусе на макро- и микроскопическом уровне.
4. Период полураспада материнских антител к ВГЭИ соответствует в среднем 2,5 дням, а плато материнских антител сохраняется на протяжении 3 дней.
5. Разработанная и апробированная реакция диффузионной преципитации для серологической диагностики ГЭИ выявляет ВГЭИ в патологическом материале и антитела в сыворотке крови.
6. Разработанная и апробированная реакция латекс-агглютинации для серологической диагностики ГЭИ выявляет ВГЭИ в патологическом материале.
7. Подобранные праймеры, реакционная смесь и температурно-временной режим этапов амплификации для классического варианта ПЦР позволяет детектировать ДНК ВГЭИ в исследуемом патологическом материале.

Степень достоверности и апробация результатов. Научные положения и выводы обоснованы и базируются на аналитических и экспериментальных данных (300 голов индеек кросса «БИГ-6»).

Выводы и предложения основаны на научных исследованиях, проведенных с использованием современных методов анализа и расчёта. Статистическая обработка цифровых показателей проведена с использованием программ Microsoft Excel 2016. Достоверность различий оценивали с применением t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Материалы исследований научной работы были представлены: на 78-ой международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2024; 79-ой международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2025; международно-

практической конференции «Ветеринария в АПК» Новосибирск, 2024; национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, 2024 год; первой международной конференции «Один пояс, один путь». Провинция Шэньси, КНР, 2024; международно-практической конференции «Ветеринария в АПК» Новосибирск, 2025; национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, 2026 год; 80-ой международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2026.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором в период с 2023 по 2026 гг. Личный вклад автора состоит в постановке цели и определении задач, а также непосредственном участии во всех проводимых экспериментах, анализе и интерпретации полученных результатов, получении патента и базы данных, написании статей, диссертации и автореферата. Часть исследований и публикаций проведены и написаны в соавторстве. Соавторы научных публикаций не возражают против использования в диссертации материалов совместных исследований. Личный вклад соискателя в проведенных исследованиях и их анализ составляет 80%.

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 6 работ в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 3 публикации – в материалах научных и научно-практических конференций, 2 работы опубликованы в сборнике научных трудов, 2 работы – в журналах, входящих в РИНЦ. Получен 1 патент и 2 зарегистрированных базы данных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных: пункты 4, 5, 7, 19.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка

использованной литературы и приложений. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 31 рисунками. Список литературы включает 149 источников, в том числе 116 зарубежных.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Геморрагический энтерит индеек, история возникновения, распространение в мире и наносимый экономический ущерб

Геморрагический энтерит индеек впервые был выявлен в 1936 году в Миннесоте (США), а потом описан в 1937 году учеными Pomeroy B.S. and Fenstermacher R. [114]. Болезнь была особенно распространена как на закрытых, так и на открытых фермах по разведению индеек и имела тенденцию повторяться в одних и тех же местах [55]. Gale C., and Wyne J.W., сообщили о похожей вспышке в стае индеек в штате Огайо, США, в 1957 году [67]. В обоих случаях возбудитель не был выявлен. В 1967 году Gross W.B. and Moore W.E., установили, что этиологический агент, вызывающий геморрагическую энтеропатию, проходит через фильтр с размером пор 0,22 микрона [73]. В 1974 году Carlson H. et al., обнаружили аденоподобные вирусные частицы в тканях больных птиц и установили этиологию заболевания [47]. С тех пор вспышки ГЭИ регистрировались в различных странах мира, где выращивали индеек, например в Соединённых Штатах Америки и Канаде [79], Великобритании [37, 91], Германии [35], Австралии [135], Японии [66] и в Италии [53].

Первое подтвержденное задокументированное заболевание, вызванное ВГЭИ, было выявлено в Европе, а именно в Польше, в 1987 году, сначала у индеек в возрасте 12 недель, а затем у индеек в возрасте 16 недель [139]. В 1998 году Pitcovski J. et al. успешно секвенировали полный геном высоковирулентного полевого изолята, полученного в Израиле [112]. Заболевание также было зафиксировано у кур, при этом наблюдались спленомегалия и значительные иммунодепрессивные признаки [53,60]. Fasina S.O. and Fabricant J., сообщили об заражении суспензионных культур клеток селезенки вирусом, но не смогли его реплицировать [63]. В Испании ГЭИ впервые описан ученым Gomez-Villamandos J.C. et al. в 1994 году [71].

В 2022 году Gerber P.F., et al. провели исследования в Австралии. Целями этого исследования были определение степени заражения ГЭИ в коммерческих стадах в Австралии и изучение разнообразия австралийских штаммов ГЭИ. В настоящее время в Австралии не существует вакцины против данной болезни. Хотя предполагается, что субклинические инфекции ГЭИ имеют место и могут быть связаны с ростом колибактериоза в стадах австралийских коммерческих индеек, распространенность заражения этим вирусом в стране в значительной степени неизвестна. Образцы сыворотки и селезенки были взяты у индеек-производителей, а сыворотка - у индюшат-производителей у двух крупнейших компаний-интеграторами птицеводства в Австралии. Из образцов индейки 727/849 (86%) сывороток были положительными на антитела к ГЭИ методом ИФА. ДНК ГЭИ была обнаружена в 215/278 (77%) образцах селезенки методом ПЦР. Секвенирование полного генома трёх полевых изолятов ГЭИ показало, что австралийские штаммы очень похожи и образуют отдельную кластерную группу от штаммов из других географических регионов, хотя несколько точечных мутаций совпадают со штаммами вируса ГЭИ, которые считаются вирулентными [69].

В настоящее время ГЭИ с яркой клинической формой наблюдается редко, но есть подозрение, что циркулируют штаммы, которые вызывают скрытую иммунодепрессию [48,70]. Согласно отчету продовольственной и сельскохозяйственной Организации Объединённых Наций, основное внимание на ГЭИ уделяется в странах с самым высоким уровнем производства и потребления мяса индейки, таким как США, Канада и страны Европы. Данные о глобальной распространенности и эпизоотологии ВГЭИ по-прежнему малы, а по другим странам зачастую отсутствуют. Это связано с ограниченным количеством сообщений и документировании ГЭИ в странах с более низким уровнем производства и торговли мясом индейки [136].

Экономическая значимость этого заболевания обусловлена его потенциальным влиянием на уровень смертности. Хотя средний уровень смертности составляет от 5 до 15 %. Даже такой процент смертности может нанести значительный экономический ущерб индейководческим хозяйствам. Однако в

зависимости от вирулентности штамма уровень смертности может достигать до 60 % [43]. Кроме того, в полевых условиях иммуносупрессия, вызванная явной или бессимптомной инфекцией ГЭИ, может проявляться в виде слабого иммунного ответа на проведенную вакцинацию или повышенной заболеваемости и смертности от болезней, вызванных другими патогенами. Финансовые потери, связанные с ГЭИ в США, по имеющимся данным, превысили 3 миллиона долларов в год до разработки вакцины. Убытки, связанные с колибактериозом, оценивались в 40 миллионов долларов в год. В настоящее время, благодаря повсеместной вакцинации, вспышки ГЭИ происходят редко и, как правило, связаны с проведением некачественной вакцинации [55].

Было установлено, что ГЭИ имеет высокую степень родства с другими представителями группы II аденовирусов птиц, такими как вирус мраморной селезенки фазанов (ВМСФ), и вирус спленомегалии кур [111]. Кроме того, изоляты вируса мраморной селезенки фазанов могут заражать индеек, а изоляты ГЭИ могут заражать фазанов, что подтверждает их близкое родство. В связи с этим, экономическая опасность ВГЭИ повышается, так как могут возникнуть риски развития перекрестного заражения вирусами II группы аденовирусов, между индейками, фазанами и курами, что приведет к колоссальным экономическим потерям.

Кроме того, было установлено, что заражение вирусом ГЭИ предрасполагает птиц к заражению патогенными *E. coli* как в естественных условиях, так и в ходе экспериментальных исследований [70,105] и клостридиальными инфекциями [134]. Инфекция, вызванная ВГЭИ, также снижает эффективность вакцинации, поскольку было доказано, что при вакцинации против болезни Ньюкасла титры антител были низкими [97]. Аналогичным образом, было обнаружено, что птичий метапневмовирус, являющийся иммунодепрессивной респираторной болезнью индеек, снижает эффективность вакцин против ГЭИ [101]. Таким образом, из-за иммунодепрессивного эффекта ВГЭИ, для борьбы с вторичными инфекциями необходим хороший уровень антител против ГЭИ на протяжении всего репродуктивного цикла [50].

1.2 Биологические свойства вируса геморрагического энтерита индеек

1.2.1 Классификация вируса

Геном вирусов семейства *Adenoviridae* состоит из линейной двухцепочечной ДНК длиной от 25 до 48 kb (килобаз). Недавние исследования пролили свет на эволюцию аденовирусов и выявили шесть отдельных кластеров, соответствующих признанным родам: *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Ichtadenovirus* и *Testadenovirus* [42]. Классификация видов определяется такими факторами, как филогенез, организация генома и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов. А также проведения серотипирования с помощью тестов на перекрёстную нейтрализацию [142].

Вирус геморрагического энтерита индеек относится к роду *Siadenovirus*, семейства *Adenoviridae*. *Siadenovirus* – это род, включающий несколько видов, которые поражают птиц и рептилий. Была выдвинута гипотеза, что *Siadenovirus* впервые появился у земноводных, а затем эволюционировал в птичьих вирусы [117]. Номенклатура и классификация этих вирусов как *Siadenovirus* были основаны на заметном присутствии генов сиалидазы — отличительной особенности, которая выделяет их среди других родов семейства.

Среди многих видов индеечный *Siadenovirus* A (TadV-A) относится к типу TadV-3 и связан с возникновением нескольких болезней у различных видов птиц, в том числе с геморрагическим энтеритом у индеек [40].

1.2.2 Морфология, химический состав и физико-химические свойства вируса

Электронная микроскопия показала, что возбудитель ГЭИ представляет собой лишенный оболочки двухцепочечный ДНК-содержащий вирус икосаэдрической симметрии, диаметром 70–90 нм. Капсид в основном состоит из трёх основных структурных белков (гексона, пентона и фибриновых нитей) [54].

Вирионы одинакового размера состоят из 252 капсомеров. Вирус реплицируется в ядре и образует базофильные включения. Вирионы наблюдаются

в ядре клетки, в виде диффузного массива, а также в виде плотного кристаллического рисунка [47, 79, 84].

Кроме того, эксперименты по гибридизации и данные о последовательности генов дали возможность предположить, что он содержит линейную двухцепочечную ДНК длиной 26 тысяч пар оснований, что меньше, чем длина геномной ДНК других аденовирусов [102]. Геном состоит из восьми открытых рамок считывания (ОРС) в двух кластерах: один включает ОРС 1, 2, 3 и 4, а другой — ОРС 7 и 8 и по меньшей мере 13 генов, в том числе 52К, IIIa, Penton base, Pvi, Hexon, EP, 100K, Pviii, Fiber, Iva2, POL, Ptp и DBP. В геноме вируса ГЭИ очень низкое соотношение общего содержания гуанина и цитозина (34,93 %) по сравнению с другими аденовирусами [112]. Были идентифицированы гены пентона, гексона, фибриновых нитей, основных белков и полимеразы, а также показаны аминокислотные последовательности [112]. Недавние исследования показали, что ключевыми факторами, влияющими на вирулентность, являются гены ORF1, E3 и Fiber [82].

Например, белок, кодируемый ORF1, напоминает бактериальные сиалидазы — группу ферментов, которые расщепляют гликозидные связи нейраминовых кислот [130]. Эти белки могут выступать в качестве факторов вирулентности при микробных [39,148] и вирусных инфекциях [121,143]; они могут контролировать взаимодействие ВГЭИ с клеточными компонентами хозяина и, таким образом, влиять на патогенность и вирулентность [36]. Интересно, что продукт гена ORF1, сиалидаза, недавно был идентифицирован как структурный компонент вириона ГЭИ, что указывает на необходимость дальнейших исследований его потенциальной функции в вирионе [34,112]. Хотя ген E3 имеет минимальную гомологию последовательностей с другими аденовирусами, не относящимися к роду *Siadenovirus*, он, по-видимому, похож на белок E1A семейства *Mastadenoviridae* и может кодировать регулятор транскрипции, судя по богатым цистеином участкам, напоминающим цинк-связывающий домен CR3, присутствующий в E1A семейства *Mastadenoviridae* [87,112]. Характер экспрессии E3 указывает на возможную роль этого белка в жизненном цикле вируса, но его

функция до конца не изучена [112]. Предполагается, что не синонимичные мутации, обнаруженные в гене гексона, находятся в основании тримерного белка гексона, возможно, рядом с пентоном, практически не контактируя с организмом хозяина, и поэтому не имеют большого значения для антигенности или патогенности. Однако, согласно исследованиям HadV2 и HadV5, область под белком играет важную роль в Рh-зависимом конформационном изменении капсида внутри эндосомы, что приводит к проникновению через мембрану и высвобождению вирусного генома в цитоплазму [41,52,122,123].

Фибриновые нити участвуют в прикреплении к рецептору клетки хозяина и является единственным гликозилированным аденовирусным белком [87]. Таким образом, изменение аминокислотной последовательности может изменять гликозилирование белка, приводя к повышенной инфекционности или снижению нейтрализации вируса, таким образом изменяя вирулентность вируса. [87,131].

При антигенной характеристике ВГЭИ было обнаружено в общей сложности 11 полипептидов с молекулярной массой от 14 до 97 кДа. Для идентификации нейтрализующих эпитопов были выбраны моноклональные антитела (МА) против ГЭИ, и было обнаружено, что они реагируют с гексонным белком массой 97 кДа [99]. При проведении секвенирования 12 штаммов ГЭИ, выяснилось, что основная мутация происходит в гене белка ORF1 [41]. Более того, между вирулентным и авирулентным штаммами ГЭИ обнаружены различия примерно в двух аминокислотных последовательностях [128].

Кроме того, группой ученых в 1984 году во главе с Domermuth C.H. and Gross W.B., были изучены физико-химические свойства ВГЭИ. Поскольку у вируса нет оболочки, вирионы способны выдерживать широкий диапазон температур и условий окружающей среды. Вирус остается живым в течение 6 месяцев при температуре 4 °C и в течение 4 лет при температуре –20 °C [59]. Вирус устойчив к хлороформу, четвертичным аммониевым соединениям, этиловому эфиру и хлориду бензалкония [56,59].

Инфицирующая способность вируса разрушается при воздействии высокой температуры (70°C) в течение 1 часа; или при обработке гипохлоритом натрия, 1%-

ным раствором лаурилсульфата натрия или 1%-ным раствором лизола, после надлежащего удаления всего органического материала [111].

1.2.3 Репликация вируса

Вирус ГЭИ взаимодействует с восприимчивыми рецепторами клеток-хозяев и проникает в них с помощью механизма рецептор-опосредованного эндоцитоза. Вирус использует определённые аминокислотные мотивы, присутствующие в основе белков пентонов и фибриновых нитей. После проникновения вируса происходит его высвобождение из оболочки и попадание в цитозоль клетки. Вирусные протеазы активируются при перемещении вирусного нуклеокапсида в ядро клетки-хозяина [38,72]. Затем происходит активация механизмов транскрипции клетки-хозяина и экспрессия основных генов для инициации кинетики репликации. На первом этапе происходит взаимодействие вирусных белков с клеточными факторами транскрипции [109,127], а затем с белками, ответственными за репликацию вирусного генома, такими как вирусная ДНК-полимераза, претерминальный белок и ДНК-связывающий белок [64]. Активация транскрипции Iva2 способствует запуску главного позднего промотора, и таким образом Iva2 опосредует инфекцию [88,106]. Затем происходит транскрипция поздних генов из главного позднего промотора посредством альтернативного сплайсинга одной полицистронной Mrnk, что приводит к накоплению продуктов поздних генов, содержащих структурные белки и запускает сборку дочерних вирионов. Кроме того, Iva2 обеспечивает упаковку за счёт связывания с целевыми последовательностями генома и специфическими белками, необходимыми для сборки [104,107]. Следовательно, вирионы начинают накапливаться в ядре инфицированной клетки, и в конце концов зрелые вирионы разрушают инфицированную клетку и высвобождаются.

Gerber P.F et al. (2018) провели серии исследований с целью оптимизации размножения вируса геморрагического энтерита на курах, свободных от специфических патогенов. В общей сложности 562 курам свободных от

специфических патогенов перорально ввели австралийский авирулентный изолят ГЭИ индюшиного происхождения в возрасте 9, 14, 21 или 28 дней в дозе 5, 6, 7 или 8 lg, а 102 курицы служили в качестве неинфицированного контроля. У инфицированных цыплят не наблюдалось клинических признаков. Наблюдалось зависящее от дозы инокулята увеличение относительной массы селезенки и печени ($P < 0,01$). Относительная масса селезенки через 7 дней после инокуляции вирусом ГЭИ была на 85% выше у цыплят, которым инокулировали 6-7 lg по сравнению с контрольной группой, без дальнейшего увеличения при более высоких дозах. Относительная масса печени увеличилась до 14% у цыплят, инокулированных 6 lg, без дальнейшего увеличения. Птицы, инокулированные дозой 7 lg, имели большее количество ГЭИ-ДНК-позитивных птиц (от 77% до 86%), чем птицы, инокулированные более низкими дозами (от 33% до 59%; $P < 0,01$). Наиболее эффективной дозой для размножения живыми пассажами было 7 lg, инокулированных птицам в возрасте от 9 до 14 дней, что обеспечивало уровень инфицирования 81%. Печень и селезенка инфицированных птиц, получивших все дозы, были обработаны для получения предполагаемой вакцины, при подсчете титра вируса из этого материала среднее значение составило 8,6 log₁₀ на птицу. Таким образом, ВГЭИ индюшиного происхождения может легко распространяться среди кур, не контактировавших с заражёнными птицами [68].

Hossain M. F. с группой ученых в 2019 году проводили исследования по изучению возможности размножения и титрования вируса ГЭИ на куриных эмбрионах. Было использовано 308 эмбрионов. На 10-й день развития эмбрион заражали в аллантоисную полость необработанным (живым) ВГЭЭ и обработанным (инактивированным) ВГЭИ, а также была создана группа в качестве отрицательного контроля. Аллантоисную жидкость, полученную через 1, 3, 5 и 7 дней после заражения, проверяли на наличие вируса с помощью количественной ПЦР. Инокуляция вирусом не привела к видимым нарушениям роста или повреждениям куриных эмбрионов. В целом не было выявлено различий в уровне смертности после заражения между группами, с отрицательным контролем (6/30, 20,0 %), заражения живым вирусом (34/252, 13,4 %) и заражение

инактивированным вирусом (3/26, 6,9 %). Количество ДНК ГЭИ, обнаруженное в аллантоисной жидкости на 7-й день после инокуляции в яйцах, заражённых живым вирусом, было сопоставимо с дозой инокуляции, что указывает на неэффективность репликации вируса в куриных эмбрионах. Через 3 дня после инокуляции в яйцах, заражённых инактивированным вирусом, ДНК ГЭИ не обнаруживалась. Инокуляция куриных эмбрионов в сочетании с качественной ПЦР может использоваться для титрования вируса ГЭИ и демонстрирует высокую корреляцию с *in vivo* титрованием с использованием кур. Этот метод может быть полезен в странах, где недоступны индюшата, свободные от специфических патогенов, и где не разрешён ввоз клеток MDTC-RP19 — единственной культуры клеток, поддерживающей эффективную репликацию вируса ГЭИ [76].

1.3 Эпизоотология, патогенез и клинические признаки геморрагического энтерита индеек

1.3.1 Эпизоотология

Геморрагический энтерит индеек — экономически значимая, иммунодепрессивная, высококонтагиозная, острая желудочно-кишечная болезнь, вызываемое вирусом из семейства *Adenoviridae*, род *Siadenovirus*. Чаще всего острая инфекция наблюдается у индеек старше 4 недельного возраста и вызывает угнетение, поражение кишечника и кровотечения, за которыми следует гибель инфицированных птиц [81, 15]. Повсеместно распространённый ВГЭИ обладает иммуносупрессивным действием и, следовательно, может вызывать вторичные бактериальные инфекции у зараженных птиц [1,111,132,149].

Естественными носителями вируса ГЭИ являются индейки, но серологические исследования также показали его наличие у кур, выращиваемых на коммерческих фермах [2]. Кроме того, он может заражать других курообразных птиц, таких как павлины, калифорнийские перепела и кеклики [2]. Отсутствие вертикальной передачи является уникальной особенностью ГЭИ и отличает его от

других аденовирусов, таких как вирус синдрома снижения яйценоскости и аденовирус домашней птицы из 1 группы.

ВГЭИ передается от инфицированных птиц восприимчивому поголовью при перемещении помета содержащего вируса или подстилочного материала (фекально-оральный путь передачи). Вирус попадает в организм хозяина через рот. Кроме того, если вирус не высыхает, он может оставаться заразным в течение семи недель в трупах или помете [111]. Последние данные свидетельствуют о том, что выздоровевшие птицы могут быть источником постоянного заражения поголовья в результате скрытого выделения вируса [82]. Устойчивость вируса к воздействию окружающей среды доказана, так как ВГЭИ можно легко выделить из заражённого помёта. Этот фактор делает возможным повторное возникновение болезни в птичниках.

1.3.2 Патогенез

Вирус геморрагического энтерита индеек попадает в желудочно-кишечный тракт алиментарным путём, из кишечника попадает в кровоток, что приводит к первичной виремии.

Затем вирус транспортируется в бурсу и селезёнку, которые являются основными мишенями для репликации. Считается, что ВГЭИ вызывает лимфоцитопению, при этом основной мишенью являются В-лимфоциты. Поражения, вызванные вирусом, в основном связаны с иммунными нарушениями.

Болезнь наносит экономический ущерб в основном из-за иммуносупрессии, вызванной вирусом, а также из-за вторичной бактериальной инфекции, которая может привести к дополнительным производственным потерям в течение следующих 2–3 недель даже после того, как клинические проявления болезни исчезают [111, 117, 124]. Сообщалось, что для заражения индеек вирусом необходима неповреждённая Фабрициуса сумка [61]. Также была высказана гипотеза о роли макрофагов в поддержании репликации вируса. После заражения вирус может реплицироваться в В-лимфоцитах, расположенных в кишечнике и

бурсе, или может попасть непосредственно в селезёнку через периферическую кровь [111], заражая большее количество макрофагов, В-клеток и эффективно размножаясь. Это приводит к притоку макрофагов и CD4⁺-Т-клеток в белую пульпу, что в результате приводит к гиперплазии белой пульпы в попытке избавиться от вируса.

Высокий уровень ВГЭИ может быть обнаружен в бурсе в период от 2 до 7 дней после заражения (ДПЗ) и в желудочно-кишечном тракте в период от 4 до 7 ДПЗ и сохраняется до 15 ДПЗ. Однако вирус может быть впервые обнаружен в селезенке на 2 ДПЗ, а пиковый уровень достигается на 6 ДПЗ [78], и селезенка остается основным местом репликации. Кроме того, ВГЭИ способен вызывать апоптоз в клетках селезёнки на 3–4-й день после заражения, во время усиленной репликации вируса. Это предположение было сделано на основании выделения IL-6-подобных цитокинов в селезёнке, наблюдаемых в условиях *in vitro* [118].

Активация макрофагов ВГЭИ приводит к выработке таких цитокинов, как IL6, TNF и интерферона I и II типа (IFN). Интерферон II типа стимулирует выработку азотистой кислоты, которая обладает противовирусными и иммуносупрессивными свойствами. Кроме того, вырабатывается интерферон I типа, который ограничивает репликацию вируса. Апоптоз и некроз клеток-мишеней приводят к истощению В-лимфоцитов, несущих IgM. Эта последовательность событий приводит к преходящей иммуносупрессии во время клинической фазы инфекции, вызванной ВГЭИ [118]. После спленомегалии и виремии в собственной пластинке слизистой оболочки тонкого кишечника обнаруживается большое количество ВГЭИ, что приводит к застою в кишечнике и кровотечениям. Было высказано предположение, что начало кишечной патологии при ВГЭИ связано с высвобождением простагландинов и гистаминов из увеличенного количества тучных клеток, а также с иммуноопосредованными реакциями [117]. Проточно-цитометрический анализ выявил увеличение субпопуляций Т- и В-клеток, а также субпопуляции CD3⁺CD4⁺ Т-клеток у индеек, инфицированных вирусом. Напротив, субпопуляции CD3⁺CD8a⁺ Т-клеток и IgM В-клеток были уменьшены [85].

Ossa J.E. et al. проводили эксперименты по спленэктомии у индеек. Они удаляли селезенку у 5 недельных индеек и позже после их восстановления заражали внутривенно вирусом ГЭИ. Ни одна из индеек, которым удалили селезенку, не умерла и не получила серьёзных повреждений в результате заражения вирусом геморрагического энтерита, в то время как одна из индеек, в группе которым не удаляли селезенку, заразилась и умерла, а у 62 % индеек при вскрытии были обнаружены повреждения кишечника.

В сыворотке крови индеек, которым удалили селезенку и которые были заражены ВГЭИ, через 20 дней после заражения были обнаружены антитела к вирусу. У этих индеек не было выявлено никаких клинических признаков в течение экспериментального периода, при вскрытии не было обнаружено повреждений кишечника, а на момент заражения в сыворотке крови не было обнаружено антител к ВГЭИ [103].

Кишечное кровотечение возникает в результате диапедеза без повреждения сосудов и, по-видимому, инициируется реакцией на медиаторы воспаления. Кроме того, было установлено, что ВГЭИ сначала реплицируется в лимфоидных клетках кишечного тракта, затем в брыжейке и, наконец, в печени. Затем в селезенке и, далее, широко распространяется по организму [85]. В острой фазе заболевания в селезенке и крови происходит истощение клеток, несущих IgM [124].

Иммуносупрессия, вызванная вирусом у индеек, обусловлена исключительно воздействием вируса на В-лимфоциты. Этот вирус оказывает иммуносупрессивное действие на оба типа иммунных реакций, что приводит к нарушению выработки антител, а также к нарушению фагоцитоза макрофагами [7].

Было доказано, что ГЭИ поражает макрофаги, что приводит к снижению их функциональных возможностей, поскольку они могут подвергаться некрозу и апоптозу, что нарушает их антигенпрезентирующую функцию. В качестве доказательства нарушения функции макрофагов исследование показало, что на пике инфекции макрофаги селезенки индеек, заражённых ВГЭИ, не вырабатывали оксид азота после стимуляции *ex vivo* липополисахаридом [110]. Обширные исследования различных вирусов птиц и млекопитающих предполагают, что оксид

азота служит механизмом защиты организма хозяина на 16-й день после заражения и играет ключевую роль в уничтожении инфицированных клеток, тем самым предотвращая распространение инфекционных агентов [120]. У инфицированных птиц сниженная способность макрофагов вырабатывать оптимальные уровни оксида азота – основной линии защиты от вторичных инфекций – может повышать восприимчивость к бактериальным и другим вирусным инфекциям.

Наряду с этим, нарушение целостности интестинального барьера способствует системной транслокации условно-патогенной микрофлоры, в частности *Escherichia coli*, что инициирует развитие колисептицемии.

1.3.3 Клинические признаки

Fadly A.M. et al. считают что ГЭИ обычно возникает у птиц в возрасте 6–11 недель, а молодняк в возрасте до 3–4 недель считается невосприимчивым к инфекции, что может быть связано с наличием материнских антител, которые могут сохраняться примерно до 6-недельного возраста [62]. Однако Kaboudi K., в своей статье пишет, что «этот вирус в первую очередь поражает индеек в возрасте от 4 до 11 недель, при этом пик заболеваемости приходится на возраст от 7 до 9 недель» [83]. Мы считаем, что индюшата становятся восприимчивы с 4–6-недельного возраста, в более редких случаях заражение происходит на 2-й неделе жизни (при условии низкого титра материнских антител и высокой концентрации вируса в окружающей среде) [7].

При ГЭИ смертность наступает примерно через 5-6 дней после заражения высоковирулентными изолятами, а если инфицированная птица выживает, клинические признаки обычно проходят в течение 6-10 дней после первого появления помета с примесью крови. В полевых условиях смертность от ГЭИ обычно составляет от 10% до 15%. В зависимости от вирулентности штамма смертность может достигать 60%. Интересно, что при первой встрече популяции с этим вирусом уровень смертности, как правило, очень высок. Но со временем его вирулентные свойства при вторичных вспышках снижаются [96]. При

экспериментальном заражение смертность достигает 80% [111]. Основными клиническими проявлениями ГЭИ являются угнетённое состояние, наличие крови в помёте и, как следствие, летальный исход. Кровь может часто наблюдаться на коже и перьях вокруг клоаки у мёртвых или инфицированных птиц. Снижение уровня глюкозы, альбумина и общего белка в крови также может наблюдаться при данной болезни [100].

Птицы, пережившие острую фазу инфекции, приобретают иммунодефицит, который проявляется в виде возникновения вторичных инфекций (колибактериоз, микоплазмоз, бордетеллёз, клостридиальные инфекции, кокцидиоз и т.д.). Таким образом, второй пик смертности накладывается на первый и часто продолжается в течение 2–4 недель [70].

1.4 Патологоморфологические изменения

1.4.1 Макроскопические поражения

Большинство видимых патологоморфологических изменений локализуется в селезенке и кишечнике. Увеличенная селезёнка с мраморной или пятнистой поверхностью является характерным признаком ГЭИ [51,111]. В некоторых случаях она бывает анемичной и уменьшенной в размерах, а иногда сильно переполнена кровью и может иметь пурпурный оттенок и сероватые некротические очаги. Умеренная и выраженная спленомегалия обычно связана с гипертрофией белой пульпы [79].

Кишечник, может быть, заметно растянут и наполнен кровью [47]. Смерть обычно наступает в результате массивного кровотечения из желудочно-кишечного тракта, составляющего примерно 60–70 % от общего объёма крови птицы. Слизистая оболочка кишечника гиперемирована, содержит петехиальные кровоизлияния, а у некоторых птиц также наблюдаются желтоватые фиброзно-некротические мембраны [73]. В исследовании, проведённом Itakura C. et al. задокументирована успешная экспериментальная передача инфекции индюкам. Авторы сравнили тяжесть инфекции у индеек, заразившихся естественным путём,

а также предоставили подробный отчёт о последующих клинических проявлениях и патологических изменениях, наблюдаемых у инфицированных индеек. Через 3 дня после инокуляции, в тонком кишечнике была отмечена лёгкая гиперемия. С 5-го по 9-й день после заражения в тонком кишечнике наблюдалось вздутие, лёгкая гиперемия и увеличение количества слизи. Множественные кровоизлияния в передней части тонкого кишечника были обнаружены только у одной птицы из 23 на 5-й день после заражения. Кроме того, в период с 10-го по 16-й день после заражения была выявлена лёгкая форма хронического энтерита. В тяжёлых случаях поражения кишечника были более выражены в области двенадцатиперстной кишки и распространялись на слепую кишку, вызывая серьёзное поражение этого анатомического сегмента [79].

В лёгких может наблюдаться застой крови, в то время как другие органы часто являются анемичными. Как и селезёнка, печень поражённых птиц может увеличиваться в размерах. Помимо этих поражений, в мышечных тканях могут наблюдаться петехиальные кровоизлияния.

Утолщение стенок двенадцатиперстной кишки, лёгкий катаральный энтерит и гипертрофированная пятнистая селезёнка могут сохраняться у выживших птиц в течение нескольких недель, что часто обнаруживается при убое [47, 79].

1.4.2 Микроскопические поражения

Характерные гистопатологические изменения, связанные с вирусом ГЭИ, наиболее заметно проявляются в иммунной и желудочно-кишечной системах [55]. Аномалии селезенки часто включают гиперплазию белой пульпы и лимфоидный некроз. Кроме того, отличительные базофильные внутриядерные включения телец Каудри типа В, могут быть обнаружены в мононуклеарных клетках, особенно в макрофагах и лимфоцитах [55]. Вокруг белой пульпы и покрытых эндотелием артерий наблюдается заметное увеличение количества крупных мононуклеарных клеток и плазматических клеток на разных стадиях развития. Наиболее примечательной особенностью является наличие клеток с ядрами,

напоминающими раздутые шарики. Эти ядра могут иметь бледно-розовый или почти бесцветный цвет, а хроматин в них может быть расположен эксцентрично [47]. Вирус-положительные клетки постоянно обнаруживаются в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, но не в эпителиальных клетках слизистой оболочки. Следовательно, было выдвинуто предположение, что дегенерация и отторжение эпителиальных клеток кишечника вызваны не прямым воздействием вируса, а скорее явлением, опосредованным иммунной системой [117]. Появление поражений кишечника после инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки тонкого кишечника лимфоретикулярными или лимфоидными клетками подтверждает гипотезу о том, что иммунные клетки могут играть роль в патогенезе геморрагического энтерита [78,117]. Активированные Т-клетки могут играть ключевую роль в возникновении поражений кишечника при геморрагическом энтерите и приводить к геморрагическому шоку у индеек.

В тимусе и сумке Фабрициуса лимфоидное истощение можно заметить как в кортикальной, так и в медуллярной областях. Кроме того, внутриядерные включения были обнаружены в печени, лёгких, поджелудочной железе, головном мозге и эпителии почечных канальцев [54].

Для лучшей визуализации вирусов в тканях и клеточных культурах использовалась электронная микроскопия [35]. Электронная микроскопия полевых образцов выявила многочисленные поражённые клетки с несколькими вирусными частицами, рассеянными внутри ядер спленоцитов и энтероцитов. Сообщалось о трёх формах распределения вирусных частиц: рассеянные вирусные частицы по всему ядру, волокнистые включения в перинуклеарной области и крупные внутриядерные и перинуклеарные скопления вирусных частиц [47].

1.5 Лабораторная и дифференциальная диагностика

Диагноз на ГЭИ требует комплексного подхода, базирующегося на оценке клинической картины, анализе макроморфологических и патогистологических изменений, а также детекции специфических вирусных антигенов или антител с

применением методов серологического и молекулярно-биологического скрининга. Для выделения ВГЭИ можно использовать линию лимфобластоидных В-клеток индейки (MDTC-RP19). Если клеточная линия недоступна, то в качестве биологической модели можно использовать в 6-недельных индеек путем заражения их содержимым кишечника или супернатантом селезенки от исследуемой павшей птицы пероральным или внутривенным способом. Смерть обычно наступает примерно через три дня после внутривенной инъекции и через пять-шесть дней после заражения пероральным способом. У выживших птиц на 6 день после заражения наблюдается выраженная спленомегалия. Наличие ГЭИ подтверждено с помощью двойного иммунодиффузионного теста из материала селезенки. Для выявления вируса обычно используют реакцию преципитации в агаровом геле и микродиффузионные тесты, при которых образцы гомогената тканей селезенки образуют преципитат с антисывороткой против ВГЭИ [57,111]. Кроме того, наличие вируса в тканях можно определить с помощью методов иммунофлуоресценции или иммунопероксидазы. Был разработан метод иммуногистохимического окрашивания для выявления ВГЭИ с использованием смеси моноклональных антител против ВГЭИ и стрептавидин-биотиновой системы [65]. Кроме того, с помощью моноклональных антител можно дифференцировать различные аденовирусы второй группы [140]. Помимо этих методов, для выявления антител к ВГЭИ были разработаны высокочувствительные иммуноферментные анализы (ИФА), в которых в качестве антигена для покрытия планшета используются инфицированные вирусом клетки MDTC-RP19 [98]. Было обнаружено, что ИФА на основе рекомбинантного гексонового белка (N-концевой) является экономически эффективным и чувствительным методом для выявления специфических антител к ВГЭИ в сыворотках крови индейки [89].

Недавно благодаря доступности данных о полной последовательности генома стало возможным разработать молекулярно-биологические способы диагностики ВГЭИ, такие как классический ПЦР и ПЦР в реальном времени для выявления вирусной ДНК в образцах ткани селезенки [39, 74]. ПЦР более чувствительна, чем иммунодиффузия в агаровом геле, при диагностике инфекции,

вызванной ВГЭИ, в случаях, когда патологические изменения были незначительными и содержания вируса в органах-мишенях, может быть, незначительное [105]. Кроме того, ДНК аденовирусов второй группы, таких как вирус болезни мраморной селезенки фазанов или вирус спленомагии у кур, можно различить с помощью различных эндонуклеаз рестрикции, таких как Bgl II, EcoR I, Hind III, Nha I и Xho I. Для быстрого выявления этого вируса в тканях поражённых индеек были разработаны высокочувствительные и специфичные тесты, такие как количественная ПЦР в реальном времени на основе Taq man зонда с использованием гена белка гексона для выявления и количественной оценки вируса энтерита индеек [125]. Этот тест может быть очень полезен при изучении патогенеза, различных стадий вирусной инфекции у птиц, а также в эпизоотологических целях. Такие методы полезны в случае вспышек заболеваний, когда требуется обработать большое количество образцов за короткий промежуток времени [54].

Quaglia G., et al. показали, что анализ последовательности 3'-области гена ORF1 является ценным методом для характеристики штаммов ВГЭИ на молекулярном уровне и для различения вакцинных и полевых штаммов [116]. В исследовании было проанализировано в общей сложности 80 образцов, ранее подтверждённых как положительные на ВГЭИ, с помощью секвенирования и филогенетических методов. В анализе использовался новый набор ПЦР-праймеров, нацеленных на определённую область генома, включающую частичные последовательности генов ORF1, *hyd* и частичные последовательности гена IVa2. Кроме того, в анализе использовалась коммерческая живая вакцина Dindoral. Восемь штаммов ВГЭИ, выделенных в Италии, имели три различные мутации в 3'-секции гена ORF1. Эти мутации не были обнаружены в штамме вакцины Dindoral, что позволяет предположить, что этот диагностический способ следует регулярно использовать для совершенствования стратегий контроля и обеспечения точности диагностики [116].

В 2011 году Юшков Ю.Г., с группой ученых подали заявку на патент под названием: «Способ выявления специфических антител к вирусу геморрагического

энтерита индеек». Суть способа состояла в исследовании биоматериала от птицы, в реакции непрямой гемагглютинации, где в качестве эритроцитарного диагностикума используют эритроциты кролика с осажденным на них антигеном вируса геморрагического энтерита индеек, а для регулировки скорости оседания эритроцитов используют гранулы декстрана размерами от 200 до 500 мкм. Задачей заявляемого решения является расширение арсенала диагностических методов для выявления специфических антител к ВГЭИ. Поставленная задача решается тем, что предложен способ выявления специфических антител к вирусу геморрагического энтерита индеек в сыворотке крови или плазме крови птицы с использованием реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), отличающийся тем, что при приготовлении эритроцитарного диагностикума для РНГА необходимо использовать эритроциты кролика, с осажденным на них антигеном ВГЭИ, а при постановке реакции – указанный эритроцитарный диагностикум, 96-луночные микропланшеты с V-образным дном и гранулы декстрана размерами от 200 до 500 мкм. В случае положительной реакции в толще гранул сефадекса формируется зонтик, в случае отрицательной реакции эритроциты с иммобилизованным на них вирусным антигеном беспрепятственно просачиваются между гранулами и оседают на дне V-образных лунок в виде пуговицы [19].

В 2025 году Красков Д.А., вместе с группой ученых разработал экспресс-способ выявления ВГЭИ из супернатанта патологического материала с при помощи реакции латекс-агглютинации (РЛА) [25].

ГЭИ следует дифференцировать от различных бактериальных болезней, таких как *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *E. Coli*, *Salmonella sp.* и вирусных болезней, таких как высокопатогенный грипп птиц и Ньюкаслская болезнь, которые вызывают схожие поражения селезенки и желудочно-кишечного тракта. Увеличение селезенки и крапчатость при отсутствии признаков мраморной болезни селезенки у фазанов или птичьей аденовирусной спленоmegалии должны вызывать гистопатологическую оценку на предмет опухолевых заболеваний, таких как болезнь Марека, лимфоидный лейкоз или ретикулоэндотелиоз [16,54,139]. Также ГЭИ следует дифференцировать от паразитарных инвазий, вызываемыми

различными видами *Eimeria* (кокцидиоз). Несмотря на то, что диагностические тесты разрабатываются для выявления отдельных вирусных или бактериальных агентов, было бы крайне полезно рассмотреть возможность проведения мультиплексных тестов для дифференциальной диагностики ГЭИ и других вторичных бактериальных или вирусных инфекций [54].

1.6 Общая и специфическая профилактика, лечение

1.6.1 Общая профилактика

Для эффективной профилактики ГЭИ необходимо соблюдать меры биобезопасности, такие как тщательная физическая очистка, дезинфекция, обеспечение хорошей вентиляции и обеззараживание оборудования для кормления [115]. Это крайне важно, поскольку основным способом передачи вируса от одной группы к другой является помет или окружающая среда. Необходимо внедрить эффективную систему обращения с пометом, чтобы максимально снизить выбросы аммиака и образование пыли. Помет должен быть полностью убран, а при заселении каждой новой партии птицы должен быть уложен свежий подстилочный слой, чтобы обеспечить более чистую среду. На всех объектах должны строго соблюдаться задокументированные правила биобезопасности. Количество посетителей должно быть сведено к минимуму; весь персонал должен быть в чистой верхней одежде и обуви. На племенных и коммерческих фермах рекомендуется устанавливать душевые кабины. Внедрение комплексной системы борьбы с вредителями, включающей эффективную программу по борьбе с грызунами и насекомыми, позволит свести к минимуму механическую передачу ГЭИ [33,54]. Добавление в стартовые корма витамина Е, витамина С, селена и цинка повысит иммунитет молодняка. Если в конкретном птичнике обнаружена инфекция, его необходимо тщательно очистить и продезинфицировать гипохлоритом натрия или фенольными соединениями, а затем полностью высушить в течение 7 дней при температуре 25 °С. Однако в коммерческих хозяйствах, где содержатся птицы разных возрастных групп, полностью избавиться

от ВГЭИ сложно, и в таких случаях наиболее эффективным способом профилактики инфекции остаётся вакцинация [54].

1.6.2 Специфическая профилактика

Для эффективной профилактики ГЭИ, крайне важно реализовывать планы биобезопасности, включающие тщательное соблюдение мероприятий по общей и специфической профилактике [54]. К сожалению, в России нет своих вакцин против данной болезни, из-за чего ветеринарным специалистам приходится использовать импортные вакцины.

Для специфической профилактики за рубежом на данный момент применяют 3 живых и 1 инактивированную вакцину:

1. «Dindoral» (Boehringer-Ingelheim, Франция). Вакцина против геморрагического энтерита индеек и мраморной болезни селезенки фазанов живая лиофилизированная. Представляет собой лиофилизированную массу, изготовленную из суспензии селезенок СПФ-индеек 6-недельного возраста, инфицированных аттенуированным аденовирусом птиц 2-й группы с добавлением растворимого обезжиренного молока и глутамата натрия в качестве наполнителей. Иммунный ответ формируется на 7-й день после введения вакцины, сохраняется в течение 7 месяцев и обеспечивает выработку специфических ИФА-антител в положительных титрах не менее чем у 90 % привитых птиц. Индюшат-бройлеров вакцинируют в возрасте 4 недель, фазанов — в возрасте 8 недель. Вакцинируют птиц методом выпаивания с питьевой водой.[10].

2. H.E. VAC (ARKO, США). Данная вакцина содержит в своем составе живой авирулентный аттенуированный в культуре лимфобластов аденовирус фазанов второго типа. Вызывает стимуляцию иммунного ответа против геморрагического энтерита у однократно привитых птиц через 14 суток и сохраняется в течение 12 месяцев. Продукты убоя можно использовать через 21 день после вакцинации. Индюшат вакцинируют однократно в возрасте 28–30 суток энтерально с питьевой водой. Ревакцинацию проводят один раз в год [3].

3. ADENOMUNE II (CEVA, Франция). Вакцина живая лиофилизированная против геморрагического энтерита индеек. Рекомендована для вакцинации здоровых индюков начиная с 5-недельного возраста. Применяют эту вакцину методом выпаивания с питьевой водой. За 48 часов до вакцинации следует прекратить подачу птице любых ветеринарных препаратов с водой; в течение 24 часов после вакцинации ветеринарные препараты также не даются [49].

4. Virsin 228 (BIOVAC, Израиль). Инактивированная вакцина против болезни Ньюкасла и ГЭИ. Приготовлена из инактивированного вируса болезни Ньюкасла птиц штамм "VN" и ВГЭИ штамм «Израильский». По внешнему виду препарат представляет собой однородную эмульсию белого цвета. При хранении допускается отслоение масла в верхней части флакона. При встряхивании однородность эмульсии восстанавливается. Вакцинации подлежит клинически здоровая птица. За одну прививную дозу принимают 0.5 мл препарата. Вакцину вводят подкожно в нижнюю треть шеи (между крыльями). За 6-9 часов до применения вакцину достают из холодильной камеры, тщательно встряхивают и ставят в помещение с температурой 20-28°C. Запрещается нагревание вакцины в водяной бане и на приборах отопления. Вакцину используют в течение 2 часов после вскрытия флакона [4].

Однако кроме данных вакцин, есть еще 3 живых вакцины, которые в основном применяются в Северной Америки и не имеют широкого распространения на Европейском континенте:

1. Hemorrhagic enteritis vaccine, live virus (Hygieia, США). Эта живая вакцина против ГЭИ изготовлена с использованием штамма птичьего аденовируса 2-го типа, полученного методом культивирования вируса в культуре клеток. Применяется с выпойкой в возрасте от 5 недель и старше.

2. Oralvax-HE (MSD АН, США). Это живая вирусная вакцина, содержащая авирулентный птичий аденовирус II типа индюшиного происхождения. Вирус реплицируется в клеточной линии MDTC RP-19, затем подвергается сублимационной сушке. Эффективен для вакцинации здоровых индеек с помощью выпойки в возрасте от 6 недель.

3. PRO'TECT™ HE (Brinton, США). Это живая вирусная вакцина. Вирус реплицируется в клеточной линии MDTC RP-19. Применяется с выпойкой для индеек, начиная с 22 дня жизни [137].

По нашему мнению, лучше всего использовать инактивированную вакцину при данной болезни, не смотря на явное увеличение экономических затрат. Однако в мире существует всего одна зарегистрированная инактивированная вакцина против ГЭИ, что приводит к тому, что необходимо разрабатывать отечественную инактивированную вакцину [28].

Протоколы вакцинации разрабатываются с учетом возрастной восприимчивости к штаммам ГЭИ, поскольку материнские антитела могут взаимодействовать с вакцинным вирусом. Поэтому крайне важно вакцинировать молодняк против ГЭИ после снижения титров материнских антител, но до контакта с вирулентными полевыми штаммами. Вакцинированные стада, у которых наблюдается 60-процентная или более высокая сероконверсия с помощью вакцинации, полностью защищены. Вторую вакцинацию проводят через неделю после первой вакцинации в стадах с низкой сероконверсией, особенно при использовании вакцин на основе клеточных культур. Наличие иммуносупрессивных агентов, таких как ацикловир [50], или остаточных дезинфицирующих средств в трубопроводе снижает эффективность вакцинации.

Оптимальное время для применения живых вакцин против ГЭИ — примерно 28 день жизни. Однако наличие антител, полученных от матери, может снизить эффективность вакцины, что приведет к недостаточной защите поголовья. Живые вакцины против ВГЭИ могут оказывать иммуносупрессивное действие, способствуя развитию вторичных бактериальных инфекций [75].

К дополнительным факторам, которые могут снизить эффективность вакцинации, относится наличие иммуносупрессивных инфекционных агентов, препятствующих выработке иммунитета после вакцинации [129]. Экспериментальное заражение индеек метапневмовирусом также приводит к снижению эффективности вакцинации [50].

Также кроме зарегистрированных вакцин, в мире разрабатывается экспериментальные вакцины нового поколения. В некоторых странах вакцины были разработаны путем размножения авирулентного штамма ГЭИ в лейкоцитах периферической крови [10]. Эти живые вакцины можно вводить методом *in ovo* на 18–19-й день инкубации (в амниотическую жидкость или в сам эмбрион) или же выпаивать с питьевой водой птицам 3–6-й недели жизни.

Кроме того, с использованием достижений генной инженерии разрабатываются новые вакцины для профилактики ГЭИ. К таким вакцинам относятся субъединичные вакцины на основе рекомбинантного гексонового белка или рекомбинантные вирусные вакцины на основе вируса оспы птиц, экспрессирующие нативный гексон вируса энтерита [45]. Преимущество таких усовершенствованных вакцин в том, что они не вызывают даже малейшего иммуносупрессивного эффекта по сравнению с обычными вакцинами на основе тканевых культур [111]. Однако при разработке субъединичных вакцин на основе рекомбинантного гексонового белка необходимо учитывать, что разработанный белок не должен денатурировать и должен сохранять свою нативную структуру, чтобы обеспечить желаемый результат [140]. Кроме того, при разработке вакцин на основе вирусных векторов гексону требуется свёртываемый белок массой 100 кДа, чтобы сохранять свою нативную форму. Следовательно, рекомбинантная конструкция ВГЭИ должна коэкспрессировать гексон массой 100 кДа, чтобы обеспечить наилучший гуморальный ответ у птиц [46]. Также была разработана субъединичная вакцина на основе капсидного белка (белка-шипа) ВГЭИ, экспрессируемого в кишечной палочке. Испытания вакцины на основе этого рекомбинантного белка показали достаточную защиту от заражения вирусом, что позволяет использовать белок-шип для создания безопасной и эффективной вакцины против ВГЭИ [113].

К лимитирующим факторам применения рекомбинантных вакцин относится невозможность обеспечения абсолютной протекции против широкого спектра циркулирующих полевых изолятов вируса. Подавляющее большинство субъединичных вакцинных препаратов не приспособлено для пероральной

аппликации и проведения массовой иммунизации поголовья птиц. Кроме того, объективные затруднения в стандартизации оптимальной прививной дозы потенцируют риск индукции недостаточного уровня напряженности протективного иммунитета по отношению к вирулентным штамма.

1.6.3 Лечение

В основном при ГЭИ лечение не проводится, так как оно является экономически необоснованным, а также малоуспешным.

Однако, для получения пассивной защиты можно вводить антисыворотку, полученную от доноров реконвалесцентов [111]. Вирус нейтрализующие антитела против нескольких эпитопов гексонового белка HEV способны обеспечивать пассивную защиту, а в высокой дозе могут предотвращать развитие клинических признаков, снижая репликацию вируса в клетках.

Также в 2022 году Tykałowski B, и Konecki A, провели серию экспериментов, где синтетический иммуномодулятор (20% раствор метизопринола) вводили самкам индеек кросса «Биг-6» в дозе 200 мг/кг массы тела с питьевой водой: первой группе за 3 дня до заражения, второй группе в течение 5 дней после заражения и третьей группе за 3 дня до, в день заражения и в течение 5 дней после экспериментального заражения индеек вирусом ГЭИ. А другим птицам давали природной иммуномодулятор, препарат «Alphamune G» также давали самкам индеек кросса «Биг-6» в дозе 500 г/тонну корма: первой группе за 14 дней до заражения, второй группе в течение 5 дней после заражения и 3 групп за 14 дней до заражения, в день заражения и в течение 5 дней после заражения. Их влияние оценивали по синтезу гамма-интерферона (IFN- γ) CD4⁺ и CD8 α ⁺ Т-клетками селезёнки в ответ на стимуляцию митогенами *in vitro*. Образцы были взяты через 3, 5 и 7 дней после заражения и проанализированы с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов. Было показано, что метисопринол увеличивает количество CD4⁺IFN- γ ⁺ и CD8 α ⁺IFN- γ ⁺ Т-клеток у этих птиц по сравнению с количеством таких же клеток у индеек из контрольной группы.

Аналогичный эффект наблюдался у индеек, получавших натуральный иммуномодулятор. Учеными был сделан вывод, что оцененные иммуномодуляторы могут использоваться для ослабления иммуносупрессивного эффекта у индеек, инфицированных ВГЭИ [138].

В 2019 году Tukałowski B. et al. были проведены опыты по выяснению возможности дифференцировать влияние метионина на иммунный ответ индеек, инфицированных ВГЭИ, в зависимости от его уровня и источника. Метионин — одна из аминокислот, которая не только играет роль в питании, но и участвует в ключевых метаболических процессах и иммунном ответе, а также регулирует их [44,77,80,81,86,93]. В их исследовании птицы были распределены по четырём группам, которые различались по содержанию метионина (0,55 и 0,78 % в возрасте 1–4 недель и 0,45 и 0,65 % в возрасте 5–8 недель соответственно) и его источнику DL-метионин или гидроксианалог DL-метионина [141,145]. Некоторые исследования показали, что гидроксианалог DL-метионина более эффективно повышает уровень антиоксидантов в организме кур и индеек, чем DL-метионин [108,133, 144]. В результате ГЭИ увеличил процентное содержание CD4⁺ клеток и снизил процентное содержание IgM⁺ клеток в крови, селезёнке и слепых отростках индеек. Кроме того, он увеличил процентное содержание CD4⁺CD25⁺ клеток в крови и IL-6 в плазме. Более высокая доза метионина привела к значительному снижению процентного содержания субпопуляций CD4⁺, CD8⁺ и CD4⁺IL-6⁺ клеток в крови индеек, инфицированных вирусом ГЭИ, и у индеек, не инфицированных этим вирусом, а также к увеличению процентного содержания IgM⁺ В-клеток в селезёнке. У индеек, получавших корм с повышенным содержанием метионина, наблюдалось снижение уровня IL-6 в плазме и повышение уровня IgA в плазме. Результаты этого исследования показывают, что инфекция, вызванная ВГЭИ, ослабляет иммунную функцию индеек. Содержание метионина в корме оказывает умеренное влияние на иммунный ответ индеек, инфицированных данным вирусом. Источник этой аминокислоты, по-видимому, не так важен, как её доза, поскольку значения анализируемых параметров

существенно не различались. У неинфицированных индеек более высокий (на 40 % выше рекомендованного) уровень метионина в кормах положительно сказался на показателях гуморального иммунитета [139].

Антибиотики могут использоваться для лечения вторичных бактериальных инфекций. Выбор препарата должен основываться на профиле чувствительности местных кишечных палочек штаммов [54].

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследование проводилось в период с 2023 по 2026 гг. на базе кафедры эпизоотологии им. Урбана В.П., при научно-консультационном диагностическом центре по птицеводству Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. Тема диссертационной работы являлась составной частью научно-исследовательской работы по гранту, предоставленному Российским научным фондом № 24-26-20116 «Разработка отечественных серологических тест-систем для диагностики иммунодепрессивных болезней птиц».

Опыты *in vivo* были поставлены на индюшатах тяжелого кросса «БИГ-6» на базе вивария ФГБОУ ВО «СПбГУВМ».

Материалами для исследования послужили основные органы-мишени после заражения патогенным штаммом ВГЭИ «ДК-24» (клоакальная сумка, селезенка, двенадцатиперстная кишка), а также печень и тимус.

Исследования по изучению титров антител в сыворотке крови индеек и разработка серологических и молекулярно-биологических способов диагностики ГЭИ были проведены в научно-консультационном диагностическом центре по птицеводству. Серологический способ диагностики на примере реакции латекс-агглютинации частично был разработан в отделе вирусологии филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» – во «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства». Схемы и результаты исследований приведены в соответствующих разделах диссертации.

2.1.1 Изучение биологических свойств вируса

2.1.1.1 Изучение концентрации вируса

При изучении наиболее подходящего возраста для заражения вирусом геморрагического энтерита индеек патогенным штаммом «ДК-24» семейства *Adenoviridae* рода *Siadenovirus* №110 (коллекции штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБНУ «ФЦТРБ – ВНИВИ»), индеек кросса «БИГ-6» подвергали экспериментальному инфицированию алиментарным путем с введением 0,5 мл вирус-содержащего материала (ВСМ) на особь, а также по 0,1 мл интраназальным и интраорбитальным путем, изначальный титр ВСМ в РДП составлял 1:2. Было сформирована 5 групп по 10 голов в каждой: 1 группа – заражение происходило в 4-х недельном возрасте; 2 группа – в 5-ти недельном возрасте; 3 группа – в 6-ти недельном возрасте; 4 группа – в 7-ми недельном возрасте; 5 группа – контроль. Убой каждой группы индеек происходил на 5-6 день после заражения, так как по зарубежным литературным данным в этот период наибольшая концентрация вируса в органах-мишенях. В дальнейшем это было подтверждено нашими опытами. Контрольную группу забили вместе с 4-ой группой. После убоя отбирались селезенки как главный орган-мишень и подвергались гомогенизации с физиологическим раствором в соотношении 1:1. Было сформировано 5 проб, по 10 селезёнок в одной пробе. В дальнейшем полученный гомогенат трижды замораживали и оттаивали для разрушения клеток и наибольшего выхода вируса в буферную среду. После этого, откручивали гомогенат на центрифуге со скоростью 3000 оборотов в минуту, в течение 30 минут и отбирали надосадочную жидкость в новый флакон, после чего проводили РДП.

Для определения концентрации вирусного антигена ГЭИ в органах-мишенях (селезенка, клоакальная сумка, двенадцатиперстная кишка) в разные дни после введения ВГЭИ был проведен эксперимент на 80 индейках кросса «БИГ-6» 28-суточного возраста. Птица была разделена на две группы: подопытная (n=70), инфицированная штаммом «ДК-24» и контрольная (n=10). Оценку титров

вирусного антигена в исследуемых органах осуществляли при помощи РДП. Отбор патологического материала производили путем убоя 10 особей опытной группы на 2, 3, 4, 5, 6, 7, и 8 сутки после экспериментального заражения. Убой всей контрольной группы проводили одномоментно на 8-е сутки после заражения с целью подтверждения контаминации интактной группы. Из извлеченных органов делали гомогенат. В общей сложности было сформировано 8 объединенных проб (одна проба включала пул органов от 10 птиц соответствующей подгруппы). Полученный гомогенат подвергали трёхкратному циклу замораживания-оттаивания для разрушения клеток. Затем гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут. Полученный супернатант асептически переносили в стерильные емкости и в дальнейшем использовали для постановки РДП.

2.1.1.2 Макроскопические изменения

С целью оценки патологоанатомической картины в органах-мишенях (селезенка, клоакальная сумка, 12-перстная кишка, печень, тимус), которые в наибольшей степени подвержены патологическим изменениям вследствие репликации вируса, были отобраны 50 голов индеек кросса «БИГ-6» 28 дневного возраста. Птица была разделена на 2 группы: 1 группа – подопытная (n=40), инфицированная патогенным штаммом «DK-24» в возрасте 28 дней; 2 группа – контрольная (n=10). Все птицы были подвержены убою и последующему диагностическому вскрытию для изучения макроскопических изменений на 5,5 сутки (через 132 часа) после инфицирования (данный промежуток времени биологически обоснован достижением пиковых значений титра вируса в организме птицы).

2.1.1.3 Микроскопические изменения

Материалом для изучения микроскопических изменений являлись фрагменты клоакальной сумки, селезёнки, двенадцатиперстной кишки, тимуса и печени двух групп индеек 35-ти дневного возраста по 10 голов в каждой (1-я группа

– контрольная; 2-я группа – подопытная, зараженная штаммом ВГЭИ «ДК-24»). Заражение птицы опытной группы проводили в возрасте 29 дней алиментарно по 0,5 мл ВСМ, а также по 0,1 мл интраназально и интраорбитально, изначальный титр ВСМ в РДП составлял 1:2. Пробы органов отбирали на 5,5 день (через 132 часа) после заражения, так как это время является пиком репликации вируса в иммунокомпетентных органах. Фрагменты органов, размером 10,0 мм × 10,0 мм × 5,0 мм, были зафиксированы в нейтральном 10,0 %-ном формалине, в течение 10-ти суток. Далее органы промывали под проточной водой, а проводку и заливку осуществляли согласно стандартному протоколу. Срезы, толщиной 3,5 мкм, изготавливали на микротоме РОТМИК-2М. Окрашивали полученные препараты гематоксилином Джилла и 1,0 %-ным спиртовым эозином. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой камеры Levenhuk M500 BASE Camera на микроскопе Levenhuk MED Series при 40-, 100- и 400-кратном увеличении.

2.1.1.4 Материнский иммунитет

С целью оценки уровня напряженности материнского иммунитета и определения периода полураспада специфических антител к ВГЭИ была сформирована экспериментальная группа из 20 голов индеек кросса «БИГ-6» 2-х суточного возраста. Птица была разделена на две равные подгруппы (n=10), для которых была разработана схема отбора цельной крови с целью последующего выделения сыворотки крови. У птиц из 1 подгруппы - отбор крови осуществляли на 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 сутки жизни; у 2 подгруппы - 3,5,7,9,11,13,15 и 17 сутки жизни. Количественную оценку титров материнских антител к ВГЭИ в полученных образцах сыворотки крови проводили с помощью ИФА Бест-Вет АТ-HEV (геморрагический энтерит индеек).

2.1.2 Разработка реакции диффузионной преципитации и реакции латекс-агглютинации для серологической диагностики геморрагического энтерита индеек

2.1.2.1 Подготовка компонентов для серологических реакций

Для разработки компонентов использовался штамм «DK-24» вируса геморрагического энтерита индеек, живая вакцина против ГЭИ «Dindoral», агар Дифко, карбоксилированный латекс, буферные растворы и индейка тяжелого кросса «БИГ-6».

В ходе эксперимента птица содержалась в клеточных батареях "Практик-сетка" 2-12 "MultiPro". Плотность посадки составляла 5 особей на 1 клетку в начале эксперимента с последующим рассаживанием до 1 особи на клетку на завершающем этапе. Примененная схема размещения обеспечивала оптимальный доступ птицы к кормовой базе и воде, что способствовало увеличению итогового выхода сыворотки крови.

Получение специфических (положительных) и нормальных (отрицательных) антигенов, а также сывороток крови для серологических исследований осуществляли по следующим методикам:

1 – положительный инактивированный антиген – супернатант гомогената селезенки индейки 35-ти суточного возраста зараженной перорально в дозе 0,5 мл на голову, а также по 0,1 мл интраназально и интраорбитально, с титром вируса геморрагического энтерита индеек штамма «DK-24» в РДП 1:2. Гомогенат селезенки получали путем перетирания органов в ступке с пестиком с добавлением антибиотиков и изотонического раствора хлорида натрия в количестве равным весу селезенки. Надосадочную жидкость получали путем центрифугирования гомогената при 3000 об/мин в течение 30 минут. Инактивацию супернатанта проводили добавлением теотропина 0,3% от объема антигена, далее ставили флакон с супернатантом на сутки в термостат при температуре 37°C. В качестве консерванта добавляли мертиолят, до конечной концентрации 1:10000, 1 час

выдерживали при комнатной температуре и убирали в холодильную камеру. Визуально антиген представляет собой жидкость красного цвета (рис. 1).

2 - положительная сыворотка крови с антителами к ВГЭИ – получена от индеек, предварительно иммунизированных живой вакциной «Dindoral» (Merial, Франция). Первичную вакцинацию проводили в 28-суточном возрасте. Спустя 4 недели осуществляли ревакцинацию инактивированным вирусом, сорбированным на геле гидроокиси алюминия. Отбор крови (в объеме 5 мл) производили у 100 дневной птицы (через 5 недель после ревакцинации) с использованием вакуумных пробирок, содержащих активатор свертывания и разделительный гель. Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 минут, после чего отбирали сыворотку крови в микропробирки типа Эппендорф. Титр специфических антител контролировали методом иммуноферментного анализа с применением коммерческой тест системы «ИФА Бест-Вет АТ-HEV». Сыворотку крови консервировали мертиолятом до конечной концентрации 1:10000, 1 час выдерживали при комнатной температуре и убирали в холодильную камеру. Визуально сыворотка крови представляет собой жидкость светло-желтого цвета (рис. 1).

3 – отрицательный антиген – супернатант гомогената селезенки интактных индеек 35 суточного возраста. В качестве консерванта добавляли мертиолят, до конечной концентрации 1:10000, 1 час выдерживали при комнатной температуре и убирали в холодильную камеру. Отсутствие контаминации ВГЭИ достоверно подтверждалось методом классической полимеразной цепной реакции. Визуально отрицательный антиген представляет собой жидкость красного цвета (рис. 1).

4 – отрицательная сыворотка крови индейки – получена от клинически здоровых, не вакцинированных индеек по методике, аналогичной описанной в пункте 2. Сыворотку крови консервировали мертиолятом до конечной концентрации 1:10000, 1 час выдерживали при комнатной температуре и убирали в холодильную камеру. Отсутствие специфических антител к ВГЭИ подтверждали с применением коммерческой тест системы «ИФА Бест-Вет АТ-HEV». Визуально

отрицательная сыворотка представляет собой полупрозрачную жидкость светло-желтого цвета (рис. 1).

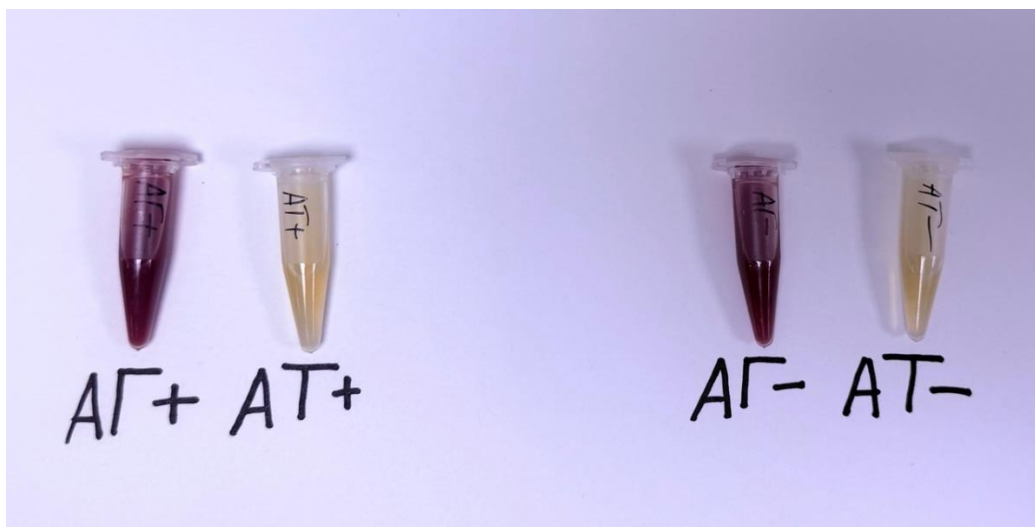


Рисунок 1 – Компоненты для серологических реакций

2.1.2.2 Разработка серологического способа диагностики: реакция диффузионной преципитации

Перед постановкой реакции и отработки её компонентов осуществляли приготовление стандартной агаровой среды для РДП. С этой целью брали 1 грамм агара «Дифко» (Becton Dickinson, США) и 8 грамм NaCl и добавляли 100 мл дистиллированной воды. Далее подвергали термической обработке путем троекратного доведения до кипения (допуская кратковременное поднятие пены) для обеспечения полного и гомогенного растворения агара в воде.

Готовый агар охлаждали до 55-60 °С и разливали в чашки Петри, формируя слой толщиной 5 мм, после чего оставляли до полного затвердевания геля. С целью создания влажной камеры и поддержания оптимального уровня влажности в чашки Петри помещали увлажненную вату. Формирование лунок в агаровом геле осуществляли с применением специализированного пробойника (рис. 2). Подготовленные таким образом чашки Петри с агаровым гелем использовали для дальнейшей работы.



Рисунок 2 – Пробойник для получения лунок в агаровом геле

Подготавливали компоненты реакции, которые нами были получены и титровали относительно друг друга путём последовательного двукратного разведения для определения титра в РДП и для дальнейшего подбора рабочей дозы.

2.1.2.3 Разработка серологического способа диагностики:

реакция латекс-агглютинации

В данные исследования входил анализ и подбор латекса, который имеет наибольшую адсорбирующую способность с антителами, для создания диагностикума РЛА на выявление вируса ГЭИ. Именно поэтому было создано 4 группы наборов РЛА с различными модификациями и размерами латексных микросфер, различными буферами для разведения и отмывки латексных микросфер, а также двумя видами глобулиновой фракции, полученной различными способами.

Виды получения глобулиновой фракции:

1) Очистка глобулинов в сыворотке крови индеек (иммунизированные живой вакциной «Dindoral» против ГЭИ, титр в иммуноферментном анализе - 1:17815) с помощью полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ 6000). Флакон с сывороткой крови индеек

объёмом 50 мл, поставленный на магнитную мешалку со скоростью 500 об/мин., капельно добавляли 40% раствор ПЭГ 6000, доводя его концентрацию в сыворотке крови до 13%. После этого ждали, когда ПЭГ 6000 полностью растворится в сыворотке крови и оставляли на сутки в холодильник. После этого полученную сыворотку крови с растворённым ПЭГ 6000 откручивали на центрифуге при 3000 об/мин в течение 30 минут. Полученный надосадок удаляли, и растворяли осадок в 10 мл физиологического раствора, тем самым получая концентрированную глобулиновую фракцию, которую в дальнейшем использовали для сорбции на латексных частицах.

2) Очистка глобулинов в сыворотке крови индеек с помощью сульфата аммония с последующим проведением диализа. Сначала был получен насыщенный раствор сульфата аммония, для этого в колбу с 200 мл дистиллированной воды, помещенной на магнитной мешалке со скоростью 400 об/мин., поэтапно добавляли 150 грамм сульфата аммония, помешивание происходило в течение 3 часов. Раствор считается насыщенным при просветлении надосадочной жидкости и выпадение частиц сульфата аммония на дно колбы. Далее к флакону с 50 мл сыворотки крови индеек, помещенной на магнитной мешалке со скоростью 300 об/мин капельно добавляли насыщенный раствор сульфата аммония в соотношение 1:1. Затем полученный раствор оставляли на 1 час и откручивали на центрифуге при 3000 об/мин в течение 30 минут. Полученный надосадок удаляли, а осадок растворили в 50 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). После этого добавляли насыщенный раствор сульфата аммония и проводили тот же самый процесс еще 2 раза. После 3-го откручивания осадок довели до 50 мл ФСБ.

Было отобрано 10 мл осажденной глобулиновой фракции с сульфатом аммония, затем полученный раствор подвергали диализу против физиологического раствора. Отобранные 10 мл вносили в диализный мешок M-Cel диаметр пор 14 kDa ширина 25 мм в жидком консерванте. Затем закрепленный диализный мешок помещали на 4/5 длины в стеклянную бутылку с 5 литрами физиологического раствора. Бутылка находилась на магнитной мешалке со скоростью вращения магнита 400 об/мин, для проведения равномерного диализа. Бутылку с

физиологическим раствором меняли трижды с интервалом 24 часа. После третьей смены физиологического раствора через 24 часа, освобожденная от сульфата аммония глобулиновая фракция к вирусу геморрагического энтерита индеек была отобрана в пробирку.

Группы наборов РЛА (во всех пунктах групп за исключением четвертой на латексные микросферы осаждали глобулиновую фракцию в различных разведениях: цельная фракция и разведения 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32):

1 группа. Для разведения и отмывания латексных микросфер использовался физиологический раствор (рН= 5,5):

1.1) Микросферы латексные 200 нм, COOH , 4%. К 2% латексным микросферам (разводили 4% латексные микросферы 1:1 с физиологическим раствором) добавляли очищенную глобулиновую фракцию полученную с помощью ПЭГ 6000 в соотношение 1:1. После этого раствор выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 45 минут, в дальнейшем проводили трехкратную отмывку препарата путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. После каждого цикла надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в свежем физиологическом растворе. По завершении заключительного этапа центрифугирования и удаления супернатанта, осадок разводили физиологическим раствором в эквивалентном объеме, доводя конечную концентрацию латексного диагностикума до 1%.

1.2) Микросферы латексные 400 нм, COOH , 4%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 1.1.

1.3) Микросферы латексные 200 нм, модифицированные стрепавидином 1%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 1.1, за исключением того, что концентрация латексных микросфер изначально была 1%, и в конце мы получили латексный диагностикум в концентрации 0,5%.

1.4) Микросферы латексные 200 нм, COOH , 4%. К 2% латексным микросферам (разводили 4% латексные микросферы 1:1 с физиологическим раствором) добавляли очищенную глобулиновую фракцию после диализа, полученную с помощью сульфата аммония в соотношении 1:1, после чего

выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 45 минут. в дальнейшем проводили трехкратную отмывку препарата путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. После каждого цикла надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в свежем физиологическом растворе. По завершению заключительного этапа центрифугирования и удаления супернатаната, осадок разводили физиологическим раствором в эквивалентном объеме, доводя конечную концентрацию латексного диагностикума до 1%.

1.5) Микросферы латексные 400 нм, COOH, 4%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 1.4.

1.6) Микросферы латексные 200 нм, модифицированные стрепавидином 1%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 1.4. За исключением того, концентрация латексных микросфер изначально была 1%, и в заключение был получен латексный диагностикум в концентрации 0,5%.

2 группа. Для разведения и отмывания латексных микросфер использовался ФСБ (pH=7,0):

2.1) Микросферы латексные 200 нм, COOH, 4%. К 2% латексным микросферам (разводили 4% латексные микросферы 1:1 с ФСБ) добавляли очищенную глобулиновую фракцию полученную с помощью ПЭГ 6000 в соотношении 1:1. После этого смесь выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 45 минут. В дальнейшем проводили трехкратную отмывку препарата путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. После каждого цикла надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в свежем ФСБ. По завершении заключительного этапа центрифугирования и удаления супернатаната, осадок разводили ФСБ в эквивалентном объеме, доводя конечную концентрацию латексного диагностикума до 1%.

2.2) Микросферы латексные 400 нм, COOH, 4%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 2.1.

2.3) Микросферы латексные 200 нм, модифицированные стрепавидином 1%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 2.1, за

исключением того, что концентрация латексных микросфер изначально была 1%, и в конце мы получили латексный диагностикум в концентрации 0,5%.

2.4) Микросферы латексные 200 нм, COOH , 4%. К 2% латексным микросферам (разводили 4% латексные микросферы 1:1 с ФСБ) добавляли очищенную глобулиновую фракцию после диализа, полученную с помощью сульфата аммония в соотношении 1:1, после чего выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 45 минут. В дальнейшем проводили трехкратную отмывку препарата путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. После каждого цикла надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в свежем ФСБ. По завершению заключительного этапа центрифугирования и удаления супернатанта, осадок разводили ФСБ в эквивалентном объеме, доводя конечную концентрацию латексного диагностикума до 1%.

2.5) Микросферы латексные 400 нм, COOH , 4%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 2.4.

2.6) Микросферы латексные 200 нм, модифицированные стрепавидином 1%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 2.4. За исключением того, что концентрация латексных микросфер изначально была 1%, и в заключение был получен латексный диагностикум в концентрации 0,5%.

3 группа. Для разведения и отмывания латексных микросфер использовался трис- HCl буфер (pH= 7,4):

3.1) Микросферы латексные 200 нм, COOH , 4%. К 2% латексным микросферам (разводили 4% латексные микросферы 1:1 с трис- HCl буфером) добавляли очищенную глобулиновую фракцию полученную с помощью ПЭГ 6000 в соотношение 1:1. После этого смесь выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 45 минут. В дальнейшем проводили трехкратную отмывку препарата путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. После каждого цикла надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в свежем трис- HCl буфере. По завершении заключительного этапа центрифугирования и удаления супернатанта, осадок разводили трис- HCl

буфером в эквивалентном объеме, доводя конечную концентрацию латексного диагностикума до 1%.

3.2) Микросферы латексные 400 нм, COOH, 4%. Осаждение глобулинов проводили аналогично, как и в пункте 3.1.

3.3) Микросферы латексные 200 нм, модифицированные стрепавидином 1%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 3.1, за исключением того, что концентрация латексных микросфер изначально была 1%, и в конце мы получили латексный диагностикум в концентрации 0,5%.

3.4) Микросферы латексные 200 нм, COOH, 4%. К 2% латексным микросферам (разводили 4% латексные микросферы 1:1 с трис-HCl буфером) добавляли очищенную глобулиновую фракцию после диализа, полученную с помощью сульфата аммония в соотношении 1:1, после чего выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 45 минут. В дальнейшем проводили трехкратную отмывку препарата путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. После каждого цикла надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в свежем трис-HCl буфере. По завершении заключительного этапа центрифугирования и удаления супернатанта, осадок разводили трис-HCl буфером в эквивалентном объеме, доводя конечную концентрацию латексного диагностикума до 1%.

3.5) Микросферы латексные 400 нм, COOH, 4%. Осаждение глобулинов проводили аналогично, как и в пункте 3.4.

3.6) Микросферы латексные 200 нм, модифицированные стрепавидином 1%. Осаждение глобулинов происходило аналогично, как и в пункте 3.4. За исключением того, концентрация латексных микросфер изначально была 1%, и в заключение был получен латексный диагностикум в концентрации 0,5%.

4 группа отрицательная. Был использован нативный карбоксилированный и стрепавидиновый латекс без сорбции на поверхности глобулиновой фракции.

Все 4 группы РЛА наборов подвергались проверке: на пластик наносился латексный диагностикум в объеме 50 мкл и к нему добавлялся супернатант

гомогената селезёнки индеек, зараженных ВГЭИ (наличие вируса в супернатанте подтверждено в РДП, титр 1:32, положительный контроль), а также наносилось 50 мкл латексного диагностикума с добавлением супернатанта гомогената селезёнок незараженных индеек (отсутствие вируса подтверждено с помощью ПЦР, отрицательный контроль). Перемешивали компоненты с помощью деревянного шпателя и ждали 10 минут для учета реакции.

2.1.3 Подбор праймеров, реакционной смеси и температурно-временного режима этапов амплификации полимеразной-цепной реакции в классическом варианте для молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек

В рамках подбора праймеров и этапов амплификации классической полимеразной цепной реакции был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 10 изолятов различных патогенных и вакцинных штаммов с целью поиска наиболее консервативного участка генома. В качестве оптимальной молекулярной мишени был выбран ген, кодирующий белок Нехоп, общая длина которого составляет 2721 пар нуклеотидов. К наименее вариабельному фрагменту данного гена протяженностью около 200 пар нуклеотидов были сконструированы следующие специфические олигонуклеотидные праймеры:

F5'-CTGGTTCAGCAGAAAGTTCTTC-3'

R5'-CAGTAGAGTCATAAGCAАСТАТ-3'

Синтез праймеров был заказан в компании «Евроген». После чего были подобраны этапы амплификации (95 °С – денатурация 3 минуты, далее 30 циклов (денатурация, отжиг праймеров, элонгация): 95 °С – 30 секунд, 53 °С – 30 секунд, 72 °С – 1 минута, далее 72 °С – элонгация 2 минуты) и компоненты для ПЦР смеси (Tersus bufer 2,5 мкл; F pr 0,2 мкл; R pr 0,2 мкл; днк матрица 0,5 мкл; вода 20,6 мкл; полимеразы 0,5 мкл; dNTP 0,5 мкл).

Был подобран гель и буфер, а также пусковое напряжение: агарозный гель (0,7% гель в буфере ТАЕ: (40 mM ледяная уксусная кислота, 40 mM трис-HCl, 0,5 M ЭДТА pH 8.0)) электрофорез проводили с напряжением в 60 вольт.

2.1.4 Математическая и статистическая обработка результатов

При анализе и статистической обработке результатов вычисление средней арифметической, средней геометрической, стандартного отклонения, критерия достоверности, коэффициента корреляции Пирсона проводили с использованием программы Excel для Windows.

При этом были приняты следующие обозначения: n – число наблюдений или животных в опыте, r – коэффициент корреляции, p – критерий достоверности.

Значения достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объёма анализируемого материала. Вероятность различий считалась существенной при $p < 0,05$. Расчет значений коэффициента корреляции (r) и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения Excel 2013 (Microsoft, США).

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Исследование макроскопических изменений

По результатам изучения макроскопическим изменений у всех индеек из опытной группы (40 голов – 100%) в селезёнке была выявлена либо атрофия, либо гипертрофия белой пульпы с характерным мраморным рисунком, который является патогномоничным признаком при данной болезни (рис.3-4).



Рисунок 3 – Гипертрофия белой пульпы селезёнки у индейки зараженной ВГЭИ
на 28 день жизни



Рисунок 4 – Две атрофированные селезенки рядом с нормальной по размеру
селезёнкой индейки на 34 день жизни

У всех 10 голов из контрольной группы селезёнка была неизменна (рис.5).



Рисунок 5 – Нормальная селезенка здоровой индейки на 34 день жизни

В ходе исследований обнаружено, что из 40 индеек из подопытной группы у 11 (27,5%) выявлена гипертрофия клоакальной сумки с точечными кровоизлияниями (рис. 6). У всех 10 голов из контрольной группы, клоакальная сумка была неизменна (рис.7).



Рисунок 6 – Клоакальная сумка с разлитыми кровоизлияниями у индейки зараженной ВГЭИ в 28 дней



Рисунок 7 – Клоакальная сумка здоровой индейки на 34 день жизни

При вскрытии также было обнаружено, что у 22 индеек (55%) из 40 голов подопытной группы обнаружен дуоденит с характерной гиперемией слизистых оболочек (рис. 8). У всех 10 голов из контрольной группы, двенадцатиперстная кишка была неизменна (рис.9).



Рисунок 8 – Дуоденит с характерной гиперемией слизистой оболочки у индейки зараженной ВГЭИ в 28 дней



Рисунок 9 –Двенадцатиперстная кишка здоровой индейки на 34 день жизни

Также было обнаружено, что у 4 индеек (10%) из 40 голов подопытной группы выявлен гепатит (рис. 10). У всех 10 голов из контрольной группы, печень была неизменна (рис.11).



Рисунок 10 – Гепатит у индейки зараженной ВГЭИ в 28 дней



Рисунок 11 – Печень здоровой индейки на 34 день жизни

У 30 индеек (75%) из 40 голов подопытной группы была выявлена гипотрофия и атрофия тимуса с точечными кровоизлияниями (рис. 12). У всех 10 голов из контрольной группы, тимус не был изменен (рис.13).



Рисунок 12 – Гипотрофия и кровоизлияние в тимусе у индейки зараженной ВГЭИ
в 28 дней

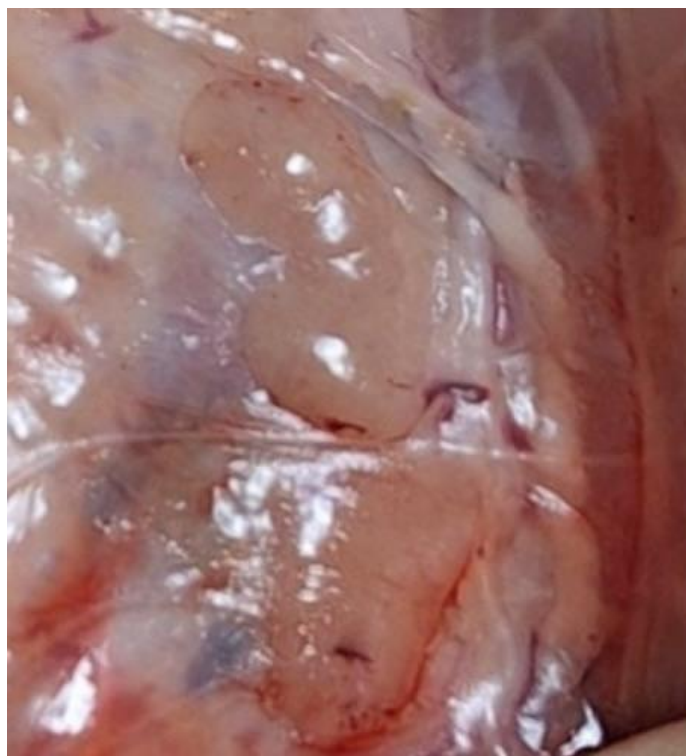


Рисунок 13 – Тимус здоровой индейки на 34 день жизни

2.2.2 Исследование микроскопических изменений

При исследовании влияния ВГЭИ на организм индеек, нельзя не обратить внимание на изменения гистологической картины в иммунокомпетентных органах, реагирующих на появление вируса в первую очередь.

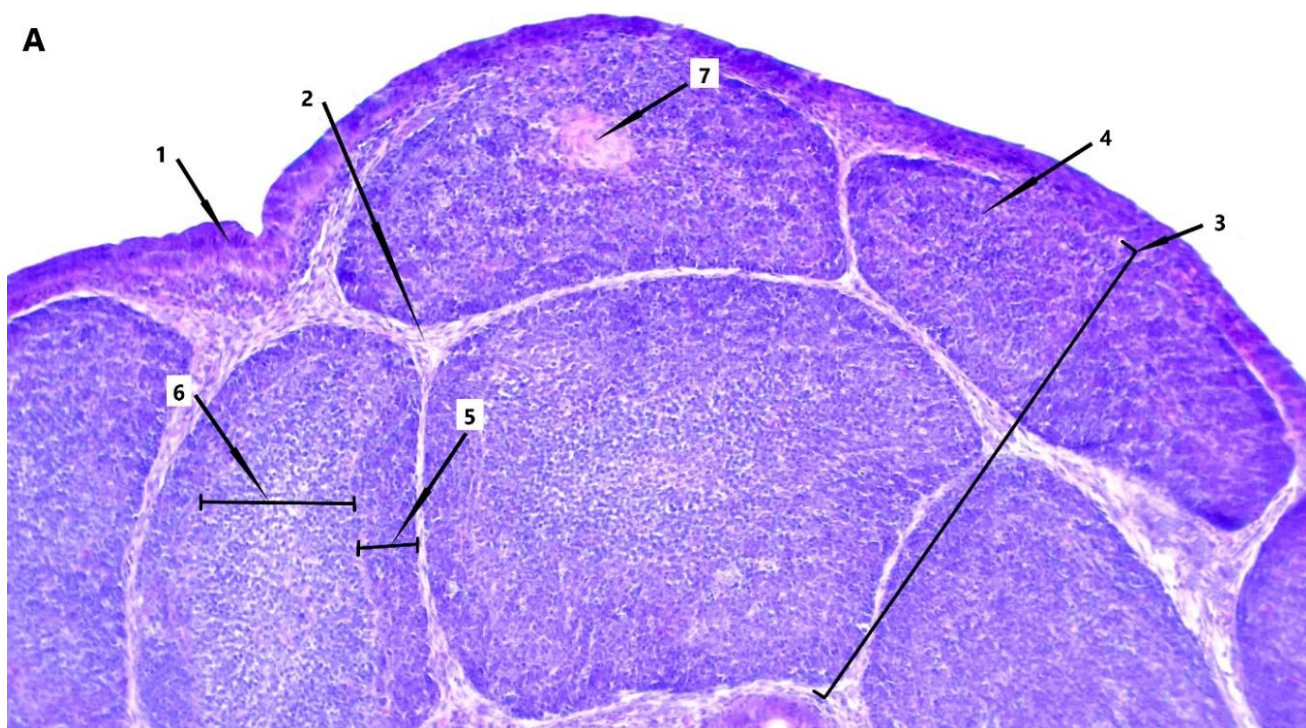
Так, при рассмотрении микрофотографий клоакальной сумки контрольной и подопытных групп (рис.14) можно увидеть, правильно сформированную слизистую оболочку, представленную эпителиальной пластинкой и собственной пластинкой, в составе которой различаются складки, образованные обширными лимфоидными фолликулами, разделёнными ярко выраженными соединительнотканными прослойками.

Для фолликулов клоакальной сумки характерно разделение на корковое и мозговое вещество, однако согласно данным Зинченко Д.А. формирование данной дифференциации начинается с 4-8 недели, что соответствует возрасту индеек, представленных в данном опыте, вследствие чего, отсутствие разделения на

светлую и темную зоны внутри фолликула клоакальной сумки можно считать нормой [12].

Следует отметить, что во всех представленных группах, в центре предполагаемого мозгового вещества лимфоидных фолликулов находятся скопления крупных, округлых, светлых оксифильных клеток. Эпителиальная пластинка целостная, хорошо сформированные лимфоидные фолликулы, чётко разделённые соединительнотканными трабекулами, во всех представленных группах.

При рассмотрении клоакальной сумки группы заражения (рис.14 Б) заметны более серьёзные патологические изменения. Наблюдается место слияния двух крупных фолликулов, в центре одного из которых видны рассредоточенные очаги бесцветных тканевых структур, а эпителиальная пластика утратила целостность, обнажив лежащую под ней соединительную ткань собственной пластинки.



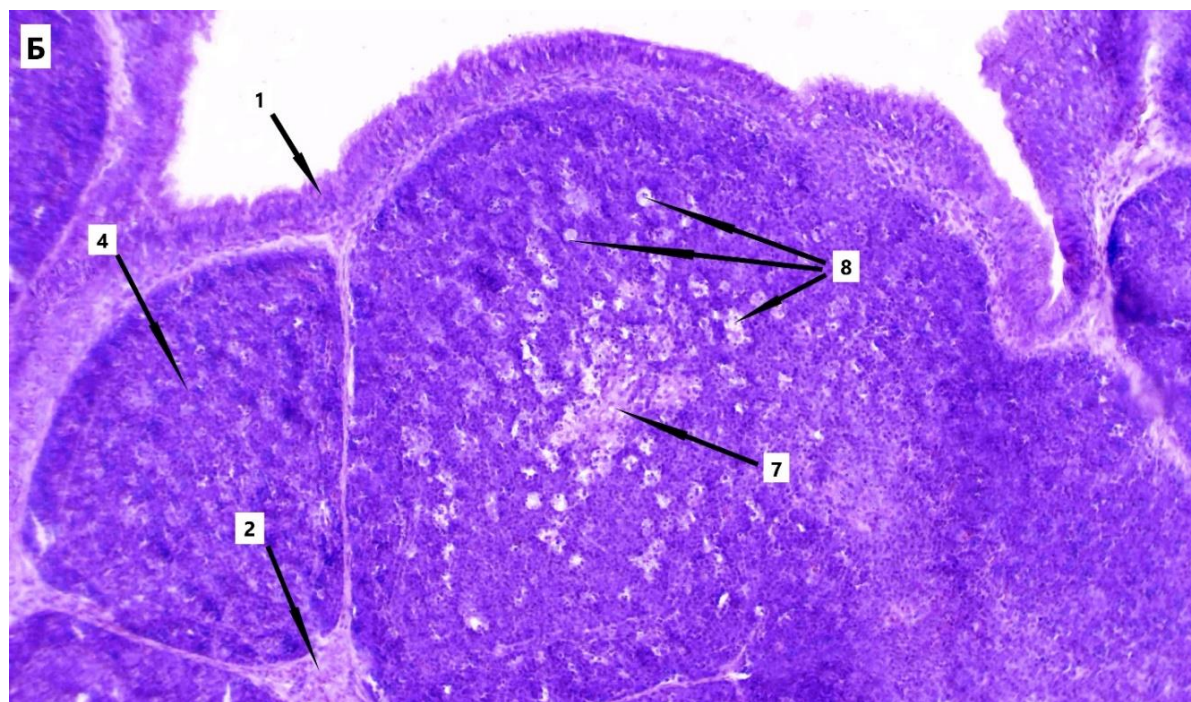
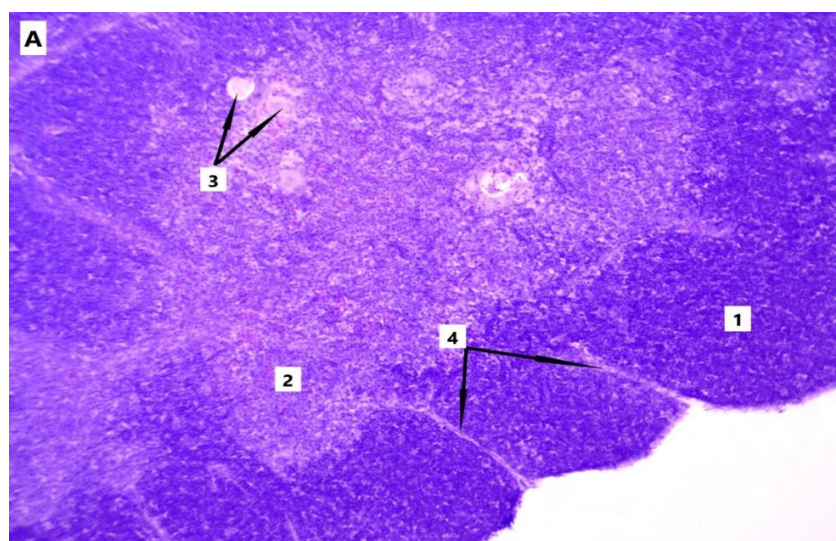


Рисунок 14 – Фрагмент клоакальной сумки индейки 35-дневного возраста (А- контрольной группы, Б - группа заражения). Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым эозином. Увеличение x100:

1 – эпителиальная пластинка; 2 – соединительнотканые трабекулы; 3 – собственная пластинка; 4 – лимфоидные фолликулы бursы; 5 – корковое вещество фолликула; 6 – мозговое вещество фолликула; 7 – светлые оксифильные клетки в центре мозгового вещества фолликула бursы; 8 - очаги бесцветных тканевых структур в мозговом веществе фолликула.

Далее следует рассмотреть не менее важный иммунокомпетентный орган, а именно тимус. В группе контроля (рис. 15 А) выявляется типичное дольчатое строение, хорошо различаются корковое и мозговое вещество, в котором визуализируются тельца Гассала.



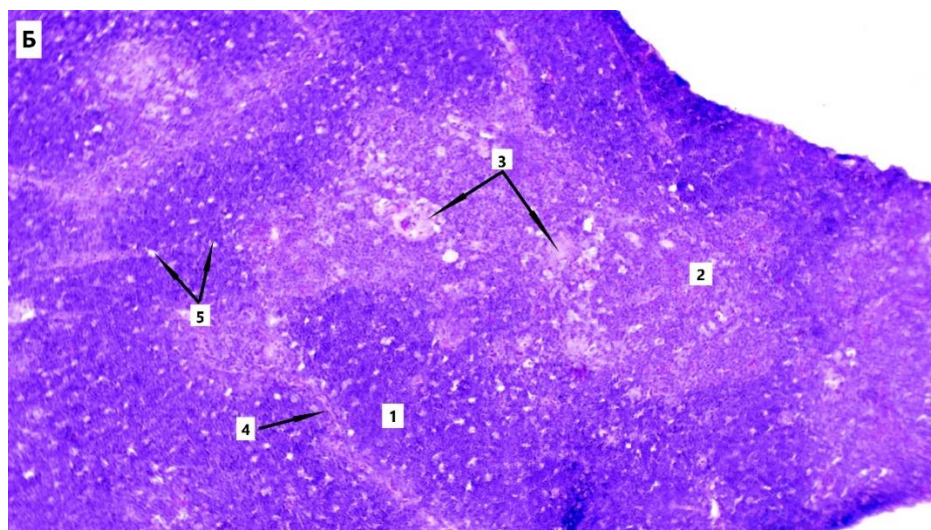


Рисунок 15 – Фрагмент тимуса индейки 35-дневного возраста (А- контрольной группы, Б- группа заражения). Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым эозином. Увеличение x100:

1 – корковое вещество дольки тимуса; 2 – мозговое вещество дольки тимуса; 3 – тельца Гассаля; 4 – соединительнотканые трабекулы; 5 – очаги бесцветных тканевых структур в мозговом веществе дольки тимуса.

В тимусе индеек в группе заражения (рис. 15 Б) можно заметить выраженную дольчатость органа при неявной дифференциации на корковое и мозговое вещество. Также отмечается появление значительного количества бесцветных тканевых структур, по сравнению с группой контроля, и расположению их, как в мозговом, так и в корковом веществе.

При рассмотрении селезёнки индеек контрольной и опытных групп, можно заметить следующие изменения.

В группе контроля (рис.16 А) заметно нормальное соотношение белой и красной пульпы, центральные артерии и соединительнотканые трабекулы также хорошо дифференцируются. Однако, при рассмотрении группы, зараженной ВГЭИ, отмечается значительно преобладание белой пульпы над красной (рис.16 Б).

Т-зоны в группе заражения представлены объёмными тяжами, занимающими значительное пространство паренхимы в то время, как В-зоны отличаются несколько меньшими объёмами, однако также сильно превышают размеры таковой в группе контроля.

Далее следует перейти к последнему рассматриваемому органу, в рамках данного исследования, а именно к двенадцатиперстной кишке (рис. 17)

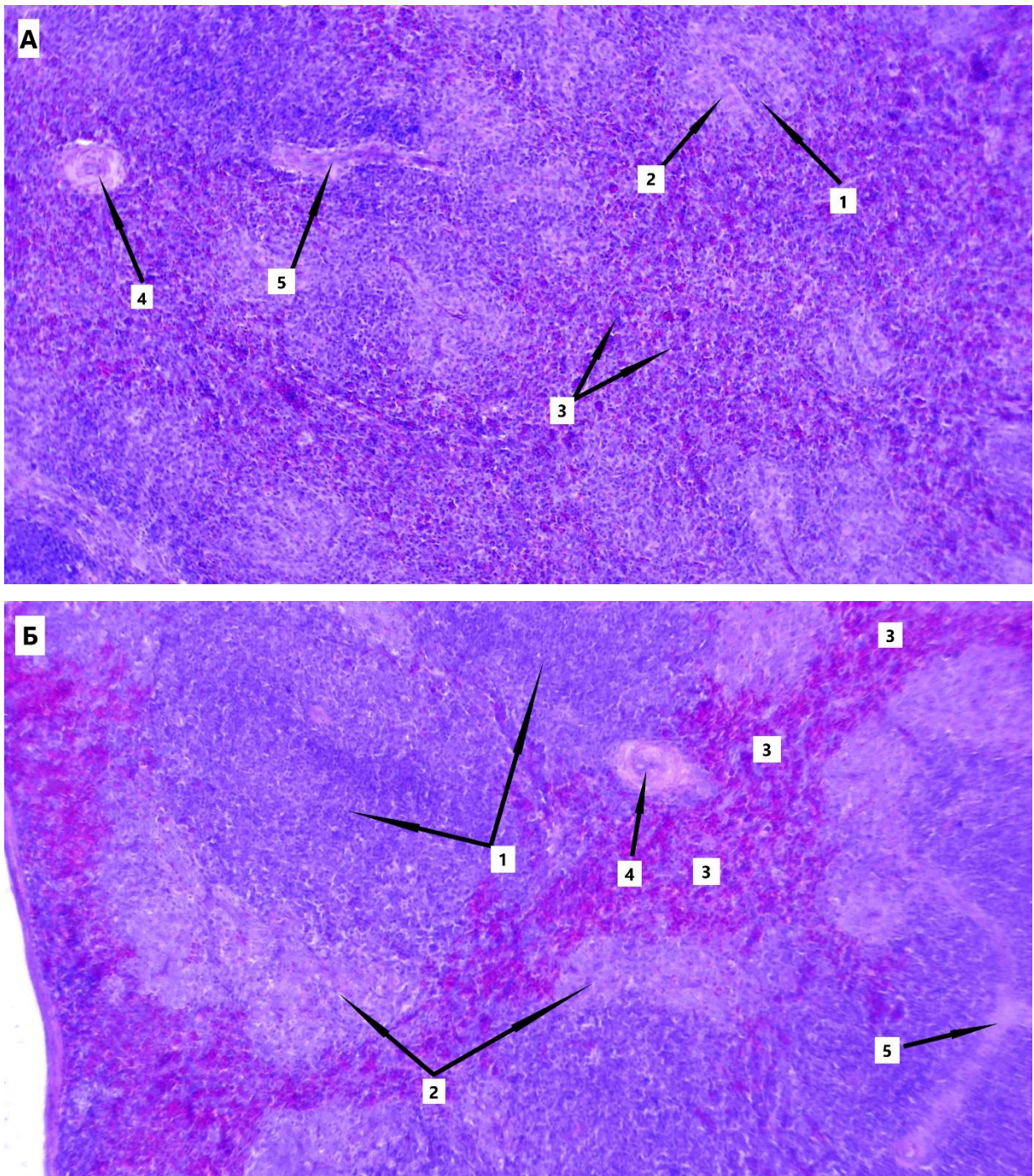


Рисунок 16 – Фрагмент селезёнки индейки 35-дневного возраста (А- контрольной группы, Б - группа заражения). Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым эозином. Увеличение x100:
 1 – Т- зависимая зона белой пульпы; 2 – В- зависимая зона белой пульпы; 3 – красная пульпа; 4 – центральная артерия;
 5– соединительнотканьные трабекулы.

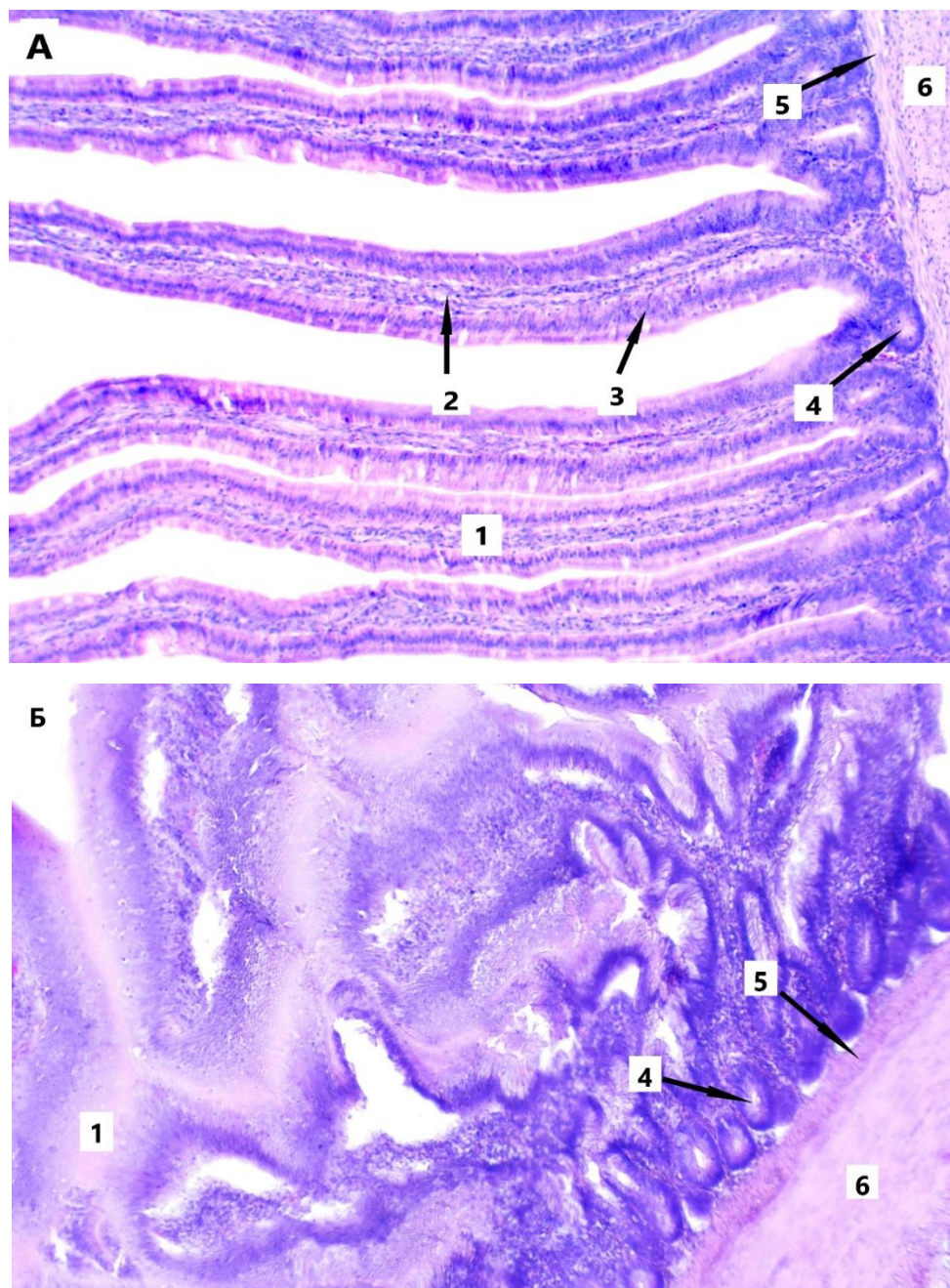


Рисунок 17 – Фрагмент двенадцатиперстной кишки индейки 35-дневного возраста (А- контрольной группы, Б- группа заражения). Окраска гематоксилином Джилла и 1,0% спиртовым эозином. Увеличение $\times 100$:

1 – кишечная ворсинка; 2 – эпителиальная пластинка слизистой оболочки; 3 – собственная пластинка слизистой оболочки; 4 – кишечные крипты; 5 – мышечная пластинка слизистой оболочки; 6 – мышечная оболочка.

Группа контроля (рис.17А) демонстрирует правильную гистоархитектонику. Кишечные ворсинки имеют вид длинных тонких выпячиваний, эпителиальная пластинка сохранена, клетки чётко дифференцируются, собственная пластинка также без изменений.

В группе заражения (рис. 17 Б), кишка всё также сохраняет относительно целостное строение. Все оболочки, соответственно, различимы, однако слизистая оболочка выше крипт практически полностью разрушена. Ворсинки трудно различимы ввиду некротизации эпителиальной и собственной пластинок.

2.2.3 Концентрации вируса в органах-мишенях при заражении индейки в различном возрасте

При заражении четырех групп для определения наиболее восприимчивого возраста было определено что индюшата (красса «Биг-6») 4-5 недельного возраста наиболее восприимчивы к заражению ВГЭИ. Однако группа индюшат, зараженная в четырехнедельном возрасте, показала наилучший результат (1:16 в РДП), а группа, зараженная в семинедельном возрасте, показала наихудший результат (отрицательный результат в РДП) (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты определения среднего титра ВГЭИ в РДП в селезёнке,
n=10

Номер группы	Возраст в неделях во время заражения ВГЭИ	Титр в РДП
Первая	Четвертая неделя	1:16
Вторая	Пятая неделя	1:8
Третья	Шестая неделя	1:2
Четвертая	Седьмая неделя	Отрицательно
Пятая	Чистый контроль	Отрицательно

2.2.4 Концентрации вируса в органах-мишенях в различные дни после заражения

При заражении подопытной группы для определения наибольшей концентрации вируса в различные дни после заражения, видно, что наибольший титр ВГЭИ в органах-мишенях выявляется на 5 и 6 день после заражения (титр

ВГЭИ в РДП в селезёнке – 1:32, в клоакальной сумке – 1:2/1:4, в двенадцатиперстной кишке – 1:8/1:16). Наименьший титр ВГЭИ улавливался на 2 и 8 день после заражения (табл.2). В контрольной группе во всех органах-мишенях вирус не обнаружен (табл.3).

Таблица 2 – Концентрация ВГЭИ в органах-мишенях в различные дни после заражения, n=10.

Дни п.з.*	2	3	4	5	6	7	8
Органы							
Селезёнка	1:4	1:8	1:16	1:32	1:32	1:8	1:4
Клоакальная сумка	цельное	1:4	1:4	1:4	1:2	цельное	-
Двенадцатиперстная кишка	1:2	1:4	1:8	1:8	1:16	1:8	1:4

*- дни после заражения

Таблица 3 – Концентрация вируса ГЭИ в органах-мишенях контрольной группы, n=10

Органы	Титр в РДП
Селезёнка	отрицательно
Клоакальная сумка	отрицательно
Двенадцатиперстная кишка	отрицательно

2.2.5 Определение периода полураспада материнских антител к вирусу геморрагического энтерита индеек

Анализ данных, полученных при определении периода полураспада материнских антител, показывает, что среднесуточное снижение титров материнских антител к ВГЭИ в 1-ой подгруппе составило $35,4\% \pm 15,2\%$, тогда как

во 2-й группе этот показатель был равен $30,6\% \pm 16,4\%$. Уровень материнских антител сохраняет плато на протяжении первых трех дней жизни. Период полураспада материнских антител у кросса БИГ-6 в среднем равняется 2,5 суткам. При этом материнские антитела сохраняются на достаточном уровне (титр ≥ 500) на протяжении не менее 14-ти дней (табл. 4).

Таблица 4 – Результаты изучения периода полураспада материнских антител в сутках, усредненные значения, $n=10$

Дни жизни	Титр в ИФА	Дни жизни	Титр в ИФА
2	14826 $\pm$ 1273	3	3669 $\pm$ 214
4	9070 $\pm$ 735	5	2541 $\pm$ 149
6	7392 $\pm$ 515	7	1239 $\pm$ 87
8	3858 $\pm$ 316	9	681 $\pm$ 54
10	1935 $\pm$ 137	11	670 $\pm$ 43
12	1672 $\pm$ 148	13	512 $\pm$ 37
14	1253 $\pm$ 113	15	416 $\pm$ 25
16	565 $\pm$ 48	17	235 $\pm$ 21
1 подгруппа		2 подгруппа	

2.2.6 Разработка серологических способов диагностики

2.2.6.1 Реакция диффузионной преципитации

Два полученных нами компонента реакции (положительный антиген ГЭИ и положительная сыворотка крови с антителами к ВГЭИ) титровали относительно друг друга путём последовательного двукратного разведения для определения титра в РДП и для дальнейшего подбора рабочей дозы. В двух повторах (проба №1 и 2 – в центре нативная сыворотка, по периферии раститрованный антиген от цельного до 1:32; проба №3 и 4 - в центре нативный антиген, по периферии раститрованная сыворотка от цельного до 1:32) (рис. 18).

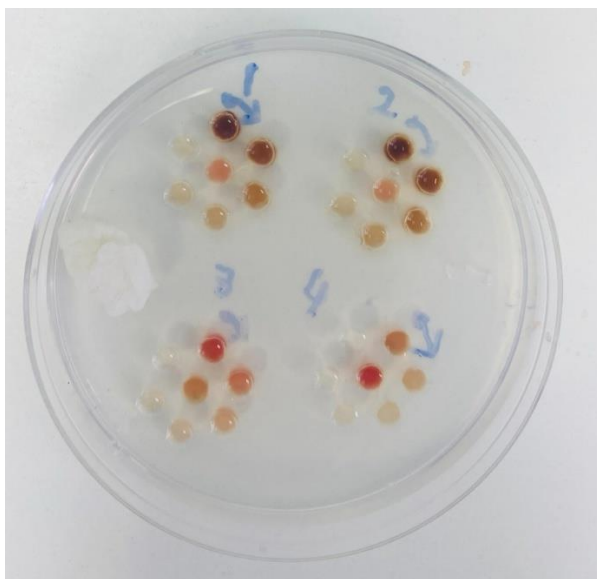


Рисунок 18 – Раститрованные компоненты в РДП

Чашку Петри помещали в термостат при температуре 37°C на 48 часов. Через двое суток проводили учет реакции. В пробе № 1 и 2 получили результат в титре 1:16, а проба № 3 и 4 в титре 1:8 (рис.19-20).



Рисунок 19 – Результаты учета РДП 1 часть

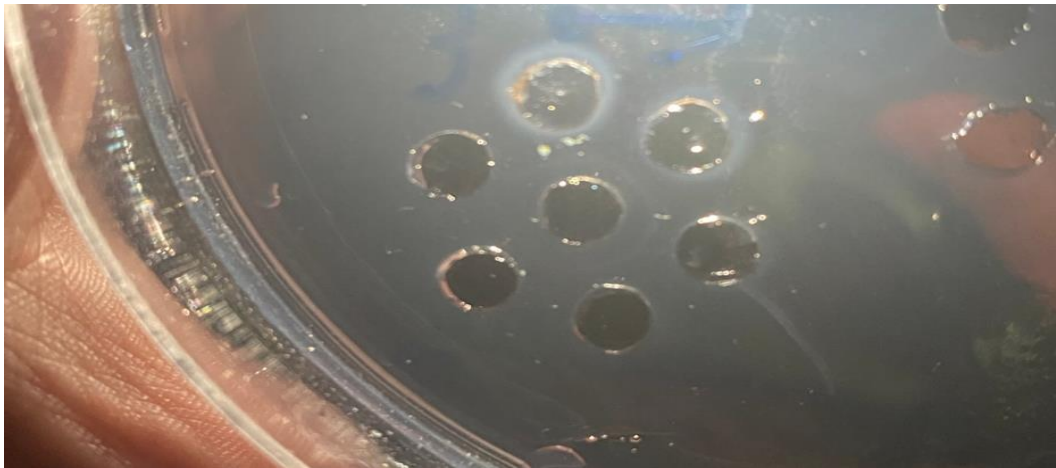


Рисунок 20 – Результаты учета РДП 2 часть

Исходя из полученных результатов в РДП, было принято решение выбрать титр рабочего разведения компонентов на $1 \log_2$ ниже его титра. Именно поэтому для постановки реакции за рабочее разведение использовался антиген с титром 1:8, а за рабочее разведение положительной сыворотки – 1:4. Поставили РДП с компонентами в рабочей дозе по следующему принципу (рис.21-22):

- 1) В центре антиген в рабочем разведении и по периферии раститрованная сыворотка, полученная от индеек, иммунизированных вакциной против ВГЭИ;
- 2) В центре положительная сыворотка крови в рабочем разведение и по периферии раститрованный антиген полученных от индеек в котором был подтвержден ВГЭИ;
- 3) В центре положительный антиген ГЭИ в рабочем разведение и по периферии раститрованная положительная сыворотка крови из набора;
- 4) В центре положительная сыворотка крови в рабочем разведение и по периферии раститрованный антиген из набора;
- 5) В центре положительный антиген ГЭИ в рабочем разведение и по периферии раститрованная отрицательная сыворотка крови из набора (отрицательный контроль);
- 6) В центре положительная сыворотка крови в рабочем разведение и по периферии раститрованный отрицательный антиген (отрицательный контроль);

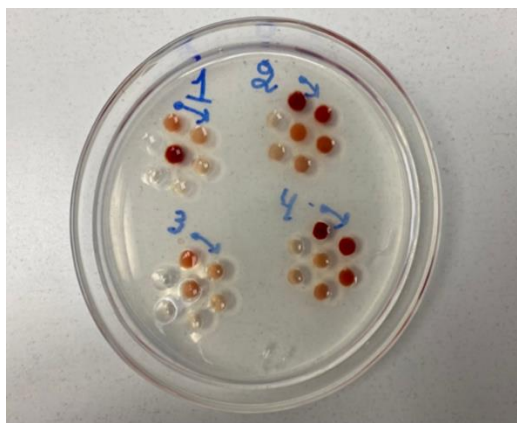


Рисунок 21 – Раститрованные положительные компоненты в РДП №1-4

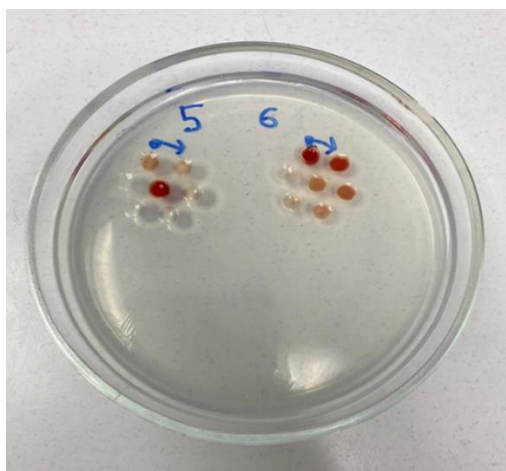


Рисунок 22 – Раститрованные отрицательные компоненты в РДП №5-6

Через двое суток провели учёт реакции (рис.23-24):

Проба №1 – 1:4;

Проба №2 – 1:32;

Проба №3 – 1:4;

Проба №4 – 1:32;

Проба №5 – отрицательно;

Проба №6 – отрицательно;

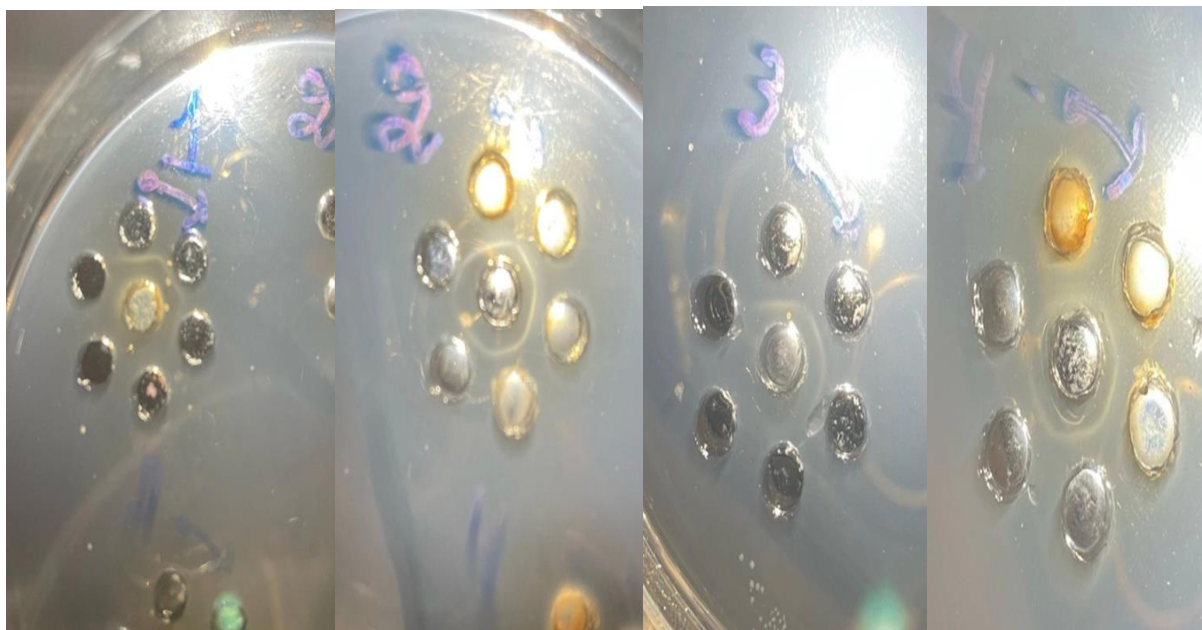


Рисунок 23 – Результаты учета РДП положительные пробы №1-4.

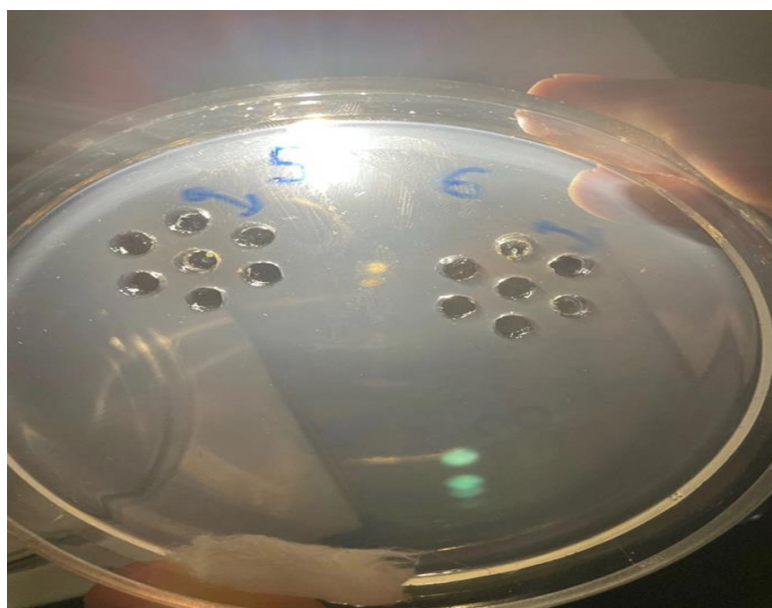


Рисунок 24 – Результаты учета РДП отрицательные пробы №5-6.

Также проводили РДП с другими вирусами обладающими преципитирующими свойствами (вирус гидроперикардита кур из 1 группы семейства Adenoviridae, вирус синдрома снижения яйценоскости из 3 группы семейства Adenoviridae и вирус инфекционной бурсальной болезни из семейства Birnaviridae) для определения наличия перекрестной реакции (ложноположительный результат). Данное исследование проводили в трёх

повторностях для исключения случайных результатов. Были поставлены следующие пробы:

1) В центре положительная сыворотка крови индеек с антителами к ГЭИ, по периферии антиген гидроперикардита кур из 1 группы семейства *Adenoviridae* в раститровке с цельного до 1:32;

2) В центре положительная сыворотка крови индеек с антителами к ГЭИ, по периферии антиген вируса синдрома снижения яйценоскости из 3 группы семейства *Adenoviridae* в раститровке с цельного до 1:32;

3) В центре положительная сыворотка крови индеек с антителами к ГЭИ, по периферии антиген инфекционной бурсальной болезни из семейства *Birnaviridae* в раститровке с цельного до 1:32;

4) В центре положительная сыворотка крови индеек с антителами к ГЭИ, по периферии антиген ГЭИ в раститровке с цельного до 1:32;

5) В центре положительный антиген ГЭИ, по периферии сыворотка крови кур с антителами к вирусу гидроперикардита кур из 1 группы семейства *Adenoviridae* в раститровке с цельного до 1:32;

6) В центре положительный антиген ГЭИ, по периферии сыворотка крови кур с антителами к вирусу синдрома снижения яйценоскости из 3 группы семейства *Adenoviridae* в раститровке с цельного до 1:32;

7) В центре положительный антиген ГЭИ, по периферии сыворотка крови кур с антителами к вирусу инфекционной бурсальной болезни из семейства *Birnaviridae* в раститровке с цельного до 1:32;

8) В центре положительный антиген ГЭИ, по периферии положительная сыворотка крови индеек с антителами к ВГЭИ;

Через 48 часов проводили учет реакции, во всех трёх повторностях были получены следующие результаты:

- 1) отрицательно;
- 2) отрицательно;
- 3) отрицательно;
- 4) 1:16;

- 5) отрицательно;
- 6) отрицательно;
- 7) отрицательно;
- 8) 1:8;

В результате проведенных исследований установлено что компоненты РДП для выявления антител и антигена ГЭИ не дают ложноположительных реакций с другими преципитирующими вирусами.

2.2.6.2 Реакция латекс-агглютинации

На основании данных, полученных при разработке РЛА, можно заключить, что латексные микросферы модифицированные стрепавидином, непригодны для разработки РЛА поскольку во всех случаях зафиксирован положительный результат и даже с отрицательным контролем. Вероятно, это связано с чрезмерной адсорбирующей способностью стрепавидин-модифицированного латекса, которая препятствует корректному взаимодействию с очищенными глобулиновыми фракциями (табл. 5-6).

Таблица 5 – Результаты РЛА с положительным контролем

Группа №1	Группа №2	Группа №3	Группа №4
1.1 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.1 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.1 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.	4.1 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.2 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.2 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.2 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.	4.2 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.

1.3 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.3 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.3 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	4.3 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.4 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.4 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.4 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	4.4 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.5 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - полож.	2.5 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - полож.	3.5 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	4.5 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.6 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.6 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.6 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	4.6 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.

Таблица 6 – Результаты РЛА с отрицательным контролем

Группа №1	Группа №2	Группа №3	Группа №4
1.1 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.1 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.1 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.	4.1 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.

1.2 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.2 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.2 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.	4.2 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.3 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.3 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.3 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	4.3 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.4 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.4 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.4 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.	4.4 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.5 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.5 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.5 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.	4.5 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.
1.6 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	2.6 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	3.6 Титр глоб., фракции: Ц – полож. 1:2 – полож. 1:4 – полож. 1:8 – полож. 1: 16 – полож. 1: 32 - отр.	4.6 Титр глоб., фракции: Ц – отр. 1:2 – отр. 1:4 – отр. 1:8 – отр. 1: 16 – отр. 1: 32 - отр.

На основании данных, приведенных в таблицах №5-6, можно заключить, что латексные микросферы модифицированные стрепавидином, непригодны для разработки РЛА поскольку во всех случаях зафиксирован положительный результат и даже с отрицательным контролем. Вероятно, это связано с чрезмерной

адсорбирующей способностью стрепавидин-модифицированного латекса, который препятствует корректному взаимодействию с очищенными глобулиновыми фракциями.

Также из таблицы №5-6, видно, что физиологический раствор и ФСБ оказались непригодными в качестве буферных систем при разработке РЛА, поскольку латексные микросферы, взаимодействующие с ними, демонстрируют спонтанную агглютинацию с положительным и отрицательным контролем (рис.25). По всей видимости, это связано с несоответствием значений рН и ионной силы данных буферов.

В ходе проведения эксперимента, было выявлено, что размер латексных частиц (200 и 400 нм) не оказывает влияние на получение результата.

Наилучшие результаты продемонстрировал карбоксилированный латекс диаметром частиц 200 и 400 нм при использовании трис-HCl буфера, а наиболее подходящим титром глобулиновой фракции в данном эксперименте оказался диапазон между 1:2 и 1:16 (рис.26). При использовании неразведенной глобулиновой фракции регистрируется ложноположительный результат возможно это связано с избыточным количеством адсорбированного белка, так как при разведение фракции 1:32 везде регистрировался отрицательный результат, скорее всего из-за недостаточного количества белка (рис.27). Наиболее подходящей глоублиновой фракцией являлась выделенная методом высаливания сульфатом аммония с последующим диализом, а фракция выделенная с помощью ПЭГ 6000 дала отрицательный результат. Данный результат с ПЭГ 6000 возможно связан с тем, что остатки ПЭГ 6000 блокируют адсорбционные сайты на поверхности латексных микросфер препятствуя связыванию с глобулиновой фракцией.



Рисунок 25 – Спонтанная агглютинация (ложноположительный результат)

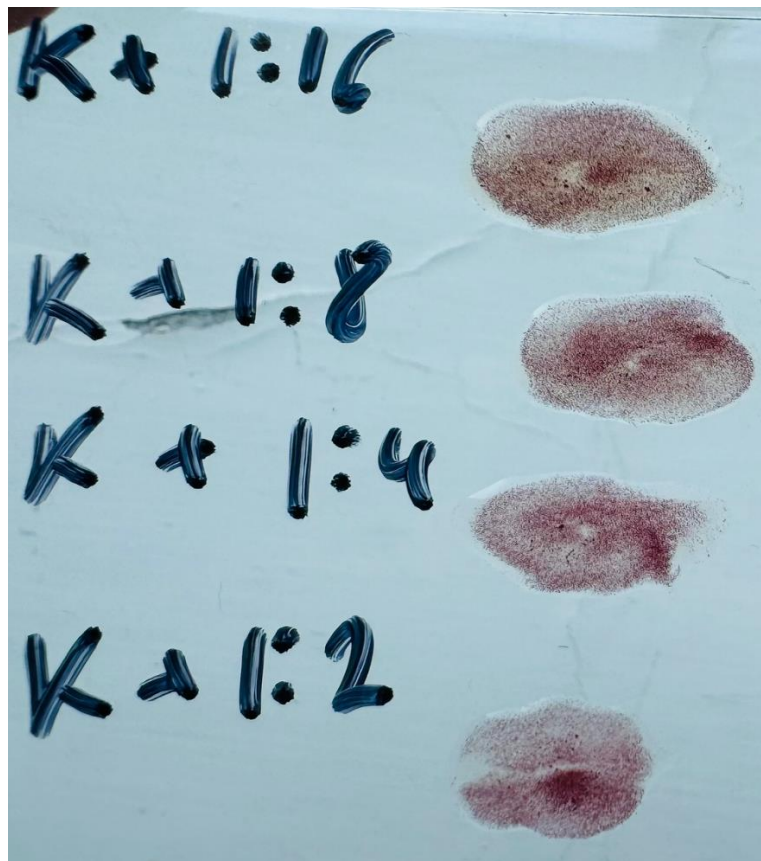


Рисунок 26 – Положительная реакция в РЛА

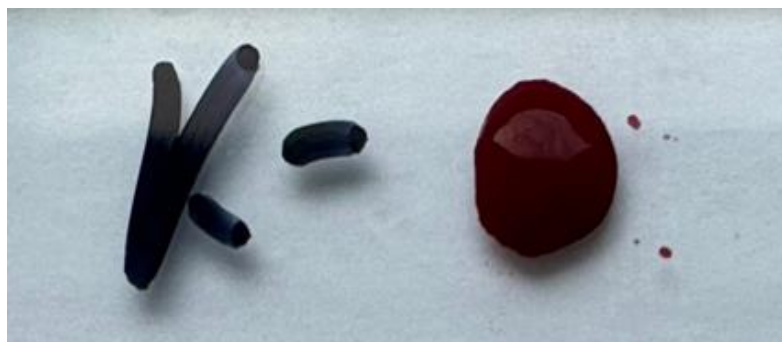


Рисунок 27 – Отрицательная реакция в РЛА

Исходя из таблицы №7 видно, что ложноположительного результата с другими вирусами из одного семейства *Adenoviridae* нет ни в одном разведении глобулиновой фракции, в отличие от положительного результата с ВГЭИ.

Таблица 7 – Результаты исследований на наличие ложноположительной реакции

Титр глобулиновой фракции, осажденной на латексе	Результат с вирусом гидроперикардита кур из 1 группы семейства <i>Adenoviridae</i>	Результат с вирусом синдрома снижения яйценоскости из 3 группы семейства <i>Adenoviridae</i>	Результат с вирусом геморрагического энтерита индеек из 2 группы семейства <i>Adenoviridae</i>
1:2	Отриц.	Отриц.	Положит.
1:4	Отриц.	Отриц.	Положит.
1:8	Отриц.	Отриц.	Положит.
1:16	Отриц.	Отриц.	Положит.

2.2.7 Подбор праймеров, реакционной смеси и температурно-временного режима этапов амплификации полимеразной-цепной реакции в классическом варианте

При изучение нуклеотидной последовательности наименее вариабельного белка Нехоп ВГЭИ (рис.28), были подобраны праймеры к его наименее вариабельной части, а также этапы амплификации, гель и пусковое напряжение.

ATGGACATATCAAATGCTACGCCAAAACCTTGATATATTCCACATAGCTGGACCAGATGCTTCAGAATATC
 TTTCAGAAAATCTCGTTAATTTTCATCTCCAGTACAGAATCGTATTTTCCAATTAATAAAAAATTTAGAGAAA
 CAATTGTAGCACCAACAAAAGGTGTGACGACAGAACAATCTCAGAAATTGCAAGTTAAAATTGTTCCAAC
 TTTGACACAAGATTTAGAAAATAGTTTTACTGCTAGATTTACTATTGCTGTTGGCGATGGTCGGGTTTTGG
 ATATGGGAAGTACGTATTTTGATATTAGGGGTAATATTGATCGGGGACCTTCATTTAAGCCATATGGTGGT
 ACAGCATATAATCCTCTAGCTCCAAGGTCAGCTCAATTTAATAATATTAACCTGTGGGTGGTAAAACAT
 ATTTGACTGCTCAAGCTACTAAATTTTTTCAACATCTGGAATGGTTGTGCAGCTGCTAATACTGAAGCA
 AGTTCATTTACAAATTTAGTTCCTTCACCTAATACTGGTTCAGCAGAAAAGTTCTTTTGATCCTACAACAGA
 GGGAGCTAGTTGTAGAGCTATAACACTAGGCAGTTCTGTAACAGATGCAACTTGTTATGGAGCTTATACA
 CCTATTCAAAATGCTAATGGTTCAATTTACCTCCATCTGTTACGCCTGATAAAAAATTTGCCGATGCTGG
 TAAATCTGGCAGTGTTACATGTACTGCTGCTATTTGTTGTGATAATGTTACTGTACAATATCCAGATACTA
 GAATAGTTGCTTATGACTCTACTGATAAAATAGCAACTAGAATGGGTAACAGAATTAATTATATTGGATTT
 AGAGATAATTTTATAGGTTTGATGTATTATGATAATGGTGCACATAGTGGTCTTTGGCCACAGAAACAGG
 AGATATAAATTTGGTAGAACAATTGCAAGATAGAAATACAGAAATTAGTTATCAATATATGTTAGCGGATT
 TGATGAGTAGGAATCATTATTATAGTCAGTGGAAATCAAGCTGTAGATGATTATGATTTAAATGTTAGAGTA
 CTTACAAATATTGGTTATGAAGAGGGTCTCCAGGTTACTGTTATCCAAGCACAGGCATGGGCAACTATC
 CTAATACTGTCTGTCGTTGGGACATTAGTGGATAATAATGGTACAACCTGCTACAACAACGTCAAATAC
 TGTAGCTGTGATGGGTTTTGGCAGTGTTCTACTATGGAAATTAACGTTCAAGCTTATTTGCAAAAATGTT
 GGATGTATGCTAACATTGCAGAATATTTACCTGATAAGTATAAAAAAGCTATTCAAGGTACTAGTGAAC
 TGATCCAACAACCTTATAGTTATATGAATAGTAGGCTTCCTAATGTGAATATGGCTGATCTCTTTACACATA
 TTGGCGGGCGTTATAGTTTGATGTAATGGATAATGTTAATCCTTTTAATCATCATAGAAATAGAGGTTTG
 CAATATAGAAGTCAAATTTTGGGTAATGGTAGAAATGTCCGTTTTCATATTCAGGTACCTCAGAAATTTTT
 TGCTATTAAGAATCTATTGTTACTTCCTGGAACCTTATAGTTATGAATGGTGGTTCAGGAAAGATCCAACT
 TAGTGCTACAGTCTACGTTGGGAAATGATTTAAGAAAAGATGGAGCAAGCATTACAGTTTAGCAGTATTAG
 TCTTTATGCGAGTTTTTTTCTATGGATCACGCTACTTGTAGTGAGCTTATTTAATGCTTAGAAACGATCA
 AAATGATCAAACCTTTTATGGATTATATGGGTGCAAAGAATAATTTGTATTTAGTTCCTGCTAATCAAACCTA
 ATGTTTCAGATTGAAATACCTTCTAGAGCTTGGACAGCATTAGAGGCTGGAGTTTTAACCGAATTAAC
 TGCTGAGACACCAGCTGTGTGGTCTACTTATGATCTTAATTTTAAATATTCTGGCTCAATACCTTATCTAG
 ATGGTACATTTTATCTTTCTCACACTTTTAACTCTATGTCTATTTTGTGTTGATTGAGCAATAACATGGCCAG
 GTAATGATAGAATGTTAGTTCCGAATTTTTTGAATAAAAAGAGATAGATACGGAGGGGATACCTAC
 TAGTCAGTCTAATATGACTAAAGATTGGTATTTTGATTCAAATGTCTGCAAATTATAACCGGGGTATCAG
 GTATAGTTTTCCAGCAGATAAAGTATACAGACAGTATGATTTTATGTCAAATTTTGATTCTATGTCTGTTCA
 AGTACCCCGGTCAGGTCTGGCATTTTTGTAAATGAAAATTATAACTTGATAGTAAATAATTCAGGATTTTT
 GCCCAGTAGGACGGCTCCAATTGCTGGAGTTAATGAAGGCCATCCTTATCCAGCAAACCTGGCCAGCGCC
 ATTAATAGGTAATAGTCCTGACAGTGTGTTACAGTTAGGAAATTTTTATGTGATAAGTATTTATGGACAA
 TACCTTTTTCAAGCAATTTTATGAATATGGGTGAATTGACTGACCTTGGACAGAGTTTGCTGTATACTGAG
 TCTGCACATAGTTTGCAAATAACATTTAATGTTGATCCAATGCCTGAGCCTACGTACATTTATTTACTTTAT
 AGTGTTTTTGATTGTGTTAGGGTCAATCAACCTAACAAAAATTAATCTATCTGCAGCTTATTTCAGAACTCCT
 TTTGCTACTGGAACCTGCTTCAGTATAA

Рисунок 28 – Нуклеотидная последовательность белка Нехон ВГЭИ

ПЦР осуществляли с выделенными нуклеиновыми кислотами, экстракцию которых проводили с помощью коммерческого набор «Вет-фактор» в соответствии с протоколом производителя. В исследование были включены следующие образцы: проба №1– положительный контроль (вакцина Dindoral), проба №2 – положительный контроль (вакцина Н.Е.Вас), пробы № 3,4,5 – надосадочная жидкость гомогената селезенок индеек содержащая вирус геморрагического энтерита индеек; проба №6– отрицательный контроль (надосадочная жидкость гомогената селезёнки интактной индейки).

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза при рабочем напряжении 60 В. Визуализацию и учет результатов проводили через 40 минут непрерывного фореа (рис. 29).

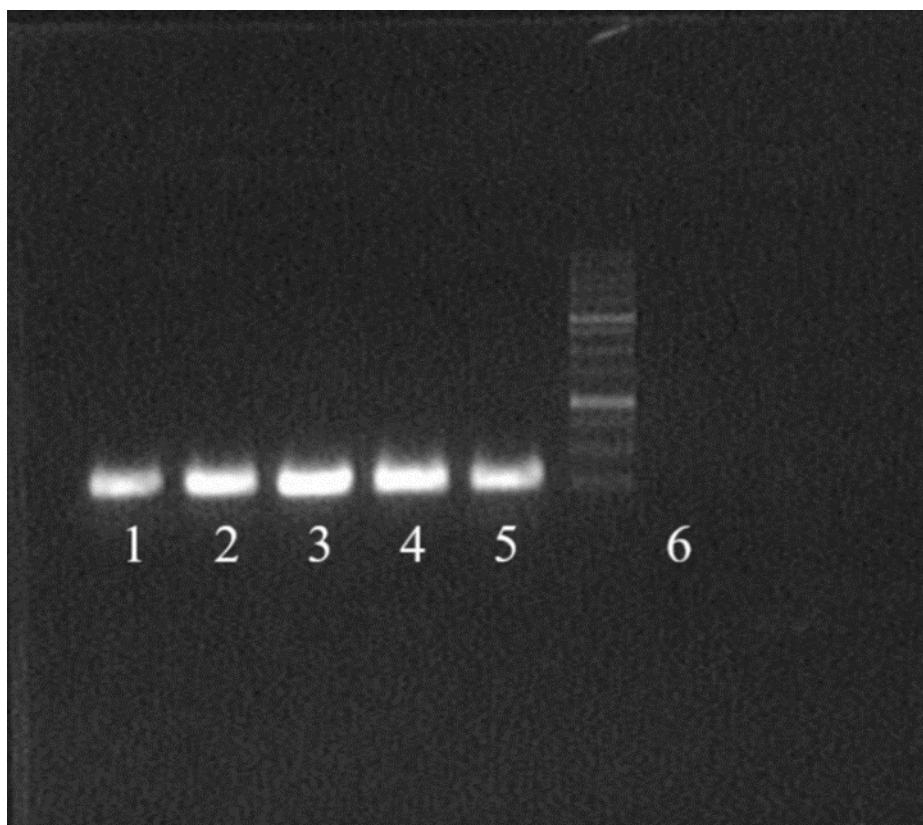


Рисунок 29 – Результат проведенного ПЦР в агарозном геле

По результатам проведенной реакции, видно, что положительный и отрицательный контроль сработали должным образом. Получен достоверный положительный результат при исследовании проб №3-5.

Также была проведена ПЦР с нуклеиновыми кислотами, выделенным от аденовирусов из других групп (вирус гидроперикардита из 1 группы и вирус синдрома снижения яйценоскости из 3 группы) для проверки наличия ложноположительных результатов (так как у всех вирусов из семейства *Adenoviridae* присутствует белок Hexon). Были взяты следующие пробы:

- 1) Нуклеиновая кислота вируса гидроперикардита кур из 1 группы;

2) Нуклеиновая кислота вируса синдрома снижения яйценоскости из 3 группы;

3-5) Нуклеиновые кислоты, выделенные из клоакальной сумки, двенадцатиперстной кишки и селезёнки индейки зараженной ВГЭИ;

После проведения ПЦР в классическом варианте проводили учёт реакции (рис. 30-31).

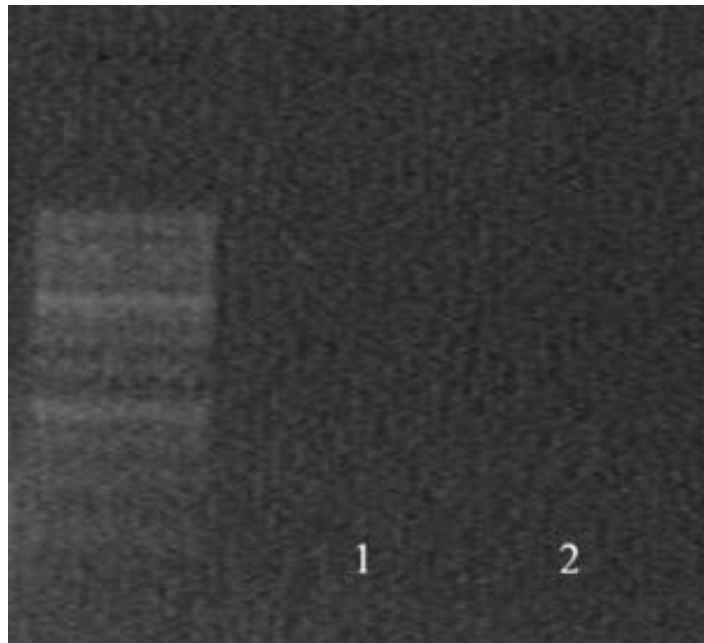


Рисунок 30 – Отрицательный результат проведенного ПЦР с пробами №1 и 2

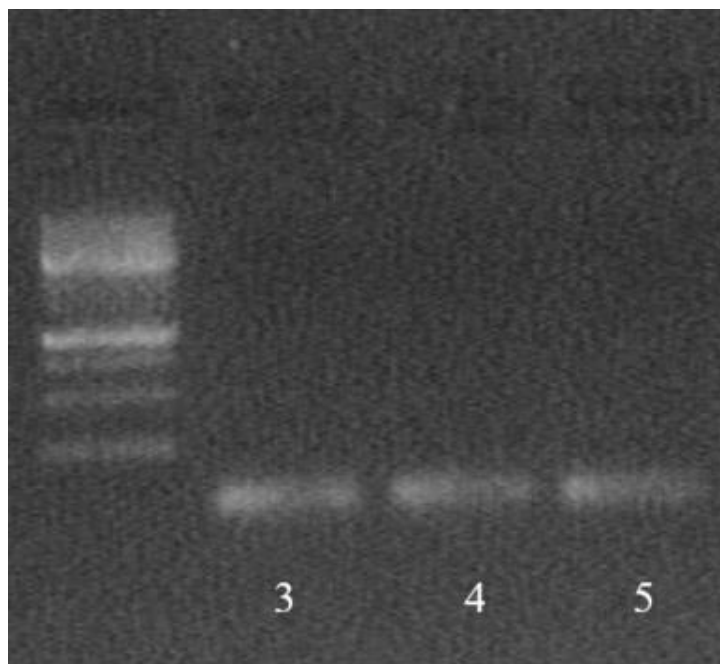


Рисунок 31 – Положительный результат проведенного ПЦР с пробами №3-5

Исходя из проведенной реакции видно, что подобранные нами праймеры не дают ложноположительный результат с другими вирусами из семейства *Adenoviridae*, и выявляют НК ВГЭИ в различных органах зараженной индейки.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Индейководческая промышленность в Российской Федерации на данный момент является одной из самых перспективных развивающихся отраслей сельского хозяйства. Благодаря такой тенденции в магазинах появляется всё больше различной продукции из мяса индейки, и цена на неё не такая высокая как было еще 5-10 лет назад. Также мясо индейки гипоаллергенно [29,32], имеет минимальное количество вредных жиров и насыщено белком, витаминами и различными макро, и микроэлементами, что позволяет применять их в пищу не только среднестатистическому человеку, но и детям начиная с грудного возраста [5,14,20,21], а также людям, имеющим проблемы с желудочно-кишечным трактом [9,30].

К сожалению, в Российской Федерации отсутствуют свои прародительские линии тяжелых мясных кроссов индейки и, соответственно завоз родительских линий происходил из-за рубежа, благодаря этому повысился темп развития индейководства, но также с этим повысились эпизоотические риски. Вместе с развитием этой отрасли в России появились и специфические болезни индеек, одной из которых является геморрагический энтерит индеек.

В Российской Федерации существует ограниченное количество мест, где начали исследовать ГЭИ. Данная диссертация является первой полноценной работой в России по изучению ВГЭИ, циркулирующего нашей стране и разработок способов его диагностики.

При изучение макроскопических изменений у 40 индеек кросса «БИГ-6» было выявлено: как гипертрофия белой пульпы селезёнки, также и её атрофия, кровоизлияния в клоакальной сумке, дуоденит, гепатит и атрофия тимуса. Полученные данные частично коррелирует с данными Громова И.Н., который пишет: «Слизистая оболочка кишечника темно-красного цвета, отечная, матовая. В некоторых случаях она покрыта плотными, отрубьевидными наложениями желтого цвета (фибринозно-некротическое воспаление). Патологоанатомические изменения чаще всего развиваются в центральной части тонкой кишки, однако в

тяжелых случаях встречаются и на периферии, а также в 12-перстной и подвздошной кишках. Селезенка у инфицированных птиц обычно увеличивается в размере, становится рыхлой и мраморной или пятнистой (из-за кровоизлияний). Легкие в состоянии острой венозной гиперемии и отека. Кроме того, наблюдаются увеличение печени, точечные и пятнистые кровоизлияния в различных органах и тканях [6]. Результаты исследования изменений в селезенке полностью совпадает с исследованиями Хлыпа Д.Н., который пишет: «селезёнка обычно увеличивается за счет пролиферативных процессов, происходящих в белой пульпе, и резкого полнокровия красной: последняя становится рыхлой и имеет мраморный или крапчатый (из-за наличия точечных кровоизлияний) вид. Однако часто у погибших индеек можно встретить атрофию селезенки, связанную с выбросом запасов крови в общий кровоток» [17].

По исследованиям Carlson H.C. et al., Gómez-Villamandos J.C. et al., и Itakura S. et al.: «Большинство макроскопических изменений локализуются в селезенке и кишечнике. Среди сопутствующих изменений наиболее часто наблюдаются аномалии в селезенке, а самая высокая вирусная нагрузка обычно обнаруживается именно в селезенке. Можно заметить значительные различия во внешнем виде селезенки; иногда она выглядит бледной и уменьшенной в размерах, а иногда заметно увеличена, сильно переполнена кровью и может иметь пурпурный оттенок и сероватые некротические очага. Умеренная и выраженная спленомегалия обычно связана с гипертрофией белой пульпы. Кишечник, может быть, заметно растянут и заполнен несвернувшейся кровью [47,71,79].

По результатам гистологических исследований было обнаружено многочисленные мелкие очаги бесцветных тканевых структур во всех представленных иммунокомпетентных органах зараженных птиц. Однако не стоит игнорировать явную гиперплазию белой пульпы селезёнки в группе заражения и заметное сглаживание границ коркового и мозгового вещества в лимфоидных фолликулах тимуса, а оболочки в двенадцатиперстной кишке, соответственно, различимы. Однако слизистая оболочка, выше крипт, практически полностью разрушена. Ворсинки крайне тяжело различимы, ввиду некротизации

эпителиальной и собственной пластинки. Наши полученные результаты совпадают с исследованиями Pierson FW, Fitzgerald SD, которые в своей статье описывают следующие изменения: «Гистопатологические изменения наиболее выражены в лимфоретикулярной системе и желудочно-кишечном тракте. В селезенке в результате преходящей иммуносупрессии могут наблюдаться гиперплазия белой пульпы, лимфоидный некроз, апоптоз в зародышевых центрах и внутриядерные включения в лимфоретикулярных клетках. В тимусе и клоакальной сумке наблюдается лимфоидное истощение как в корковом, так и в мозговом веществе. Поражения желудочно-кишечного тракта включают застойные явления в слизистой оболочке кишечника, дегенерацию эпителия ворсинок и кровоизлияния на верхушках ворсинок» [111].

При изучение наиболее подходящего возраста индейки для заражения ВГЭИ, было сформировано 4 группы различного возраста индеек кросса «БИГ-6»: 4,5,6,7 недель жизни + контрольная группа, все группы содержались в равных условиях и заражали их одним и тем же штаммом ВГЭИ в одной и той же дозировке. После убоя и проведенных исследований, выяснилось, что наиболее лучшим возрастом является 4-ая неделя жизни индейки. Затем проводилось изучение через сколько дней после заражения будет пик титра вируса в органах-мишенях. Для этого было сформирована 7 групп + 1 контрольная по 10 голов в каждой индеек кросса «БИГ-6» 28-и дневного возраста. Все группы содержались в равных условиях и заражали их одним и тем же штаммом ВГЭИ в одной и той же дозировке. Убой каждой группы проводили на 2,3,4,5,6,7,8 дни после заражения. После убоя и проведения реакции, было выявлено, что пик вируса в органах-мишенях происходит на 5-6 день после заражения. В аналогичном эксперименте Hussain I et al., получил следующие данные: «Высокий уровень антигена был обнаружен в двенадцатиперстной кишке с 4-го по 9-й день после инфицирования. Пик пришелся на 7-й день после инфицирования, но к 13-му дню после инфицирования уровень антигена резко снизился до неопределяемых значений. Вирусный антиген был впервые обнаружен в 1 из 4 селезенок на очень низком уровне на 2-й день после инфицирования. К 3-му дню после инокуляции вирусный антиген был обнаружен

в селезенке у 4 птиц. К 6-му дню после инокуляции титр антигена достиг пикового значения, а к 15-му дню после инокуляции он стал неопределяемым. Антиген был обнаружен в клоакальной сумке с 1-го по 7-й день после инокуляции и в поджелудочной железе с 4-го по 7-й день после инокуляции. Относительно низкий уровень вирусного антигена был обнаружен в печени и тимусе на 5–7-й день после заражения, а в почках — на 7–11-й день после заражения. В легких ВГЭИ обнаружен не был» [78].

Также одним из актуальных исследований являлась оценка уровня напряженности материнского иммунитета и определения периода полураспада специфических антител к ВГЭИ был сформирована экспериментальная группа из 20 голов индеек кросса «БИГ-6» 2-х суточного возраста. Птица была разделена на две равные подгруппы ($n=10$), для которых была разработана схема отбора цельной крови с целью последующего выделения сыворотки крови. У птиц из 1 подгруппы - отбор крови осуществляли на 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 16 сутки жизни; у 2 подгруппы - 3,5,7,9,11,13,15 и 17 сутки жизни. Количественную оценку титров материнских антител к ВГЭИ в полученных образцах сыворотки крови проводили с помощью ИФА Бест-Вет АТ-HEV (геморрагический энтерит индеек). При исследовании было выявлено плато антител и период полураспада. Аналогов данному эксперименту не было обнаружено как в российских, так и зарубежных источниках.

Одной из ключевых целей данной работы была разработка способов как серологической, так и молекулярно-биологической диагностики ВГЭИ. В России кроме разработанного относительно недавно ИФА-набора для выявления антител к ВГЭИ компанией «Вектор-Бест» [17], и не нашедшего широкого применения разработанный Государственным научным учреждением «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии (ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии)» такой способ диагностики как РНГА, нет других способов диагностики ВГЭИ [19].

Первоначально нами были отработаны методики получения антигена ГЭИ и антител к нему, а также отрицательные контроли. За антиген ГЭИ был использован

супернатант гомогената селезенки индейки 35-ти дневного возраста зараженной перорально в дозе 0,5 мл на голову, а также по 0,1 мл интраназально и интраорбитально, с титром в РДП 1:2, штаммом вируса геморрагического энтерита индеек «DK-24». Антитела получали путем иммунизации индеек живой вакциной «Dindoral» (Merial, Франция) - вакцинация проводилась в 28-и дневном возрасте. Через 4 недели проводили ревакцинации инактивированным вирусом, смешанным с гелем гидроокиси алюминия, после чего отбор сыворотки крови проводился через 5 недель после ревакцинации.

Первым был разработан способ серологической диагностики на примере реакции диффузионной преципитации. Отработаны рабочие разведения антигена ГЭИ и положительной сыворотки крови. Проведены исследования с заранее известными положительным и отрицательными сыворотками крови, а также с различными антигенами других болезней, которые также обладают преципитирующими свойствами и сыворотками к ним. По результатам исследования, сделан вывод, что разработанный способ можно применять как для выявления ВГЭИ, так и для антител к нему.

Вторым разработанным серологическим способом диагностики являлась РЛА для диагностики ГЭИ. Исследования в области разработки такого способа диагностики не были обнаружены ни в отечественных, ни в зарубежных источниках. Однако данная реакция является простым, быстрым и экономичным способом диагностики ГЭИ [31]. Был подобран буферный раствор (трис-HCl), модификация латексных частиц (карбоксилированная), размер латексных частиц (200-400 нм) способ очистки глобулиновой фракции (с помощью сульфата аммония с последующим проведением диализа) и её разведение (1:2-1:16). Была проведена РЛА с положительными и отрицательными пробами, а также с другими вирусами из семейства *Adenoviridae*, для проверки на наличие ложноположительных реакций. По результатам проведённых исследований РЛА можно использовать для экспресс определения ВГЭИ. Благодаря этому, ветеринарные специалисты индейководческих птицефабрик могут в течение 10

минут понять, циркулирует ли у них на предприятие ВГЭИ или птица подвержена другой болезни.

Молекулярно-биологический способ диагностики на примере ПЦР в классическом варианте был разработан для проведения исследований с тем патологическим материалом, где может содержаться достаточно малое количество ВГЭИ, которое не будет выявляться в РДП или РЛА.

Было проведено изучение генетической последовательности белков (Нехон, ORF1, E3, fib) ВГЭИ, отвечающих за фактор вирулентности [41,70]. Из всех белков, как наиболее консервативный был отобран белок Нехон, также он отвечает за иммуногенность. При изучение генетической последовательности белка Нехон у более чем десяти вакцинных и патогенных штаммов была выбрана наиболее консервативная часть (около 200 нуклеотидов) и к ней были подобраны праймеры. Также исходя из опыта и изучения литературы были подобраны этапы амплификации, состав геля и буфера. Были проведены исследования с положительными и отрицательными пробами, а также с другими вирусами из семейства Adenoviridae, для проверки праймеров на наличие ложноположительных реакций. По результатам проведенных испытаний данный разработанный способ можно применять для диагностики ВГЭИ.

Завершая обсуждения результатов исследования, можно сделать вывод, что был проведен ряд различных экспериментов для изучения биологических свойства ВГЭИ, выделенного в России. А также разработано 3 способа диагностики, один из которых может применяться как для определения ВГЭИ, так и для антител к нему. Благодаря нескольким вариациям, ветеринарные специалисты смогут выбрать наиболее подходящий способ диагностики исходя из укомплектованности оборудованием и материальным обеспечением.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При патологоанатомическом исследовании у всех индеек (40 голов – 100%) в селезёнке была выявлена атрофия или гипертрофия с характерным мраморным рисунком; у 11 (27,5%) – гипертрофия клоакальной сумки с точечными кровоизлияниями; у 22 индеек (55%) – дуоденит с характерной гиперемией слизистых оболочек; у 4 индеек (10%) – гепатит; у 30 индеек (75%) – гипотрофия и атрофия тимуса с точечными кровоизлияниями. При гистологическом исследовании отобранных образцов селезенки, двенадцатиперстной кишки, клоакальной сумки, тимуса и печени установлены многочисленные мелкие очаги бесцветных тканевых структур; гиперплазия белой пульпы селезенки и заметное сглаживание границ коркового и мозгового вещества в лимфоидных фолликулах тимуса; слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки, выше крипт, практически полностью разрушена, а ворсинки трудно различимы, ввиду некротизации эпителиальной и собственной пластинки.

2. Оптимальный возраст заражения ВГЭИ является 4-я неделя. В главном органе-мишени (селезёнке) определяемый титр антигена в серологической реакции проявляется на 2 день после заражения (1:4) и достигает своего пика на 5-6 день (1:32), как и в двенадцатиперстной кишке (1:8-1:16).

3. Плато материнских антител сохраняется до 3-х дней. Период полураспада материнских антител у кросса «Биг- 6» составляет 2,5 дня.

4. Антитела сыворотки крови и антиген ВГЭИ для РДП обладают преципитирующими свойствами. Рабочее разведение антигена составляет 1:8, а рабочее разведение положительной сыворотки – 1:4, как наиболее подходящие для определения наличия вируса в патологическом материале, а также для определения титра антител в сыворотки крови.

5. Для диагностики на базе реакции латекс-агглютинации подобран оптимальный буферный раствор для сенсibilизации латексных микросфер (трис-НСl буфер), а также подходящая модификация латексных микросфер с наибольшей адсорбирующей активностью (карбоксилированный латекс), метод получения

глобулиновой фракции (с помощью сульфата аммония с проведением последующего диализа) и разведение очищенной глобулиновой фракции для её адсорбции на латексных частицах (1:2-1:16). Данный способ серологической диагностики выявляет вирус геморрагического энтерита индеек.

6. Подобранные праймеры для определения вируса геморрагического энтерита индеек чувствительны и специфичны. Оптимизированный состав реакционной смеси и температурно-временной режим этапов амплификации обеспечивают воспроизводимую детекцию ДНК вируса геморрагического энтерита индеек в исследуемом биологическом материале.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Основные научные положения работы и результаты исследований рекомендуются использоваться ветеринарными специалистами индейководческих предприятий и диагностических лабораторий, а также для проведения учебного процесса студентов, аспирантов и слушателей курсов повышения квалификации.

Рекомендуем полученные данные использовать при изучении биологических свойства для разработки схем противоэпизоотических мероприятий и планов вакцинации в птицеводческих хозяйствах.

Использование разработанных способов диагностики ВГЭИ позволит своевременно выявлять возбудителя и разрабатывать меры по ликвидации болезни специалистами птицефабрик и диагностических лабораторий.

Результаты диссертационного исследования являются основой для совершенствования диагностики ВГЭИ и позволят снизить риски, связанные с распространением этой болезни.

6 ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты в ходе проведенной работы открывают направления в следующих областях:

1. Изучение биологических свойств ВГЭИ ляжет в основу разработки новых способов специфической профилактики против геморрагического энтерита индеек.
2. Разработка серологических способов диагностики поможет будущим специалистам в создание новых способов диагностики ВГЭИ, например прямой ИФА, РИЭОФ, МФА.
3. Разработка молекулярно-биологического способа диагностики является основой для дальнейшей модификации и разработки ПЦР в реальном времени.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает благодарность своему научному руководителю: академику РАН Джавадову Эдуарду Джавадовичу, за помощь и наставничество. Также автор выражает благодарность Веретенникову В.В., Тарлаvinу Н.В., Вихревой И.Н., за помощь в проведение экспериментов и даче ценных советов. Отдельную благодарность автор выражает коллективу отдела вирусологии ВНИВИП и, в частности, Самусевой Г.Н. и Дубовому А.С. за поддержку и консультацию по возникающим вопросам в ходе исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

IVa2 —промежуточная единица транскрипции в геноме аденовирусов.

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ГЭИ – геморрагический энтерит индеек

ВГЭИ – вирус геморрагического энтерита индеек

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЛА – реакция латекс-агглютинации

РДП – реакция диффузионной преципитации

IFN- γ – гамма-интерферон

CD4+ - кластер дифференцировки 4.

CD8 α —кластер дифференциации 8 альфа.

DL-метионин – синтетический аналог метионина

IL-6 – интерлейкин-6

ВСМ – вируссодержащий материал

ПЭГ 6000 – полиэтиленгликоль 6000

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

НК – нуклеиновая кислота

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

TNF – фактор некроза опухоли

ДПЗ – дней после заражения

РИЭОФ – реакция иммуноэлектроосмофореза

МФА – метод флуоресцирующих антител

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулин, В. А. Болезни птиц / В. А. Бакулин. – Санкт-Петербург: Изд.: В. А. Бакулин, 2006. – 687 с.
2. Болезни птиц: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Ветеринария" / Б. Ф. Бессарабов [и др.]. – Санкт-Петербург [и др.]: Лань, 2007. – 445 с.
3. Вакцина Г. Е. ВАК // Vidal: [сайт]. — URL: <https://www.vidal.ru/veterinar/vaktsina-g-e-vak-30327> (дата обращения: 17.02.2026).
4. Вирсин 228 // Biovac: [сайт]. — URL: <https://biovac.co.il/ru/product/вирсин-228/> (дата обращения: 16.02.2026).
5. Выявление потребительских предпочтений при проектировании мясных консервов для питания детей раннего возраста / А. А. Одинцова, Н. И. Дунченко, В. С. Янковская, С. В. Купцова // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2025. – № 4(401). – С. 152-156.
6. Громов, И. Геморрагический энтерит индеек: клинико-эпизоотические особенности, патоморфология, диагностика / И. Громов // Ветеринарное дело (Минск). – 2023. – № 11. – С. 14-19.
7. Джавадов, Э. Д. Геморрагический энтерит индеек / Э. Д. Джавадов, Д. А. Красков // БИО. – 2021. – № 7(250). – С. 16-19. – EDN RLIIHW.
8. Диагностика геморрагического энтерита индеек с использованием реакции диффузионной преципитации / Д. А. Красков, Э. Д. Джавадов, Н. В. Тарлавин, В. В. Веретенников // Ветеринария Кубани. – 2025. – № 3. – С. 26-28.
9. Диета при болях в кишечнике // Дюспаталин: [сайт]. – URL: <https://duspatalin.ru/poleznaya-informatsiya/dieta-pri-bolyakh-v-kishechnike/> (дата обращения: 20.01.2026).
10. Диндораль — вакцина для индеек // Boehringer Ingelheim: [сайт]. — URL: <https://www.boehringer-ingelheim.com/ru/animalhealth/products/dindoral> (дата обращения: 15.02.2026).

11. Зимняков, В. М. Состояние и перспективы производства и переработки мяса индейки / В. М. Зимняков. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2017. – 184 с.
12. Зинченко, Д. А. Возрастная морфология иммунных органов индеек различных генотипов в постнатальном онтогенезе: специальность 06.02.01 "Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных": диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Зинченко Дмитрий Алексеевич, 2019. – 165 с.
13. Изучение биологических свойств возбудителя геморрагического энтерита индеек / Д. А. Красков, Э. Д. Джавадов, В. В. Веретенников [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 4. – С. 52-58.
14. Исследования производства мяса индейки для продуктов детского питания / Е. Н. Аракчеева, Н. Н. Забашта, Е. Н. Головкин, Е. П. Лисовицкая // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2020. – № 162. – С. 247-259.
15. Макаров, В. В. Международное Эпизоотическое Бюро и Список МЭБ / В. В. Макаров // Российский ветеринарный журнал. – 2017. – № 7. – С. 22-26.
16. Мраморная селезенка фазанов: патогенез, диагностика, лечение и профилактика / Э. Д. Джавадов, Д. А. Красков, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // БИО. – 2021. – № 9(252). – С. 4-6.
17. Новый набор в ветеринарной линейке «ИФА-Бест-Вет» // АО «Вектор-Бест»: [сайт]. – URL: <https://vector-best.ru/news/novyy-nabor-v-veterinarnoy-lineyke-ifa-best-vet/> (дата обращения: 20.01.2026).
18. Определение реактивности иммунитета индейки с помощью нитросинего тетразолия / Э. Д. Джавадов, Н. В. Тарлавин, В. В. Веретенников, Д. А. Красков // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сборник научных трудов. Том № 153. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2022. – С. 19-23.
19. Патент № 2469321 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ выявления специфических антител к вирусу геморрагического энтерита

индеек: № 2011144790/15: заявл. 03.11.2011: опубл. 10.12.2012 / Ю. Г. Юшков, В. Н. Афонюшкин, С. В. Леонов [и др.]; заявитель Государственное научное учреждение Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии (ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии).

20. Патиева, А. М. Медико-биологическое обоснование использование мяса индейки для питания детей с 1 года до 3х лет / А. М. Патиева, С. В. Патиева, А. В. Зыкова // Вклад молодых ученых в инновационное развитие АПК России: Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, Пенза, 29–30 октября 2020 года. Том 2. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2020. – С. 196-199.

21. Пекшеева, Е. П. Разработка технологии рубленых полуфабрикатов из мяса индейки и круп для питания детей дошкольного возраста / Е. П. Пекшеева // Студенческая наука и XXI век. – 2022. – Т. 19, № 1-1(22). – С. 145-148.

22. Производство индейки в России продолжит расти // Журнал «Здоровье животных и продовольственная безопасность» (ЗЗР): [сайт]. – URL: <https://zzr.ru/news/proizvodstvo-indeyki-v-rossii-prodolzhit-rasti> (дата обращения: 08.01.2026).

23. Производство индейки в России продолжит расти – эксперт // Специализированное агентство «Спецагро»: [сайт]. – 2025. – URL: <https://specagro.ru/news/202512/proizvodstvo-indeyki-v-rossii-prodolzhit-rasti-ekspert> (дата обращения: 08.01.2026).

24. Разработка молекулярно-биологического способа диагностики геморрагического энтерита индеек / Д. А. Красков, Э. Д. Джавадов, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2024. – № 4. – С. 37-39.

25. Разработка реакции латекс-агглютинации для диагностики геморрагического энтерита индеек / Д. А. Красков, Э. Д. Джавадов, В. В. Веретенников [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2025. – № 4. – С. 58-67.

26. Рейтинг ведущих производителей индейки в России в 2023 году // ВНИИПП: официальный сайт. — URL: <https://vniipp.ru/izdaniya/publikatsii-na-sajte/materialy-partnerov/rejting-vedushhih-proizvoditelej-indejki-v-rossii-v-2023-godu/> (дата обращения: 10.01.2026).

27. Россия уверенно лидирует в мировом индейководстве по темпам роста // Аналитический центр Минсельхоза России (ФГБУ «Агроэкспорт»): [сайт]. — 2025. — 28 мая. — URL: <https://aemcx.ru/2025/05/28/rossiya-uverenno-lidiruet-v-mirovom-indejkovodstve-po-tempam-rosta/> (дата обращения: 08.01.2026).

28. Специфическая профилактика геморрагического энтерита индеек / Д. А. Красков, А. С. Дубовой, В. С. Бочкарев, Г. Н. Самусева // SPbVetScience: сборник научных трудов. — Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2025. — С. 27-32.

29. Стефанова, И. Л. Использование мяса индейки при производстве гипоаллергенных продуктов детского питания / И. Л. Стефанова, Л. В. Шахназарова, И. А. Юхина, И. Я. Конь // 3-я международная научно-практическая конференция «Научные и практические аспекты совершенствования качества продуктов детского и геродиетического питания». Том II. — Истра, 2012. — С. 250-252.

30. Учёные выяснили, какое мясо самое полезное // Газета.Ru: [сайт]. — 2023. — 24 нояб. — URL: <https://www.gazeta.ru/science/news/2023/11/24/21777949.shtml> (дата обращения: 20.01.2026).

31. Швец, Ю. В. Реакция агглютинации латекса - экспресс-метод специфической лабораторной диагностики кишечных вирусных инфекций / Ю. В. Швец, В. В. Малышев // Вестник Российской Военно-медицинской академии. — 2018. — № S1. — С. 216-219.

32. Шахназарова, Л. В. Гипоаллергенные продукты на основе белого мяса птицы и коагулированного яичного белка / Л. В. Шахназарова, И. Л. Стефанова, А. Ю. Клименкова // Мясная индустрия. — 2023. — № 3. — С. 30-32.

33. Эпизоотология с микробиологией: учебник для вузов / А. С. Алиев, Ю. Ю. Данко, И. Д. Ещенко [и др.]. – издание 6-е стереотипное. – Санкт-Петербург: Издательство "Лань", 2021. – 432 с.
34. Aboezz Z. R., Mahsoub H., El-Bagoury G., Pierson F. W. In vitro growth kinetics and gene expression analysis of the turkey adenovirus 3, a siadenovirus // *Virus Res.* – 2019. – Vol. 263. – P. 47–54.
35. Alavarez J. M., Ferreira C. S. A., Ferreira A. J. P. Enteric viruses in turkey flocks: a historic review // *Rev. Bras. Cienc. Avic.* – 2014. – Vol. 16. – P. 225–232.
36. Anderson P. J. Factors promoting pathogenicity of influenza virus // *Semin. Respir. Infect.* – 1991. – Vol. 6. – P. 3–10.
37. Arbuckle J. B. R., Parsons D. G., Luff P. R. Hemorrhagic enteritis syndrome of turkeys // *Vet. Rec.* – 1979. – Vol. 104. – P. 435–436.
38. Arnberg N., Mei Y.-F., Wadell G. Fiber Genes of Adenoviruses with Tropism for the Eye and the Genital Tract // *Virology.* – 1997. – Vol. 227. – P. 239–244.
39. Beach N. M. Characterization of Avirulent Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus: A Study of the Molecular Basis for Variation in Virulence and the Occurrence of Persistent Infection / Virginia Polytechnic Institute and State University Virginia Tech. – Blacksburg, VA, USA, 2006.
40. Beach N. M., Duncan R. B., Larsen C. T., Meng X. J., Sriranganathan N., Pierson F. W. Persistent infection of turkeys with an avirulent strain of turkey hemorrhagic enteritis virus // *Avian Dis.* – 2009a. – Vol. 53. – P. 370–375.
41. Beach N. M., Duncan R. B., Larsen C. T., Meng X. J., Sriranganathan N., Pierson F. W. Comparison of 12 turkey hemorrhagic enteritis virus isolates allows prediction of genetic factors affecting virulence // *J. Gen. Virol.* – 2009b. – Vol. 90. – P. 1978–1985.
42. Benkő M., Aoki K., Arnberg N., Davison A. J., Echavarría M., Hess M., Jones M. S., Kaján G. L., Kajon A. E., Mittal S. K., et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae 2022 // *J. Gen. Virol.* – 2022. – Vol. 103. – P. 001721.
43. Brugere Picoux J., Vaillancourt J.-P., Bouzouaia M. Manual of Poultry Diseases. – Paris, France: AFAS, 2015. – English ed.

44. Bunchasak C. Role of dietary methionine in poultry production // J. Poult. Sci. – 2009. – Vol. 46. – P. 169–179.
45. Cardona C. J., Reed W. M., Witter R. L., Silva R. F. Protection of turkeys from hemorrhagic enteritis with a recombinant fowl poxvirus expressing the native hexon of hemorrhagic enteritis virus // Avian Dis. – 1999. – Vol. 43, № 2. – P. 234–244.
46. Cardona C. J., Nazerian K., Reed W. M., Silva R. F. Characterization of a recombinant fowlpox virus expressing the native hexon of hemorrhagic enteritis virus // Virus Genes. – 2001. – Vol. 22. – P. 353–361.
47. Carlson H., Al-Sheikhly F., Pettit J., Seawright G. Virus particles in spleens and intestines of turkeys with hemorrhagic enteritis // Avian Dis. – 1974. – Vol. 18. – P. 67–73.
48. Ceruti R., Valentina D. M., Gavazzi L., Venni A., Ferrazzi V., Grilli G. Haemorrhagic Enteritis Seroconversion in Turkey Breeders: Field Observations // Ital. J. Anim. Sci. – 2007. – Vol. 6. – P. 321–325.
49. Ceva Adenomune II for the active immunization of turkeys against turkey haemorrhagic enteritis // The Poultry Site: [сайт]. — URL: <https://www.thepoultrysite.com/focus/ceva/ceva-adenomune-ii-for-the-active-immunization-of-turkeys-against-turkey-haemorrhagic-enteritis-from-ceva-sante-animale> (date of access: 17.02.2026).
50. Chary P., Rautenschlein S., Sharma J. M. Reduced efficacy of hemorrhagic enteritis virus vaccine in turkeys exposed to avian pneumovirus // Avian Dis. – 2002. – Vol. 46. – P. 353–359.
51. Cobb S., Smith H. The spread of non-OIE-listed avian diseases through international trade of chicken meat: an assessment of the risks to New Zealand. – 2015.
52. Crawford-Miksza L., Schnurr D. P. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues // J. Virol. – 1996. – Vol. 70. – P. 1836–1844.
53. Darbyshire J. H., Peters R. W. Studies on EDS-76 Virus Infection in Laying Chickens // Avian Pathol. – 1980. – Vol. 9. – P. 277–290.

54. Dhama K., Gowthaman V., Karthik K., Tiwari R., Sachan S., Kumar M. A., Palanivelu M., Malik Y. S., Singh R. K., Munir M. Haemorrhagic enteritis of turkeys – current knowledge // *Veterinary Quarterly*. – 2017. – Vol. 37, № 1. – P. 31–42.
55. Diseases of Poultry / ed. by D. E. Swayne [et al.]. — Wiley Online Library: [сайт]. — URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119371199> (date of access: 11.02.2026).
56. Domermuth C. H., Gross W. B. Effect of disinfectants and drying on the virus of hemorrhagic enteritis of turkeys // *Avian Dis.* – 1971. – Vol. 15, № 1. – P. 94–97.
57. Domermuth C. H., Gross W. B., DuBose R. T. Microimmunodiffusion test for hemorrhagic enteritis of turkeys // *Avian Dis.* – 1973. – Vol. 17, № 2. – P. 439–444.
58. Domermuth C. H., Harris J. R., Gross W. B., DuBose R. T. A naturally occurring infection of chickens with a hemorrhagic enteritis/marble spleen disease type of virus // *Avian Dis.* – 1979. – Vol. 23. – P. 479–484.
59. Domermuth C. H., Gross W. B. Haemorrhagic enteritis and related infections // *Diseases of poultry*, 8th ed. / ed. by M. S. Hoftad, H. J. Barnes, B. W. Calnek, W. M. Reid, H. W. Yoder Jr. – Ames (IA): Iowa State University Press, 1984. – P. 511–516.
60. Domermuth C. H., van der Heide L., Faddoul G. P. Pulmonary Congestion and Edema (Marble Spleen Disease) of Chickens Produced by Group II Avian Adenovirus // *Avian Dis.* – 1982. – Vol. 26. – P. 629–633.
61. Fadly A. M., Nazerian K. Evidence for bursal involvement in the pathogenesis of hemorrhagic enteritis of turkeys // *Avian Dis.* – 1982. – Vol. 26. – P. 525–533.
62. Fadly A. M., Nazerian K., Nagaraja K., Below G. Field vaccination against hemorrhagic enteritis of turkeys by a cell-culture live-virus vaccine // *Avian Dis.* – 1985. – Vol. 29. – P. 768–777.
63. Fasina S. O., Fabricant J. In Vitro Studies of Hemorrhagic Enteritis Virus with Immunofluorescent Antibody Technique // *Avian Dis.* – 1982. – Vol. 26. – P. 150–157.

64. Fax P., Lipinski K. S., Esche H., Brockmann D. cAMP-independent activation of the adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A(12S), and the CBP to the E2-CRE // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 8911–8920.
65. Fitzgerald S. D., Reed W. M., Burnstein T. Detection of type II avian adenoviral antigen in tissue sections using immunohistochemical staining // *Avian Dis.* – 1992. – Vol. 36. – P. 341–347.
66. Fujiwara H., Tanaami S., Yamaguchi M., Yoshino T. Histopathology of hemorrhagic enteritis in turkeys // *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo).* – 1975. – Vol. 15, № 2. – P. 68–75.
67. Gale C., Wyne J. W. Preliminary observations on hemorrhagic enteritis of turkeys // *Poult. Sci.* – 1957. – Vol. 36. – P. 1267–1270.
68. Gerber P. F., Hossain M. F., Reynolds P., Hoang P., Burgess S. K., Renz K., McMillan M., Katz M. E., Walkden-Brown S. W. Propagation of an Avirulent Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus Isolate in Chickens // *Avian Dis.* – 2018. – Vol. 62, № 1. – P. 6–13.
69. Gerber P. F., Spatz S., Gray P., Alfirevich S., Walkden-Brown S. W. Circulation and Molecular Characterization of Hemorrhagic Enteritis Virus in Commercial Turkey and Meat Chicken Flocks in Australia // *Avian Dis.* – 2022. – Vol. 66, № 1. – P. 53–59.
70. Giovanardi D., Lupini C., Pesente P., Rossi G., Ortali G., Catelli E. Longitudinal Field Studies of Avian Metapneumovirus and Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus in Turkeys Suffering from Colibacillosis Associated Mortality // *Vet. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 38. – P. 129–137.
71. Gomez-Villamandos J. C., Carranza J., Sierra M. A., Carrasco L., Hervas J., Blanco A., Fernandez A. Hemorrhagic enteritis by adenovirus-like particles in turkeys: a possible pathogenic mechanism // *Avian Dis.* – 1994. – Vol. 38. – P. 647–652.
72. Greber U. F., Suomalainen M., Stidwell R. P., Boucke K., Ebersold M. W., Helenius A. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16. – P. 5998–6007.

73. Gross W. B., Moore W. E. Hemorrhagic enteritis of turkeys // *Avian Dis.* – 1967. – Vol. 11, № 2. – P. 296–307.
74. Hess M., Raue R., Hafez H. M. PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus // *J. Virol. Methods.* – 1999. – Vol. 81. – P. 199–203.
75. Hoang P., Gerber P. F., Reynolds P., McMillan M., Gray P., Walkden-Brown S. W. Preliminary Testing in Turkeys of the Safety and Efficacy of a Putative Haemorrhagic Enteritis Virus Vaccine // *Aust. Vet. J.* – 2019. – Vol. 97. – P. 323–332.
76. Hossain M. F., McMillan M., Katz M. E., Walkden-Brown S. W., Gerber P. F. Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus Can Be Titrated but Not Propagated in Chicken Embryos // *Avian Dis.* – 2019. – Vol. 63, № 1. – P. 84–89.
77. Hosseini S. A., Zaghari M., Lotfollahian H., Shivazad M., Moraviaj H. Reevaluation of methionine requirement based on performance and immune responses in broiler breeder hens // *J. Poult. Sci.* – 2012. – Vol. 49. – P. 26–33.
78. Hussain I., Choi C. U., Rings B. S., Shaw D. P., Nagaraja K. V. Pathogenesis of hemorrhagic enteritis virus infection in turkeys // *Zentralbl. Veterinarmed. B.* – 1993. – Vol. 40. – P. 715–726.
79. Itakura C., Carlson H. C., Lang G. N. Experimental transmission of hemorrhagic enteritis of turkeys // *Avian Pathol.* – 1974. – Vol. 3. – P. 279–292.
80. Jankowski J., Kubińska M., Zduńczyk Z. Nutritional and immunomodulatory function of methionine in poultry diets – a review // *Ann. Anim. Sci.* – 2014. – Vol. 14. – P. 17–32.
81. Jankowski J., Kubińska M., Juśkiewicz J., Czech A., Ognik K., Zduńczyk Z. Effect of different dietary methionine levels on the growth performance and tissue redox parameters of turkeys // *Poult. Sci.* – 2017. – Vol. 96. – P. 1235–1243.
82. Jucker M. T., McQuiston J. R., Van Den Hurk J. V., Boyle S. M., Pierson F. W. Characterization of the haemorrhagic enteritis virus genome and the sequence of the putative penton base and core protein genes // *J. Gen. Virol.* – 1996. – Vol. 77. – P. 469–479.

83. Kaboudi K. Virus-Induced Immunosuppression in Turkeys (Meleagris Gallopavo): A Review // *Open Vet. J.* – 2019. – Vol. 9. – P. 349–360.
84. Kleine A., Hafez H. M., Lüscho D. Investigations on Aviadenoviruses Isolated from Turkey Flocks in Germany // *Avian Pathol.* – 2017. – Vol. 46. – P. 181–187.
85. Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Śmiałek M., Pestka D. Effect of infection of turkeys with haemorrhagic enteritis adenovirus isolate on the selected parameters of cellular immunity and the course of colibacillosis // *Pol. J. Vet. Sci.* – 2012. – Vol. 15. – P. 215–220.
86. Kubińska M., Tykałowski B., Koncicki A., owski J. Biochemical and immunological responses of young turkeys to vaccination against *Ornithobacterium rhinotraheale* and different levels of dietary methionine // *Pol. J. Vet. Sci.* – 2015. – Vol. 18. – P. 807–816.
87. Kumar P., Hurk J. V. D., Ayalew L. E., Gaba A., Tikoo S. K. Proteomic analysis of purified turkey adenovirus 3 virions // *Vet. Res.* – 2015. – Vol. 46. – P. 79.
88. Liu H., Naismith J. H., Hay R. T. Adenovirus DNA replication // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2003. – Vol. 272. – P. 131–164.
89. Lobová D., Celer V. Expression and serological reactivity of hemorrhagic enteritis virus hexon protein // *Folia Microbiol.* – 2016. – Vol. 61. – P. 227–232.
90. Mandelli G., Mandelli G., Rampin T., Guidobono L. C., Gallazzi D. Enterite Emorragica Da Adenovirus Neltacchino // *Clin. Vet.* – 1977. – Vol. 100. – P. 437–447.
91. McDougall J. S. Hemorrhagic enteritis of turkeys // *Vet. Rec.* – 1980. – Vol. 106. – P. 291.
92. McFerran J. B., Smyth J. A. Avian adenoviruses // *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* – 2000. – Vol. 19, № 2. – P. 589–601.
93. Mirzaaghatabar F., Saki A. A., Zamani P., Aliarabi H., Hemati Matin H. R. Effect of different levels of diet methionine and metabolisable energy on broiler performance and immune system // *Food Agr. Immunol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 93–103.
94. Moura-Alvarez J., Chacon J. V., Scanavini L. S., Nunez L. F. N., Astolfi-Ferreira C. S., Jones R. C., Ferreira A. P. Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: single

and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease // *Poult. Sci.* – 2013. – Vol. 92. – P. 945–955.

95. Moura-Alvarez J., Nunez L. F., Astolfi-Ferreira C. S., Knobl T., Chacon J. L., Moreno A. M., Jones R. C., Ferreira A. J. P. Detection of enteric pathogens in Turkey flocks affected with severe enteritis, in Brazil // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2014. – Vol. 46. – P. 1051–1058.

96. Musa L., Rapi M. C., Franciosini M. P., Lupini C., Catelli E., Addis M. F., Grilli G. Turkey Hemorrhagic Enteritis (THE): A Short Overview // *Pathogens.* – 2024. – Vol. 13, № 8. – P. 663.

97. Nagaraja K. V., Kang S. Y., Newman J. A. Immunosuppressive effects of virulent strain of hemorrhagic enteritis virus in turkeys vaccinated against Newcastle disease // *Poult. Sci.* – 1985. – Vol. 64. – P. 588–590.

98. Nazerian K., Fadly A. M. Further studies on in vitro and in vivo assays of hemorrhagic enteritis virus (HEV) // *Avian Dis.* – 1987. – Vol. 31. – P. 234–240.

99. Nazerian K., Lee L. F., Payne W. S. Structural polypeptides of type II avian adenoviruses analyzed by monoclonal and polyclonal antibodies // *Avian Dis.* – 1991. – Vol. 35. – P. 572–578.

100. Norton R. A., Skeeles J. K., Newberry L. A. Evaluation of the interaction of *Eimeria meleagrimitis* with hemorrhagic enteritis virus or marble spleen disease virus in turkeys // *Avian Dis.* – 1993. – Vol. 37. – P. 290–294.

101. Ongor H., Bulut H., Cetinkaya B., Akan M., Tonbak S., Mor S. K., Goyal S. M. Detection of astrovirus, coronavirus and haemorrhagic enteritis virus in turkeys with poult enteritis mortality syndrome in Turkey // *J. Poult. Sci.* – 2015. – Vol. 52. – P. 232–237.

102. Ossa J. E., Bates R. C., Schurig G. G. Hemorrhagic enteritis in turkeys: purification and quantification of the virus // *Avian Dis.* – 1983a. – Vol. 27. – P. 235–245.

103. Ossa J. E., Alexander J., Schurig G. G. Role of splenectomy in prevention of hemorrhagic enteritis and death from hemorrhagic enteritis virus in turkeys // *Avian Dis.* – 1983b. – Vol. 27, № 4. – P. 1106–1111.

104. Ostapchuck P., Hearing P. Minimal cis-acting elements required for adenovirus genome packaging // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 5127–5135.
105. Palya V., Nagy M., Glávits R., Ivanics É., Szalay D., Dán A., Suveges T., Markos B., Harrach B. Investigation of field outbreaks of turkey haemorrhagic enteritis in Hungary // *Acta Veterinaria Hungarica.* – 2007. – Vol. 55. – P. 135–149.
106. Pardo-Mateos A., Young C. S. H. A 40 kDa isoform of the type 5 adenovirus IVa2 protein is sufficient for virus viability // *Virology.* – 2004a. – Vol. 324. – P. 151–164.
107. Pardo-Mateos A., Young C. S. H. Adenovirus IVa2 protein plays an important role in transcription from the major late promoter in vivo // *Virology.* – 2004b. – Vol. 327. – P. 50–59.
108. Park I., Pasquetti T. J., Malheiros R. D., Zheng L., Ferket P., Kim S. W. Effect of grade L-methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of turkey poults compared with conventional DL-methionine // *J. Anim. Sci.* – 2016. – Vol. 94, Suppl. 2. – P. 93.
109. Parker S. F., Felzien L. K., Perkins N. D., Imperiale M. J., Nabel G. J. Distinct domains of adenovirus E1A interact with specific cellular factors to differentially modulate human immunodeficiency virus transcription // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71. – P. 2004–2012.
110. Pertile T. L., Sharma J. M., Walser M. M. Reovirus Infection in Chickens Primes Splenic Adherent Macrophages to Produce Nitric Oxide in Response to T Cell-Produced Factors // *Cell. Immunol.* – 1995. – Vol. 164. – P. 207–216.
111. Kulon F. W., Fitzgerald S. D. Hemorrhagic enteritis and related infections // *Diseases of poultry*, 13th ed. / ed. by D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, V. Nair. – Ames: Iowa State University Press, 2013. – P. 237–247.
112. Pitcovski J., Mualem M., Rei-Koren Z., Krispel S., Shmueli E., Peretz Y., Gutter B., Gallili G. E., Michael A., Goldberg D. The Complete DNA Sequence and Genome Organization of the Avian Adenovirus, Hemorrhagic Enteritis Virus // *Virology.* – 1998. – Vol. 249. – P. 307–315.

113. Pitcovski J., Fingerut E., Gallili G., Eliahu D., Finger A., Gutter B. A subunit vaccine against hemorrhagic enteritis adenovirus // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – P. 4697–4702.
114. Pomeroy B. S., Fenstermacher R. Hemorrhagic enteritis in turkeys // *Poult. Sci.* – 1937. – Vol. 16. – P. 378–382.
115. Poss P. E. Turkey industry strategies for control of respiratory and enteric diseases // *Poult. Sci.* – 1998. – Vol. 77. – P. 1181–1185.
116. Quaglia G., Di Francesco A., Catelli E., Mescolini G., Lupini C. Turkey Adenovirus 3: ORF1 Gene Sequence Comparison between Vaccine-like and Field Strains // *Vet. Res. Commun.* – 2023. – Vol. 47. – P. 2307–2313.
117. Rautenschlein S., Sharma J. M. Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys // *Dev. Comp. Immunol.* – 2000a. – Vol. 24. – P. 237–246.
118. Rautenschlein S., Suresh M., Sharma J. M. Pathogenic avian adenovirus type II induces apoptosis in turkey spleen cells // *Arch. Virol.* – 2000b. – Vol. 145. – P. 1671–1683.
119. Razmyar J., Peighambari S. M. Isolation and Characterization of a Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus from Turkey // *Acta Virol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 271–276.
120. Reiss C. S., Komatsu T. Does Nitric Oxide Play a Critical Role in Viral Infections? // *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72. – P. 4547–4551.
121. Rothe B., Roggentin P., Schauer R. The sialidase gene from *Clostridium septicum*: Cloning, sequencing, expression in *Escherichia coli* and identification of conserved sequences in sialidases and other proteins // *Mol. Genet. Genom.* – 1991. – Vol. 226. – P. 190–197.
122. Rux J. J., Burnett R. M. Type-Specific Epitope Locations Revealed by X-Ray Crystallographic Study of Adenovirus Type 5 Hexon // *Mol. Ther.* – 2000. – Vol. 1. – P. 18–30.

123. Rux J. J., Kuser P. R., Burnett R. M. Structural and Phylogenetic Analysis of Adenovirus Hexons by Use of High-Resolution X-Ray Crystallographic, Molecular Modeling, and Sequence-Based Methods // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 9553–9566.
124. Saif Y. M. Infectious Bursal Disease and Hemorrhagic Enteritis // *Poult. Sci.* – 1998. – Vol. 77. – P. 1186–1189.
125. Shah J. D., Scharber S. K., Cardona C. J. Development and Application of Quantitative Real-Time PCR for the Rapid Detection of Hemorrhagic Enteritis Virus in Tissue Samples // *Avian Dis.* – 2013. – Vol. 57. – P. 300–302.
126. Sharma J. M. Hemorrhagic enteritis of turkeys // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1991. – Vol. 30. – P. 67–71.
127. Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication // *Fields virology*, 3rd ed. / ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley. – Philadelphia: Lippincott – Raven, 1996. – P. 2111–2148.
128. Singh A. K., Berbís M. Á., Ballmann M. Z., Kilcoyne M., Menéndez M., Nguyen T. H., Joshi L., Cañada F. J., Jiménez-Barbero J., Benkő M., et al. Structure and sialyllactose binding of the carboxyl-terminal head domain of the fibre from a Siadenovirus, Turkey Adenovirus 3 // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1–22.
129. Singh M., Shmulevitz M., Tikoo S. K. A newly identified interaction between IVa2 and pVIII proteins during porcine adenovirus type 3 infection // *Virology*. – 2005. – Vol. 336. – P. 60–69.
130. Smith K. S. Understanding hemorrhagic enteritis // *Gobbles*. – 1981. – Vol. 35. – P. 4–14.
131. Stewart P., Fuller S., Burnett R. Difference imaging of adenovirus: Bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – P. 2589–2599.
132. Suresh M., Sharma J. M. Pathogenesis of type II avian adenovirus infection in turkeys: in vivo immune cell tropism and tissue distribution of the virus // *J. Virol.* – 1996. – Vol. 70. – P. 30–36.
133. Swennen Q., Geraert P. A., Mercier Y., Everaert N., Stinckens A., Willemsen H., Li Y., Decuypere E., Buyse J. Effects of dietary protein content and 2-

hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens // Br. J. Nutr. – 2011. – Vol. 106. – P. 845–1854.

134. Thachil A. J., Nagaraja K. V. Effects of hemorrhagic enteritis virus infection in the development of clostridial dermatitis in turkeys // Proc. of American Association of Avian Pathologists, 150th American Veterinary Medical Association annual meetings, July 19–23. – Chicago (IL), 2013. – P. 54.

135. Tham V. L., Critchley K. L. Haemorrhagic enteritis syndrome of turkeys // Aust. Vet. J. – 1981. – Vol. 57. – P. 353–354.

136. The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. – Rome, Italy: FAO; IFAD; New York, NY, USA: UNICEF; Rome, Italy: WFP; Geneva, Switzerland: WHO, 2023.

137. Turkey Hemorrhagic Enteritis // Poultrymen: [сайт]. — URL: <https://www.poultrymed.com/Templates/showpage.asp?DBID=1&LNGID=1&TMID=87&FID=1640> (date of access: 12.02.2026).

138. Tykałowski B., Koncicki A. Effect of Immunomodulation in Turkeys Infected with Haemorrhagic Enteritis Virus on the Percentage of CD4⁺ and CD8 α ⁺ T Lymphocyte Subpopulations Synthesising IFN- γ // J. Vet. Res. – 2022. – Vol. 66, № 4. – P. 537–547.

139. Tykałowski B., Śmiałek M., Koncicki A., Ognik K., Zduńczyk Z., Jankowski J. The Immune Response of Young Turkeys to Haemorrhagic Enteritis Virus Infection at Different Levels and Sources of Methionine in the Diet // BMC Vet. Res. – 2019. – Vol. 15. – P. 387.

140. Van den he J. V., van Drunen Littel-van den Hurk S. Characterization of group II avian adenoviruses with a panel of monoclonal antibodies // Can. J. Vet. Res. – 1988. – Vol. 52. – P. 458–467.

141. Vedenov D., Pesti G. M. An economic analysis of a methionine source comparison response model // Poult. Sci. – 2010. – Vol. 89. – P. 2514–2520.

142. Virus Taxonomy / ed. by C. M. Fauquet [et al.]. — 1st ed. — Elsevier Shop: [сайт]. — URL: <https://shop.elsevier.com/books/virus-taxonomy/fauquet/978-0-08-057548-3> (date of access: 13.02.2026).

143. Von Itzstein M., Dyason J. C., Oliver S. W., White H. F., Wu W.-Y., Kok G. B., Pegg M. S. A Study of the Active Site of Influenza Virus Sialidase: An Approach to the Rational Design of Novel Anti-influenza Drugs // *J. Med. Chem.* – 1996. – Vol. 39. – P. 388–391.
144. Willemsen H., Swennen Q., Everaert N., Geraert P. A., Mercier Y., Stinckens A., Decuypere E., Buyse J. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxyl analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormonal levels, and the redox status of broiler chicken exposed to high temperatures // *Poult. Sci.* – 2011. – Vol. 90. – P. 2311–2320.
145. Willke T. Methionine production – a critical review // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 98. – P. 9893–9921.
146. Winterol V. G. Einigefalle von haemorrhagischer enteritis der pute // *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* – 1977. – Vol. 90. – P. 145–148.
147. Woolcock P. R., Shivaprasad H. L. Electron microscopic identification of viruses associated with poult enteritis in turkeys grown in California 1993–2003 // *Avian Dis.* – 2008. – Vol. 52. – P. 209–213.
148. Yang L., Connaris H., Potter J. A., Taylor G. L. Structural characterization of the carbohydrate-binding module of NanA sialidase, a pneumococcal virulence factor // *BMC Struct. Biol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 15.
149. Zhang W., Arcos R. Interaction of the adenovirus major core protein precursor, pVII, with the viral DNA packaging machinery // *Virology.* – 2005. – Vol. 334. – P. 194–202.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Патент на штамм вируса геморрагического энтерита

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) RU (11) 2 853 352 (13) C1

(51) МПК
C12N 7/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 7/00 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2024137358, 11.12.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.12.2024

Дата регистрации:
23.12.2025

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 11.12.2024

(45) Опубликовано: 23.12.2025 Бюл. № 36

Адрес для переписки:
196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5,
ФГБОУ ВО СПбГУВМ, в отдел организации
НИОКР, Понамарёву В.С.

(72) Автор(ы):
Красков Дмитрий Андреевич (RU),
Джавадов Эдуард Джавадович (RU),
Вихрева Ирина Николаевна (RU),
Тарлави́н Николай Владимирович (RU),
Веретенников Владислав Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Санкт-Петербургский
государственный университет ветеринарной
медицины" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Хлып Д.Н. Аденовирусные
инфекции: геморрагический энтерит индеек,
БИО, 2019, N 3(222), с. 16-18. Джавадов Э.Д.
и др. Геморрагический энтерит индеек, БИО.,
2021, N 7(250), с. 16-19. RU 2118539 C1,
10.09.1998. ALAVAREZ J. M., et al, Enteric
viruses in turkey flocks: a historic review, Rev.
Bras. Cienc. Avic., 2014., vol. 16 Nr 3. 16., p. (см.
прод.)

(54) Штамм вируса геморрагического энтерита индеек "DK-24"

(57) Реферат:
Изобретение относится к области
биотехнологии. Изобретение представляет собой
штамм вируса геморрагического энтерита индеек
«DK-24», семейства Adenoviridae, рода Siadenovirus,
депонированный в государственной коллекции
штаммов - возбудителей особо опасных болезней,
используемых в ветеринарии и животноводстве
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» под номером 110,
для производства диагностикумов и
инактивированных вакцин. Изобретение может
быть использовано при производстве антигена и
иммунной сыворотки для постановки реакции
диффузионной преципитации (РДП), реакции
агглютинации латексом (РАЛ),
иммуноферментного анализа (ИФА) с целью
лабораторной диагностики геморрагического
энтерита индеек и для изобретения
инактивированной и рекомбинантной вакцины
для специфической профилактики
геморрагического энтерита индеек.

(56) (продолжение):
225-232, найдено в Интернет 27.05.2025, адрес сайта: DOI: 10.1590 / 1516-635x1603225-232. Ермолаева Ю.А. и
др. Вакцинопрофилактика в практике врача, учебное пособие, ТОМСК, Издательство СибГМУ 2023, с. 10-
11.

RU 2 853 352 C 1

RU 2 853 352 C 1

Стр.: 1

Приложение 2. База данных способов серологической диагностики

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ  ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ		RU2025622616
Номер регистрации (свидетельства): 2025622616 Дата регистрации: 18.06.2025 Номер и дата поступления заявки: 2025621982 14.05.2025 Дата публикации и номер бюллетеня: 18.06.2025 Бюл. № 6 Контактные реквизиты: нет	Автор(ы): Красков Дмитрий Андреевич (RU), Джавадов Эдуард Джавадович (RU), Веретенников Владислав Валерьевич (RU), Тарлаван Николай Владимирович (RU), Вихрева Ирина Николаевна (RU) Правообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины" (RU), Красков Дмитрий Андреевич (RU)	
Название базы данных: «База данных способов серологической диагностики геморрагического энтерита индеек с помощью реакции диффузной преципитации (включая авторский)»		
Реферат: База данных описывает сущность разработанного способа диагностики ГЭИ, в основе которого лежит создание РДП набора на ГЭИ, который раньше не был разработан и не был зарегистрирован в Российской Федерации. Структурными единицами базы данных являются описательные элементы. База данных включает в себя описание различных методик (в т.ч. авторских), сгруппированных по принципу названия метода, алгоритма его исполнения, дополнительных условий реализации и преимуществ/недостатков. База данных может применяться в клинической ветеринарной практике, также может быть использована в ветеринарных вузах для написания диссертационных работ, соответствующих разделов справочных и учебных пособий, а также в лекционном материале и на практических занятиях. Тип ЭВМ: IBM PC-совместимая архитектура; ОС: Windows XP/7/10/11.		
Вид и версия системы управления базой данных: Microsoft Visual FoxPro		
Объем базы данных: 167 КБ		

Приложение 3. Справка о депонировании



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Департамент ветеринарии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»)

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП –
166001001

«16» 08 2024 г.

№ 110/89

СПРАВКА О ДЕПОНировании

Государственная коллекция штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» осуществила депонирование штамма по форме «Хранение»

Депозитор: ООО НПК «АВИСТАР»

Название штамма: Вирус геморрагического энтерита индеек «DK-24»

Таксономия, описание штамма: Adenoviridae/Siadenovirus/Turkey hemorrhagic enteritis virus
семейство/ род/ вид

Штамм выделен: в Ленинградской обл. на участке фермера, в марте 2024 г., Э.Д. Джавадовым и Д.А. Красковым, у индейки
где, когда, кем, источник выделения

Дата депонирования: 26.08.2024 г.

Орган по депонированию: ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»

Назначение штамма: эпизоотический

Регистрационный номер: № 110

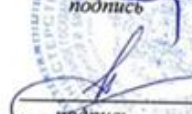
Штамм принят «22» августа 2024 г. в Государственную коллекцию штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве, в замороженном виде, в количестве 5 (пять) пенициллиновых флаконов по 3 см³, с приложением паспорта.

Срок депонирования штамма вируса геморрагического энтерита индеек «DK-24»: 3 (три) года.

Врио директора ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»

Начальник отдела – Государственная
коллекция микроорганизмов


подпись
Мингалеев Д.Н.
Ф.И.О.


подпись
Артемьева Е.А.
Ф.И.О.

Приложение 4. Акт апробации результатов


DAMATE
 ООО «ПензаМолИнвест»
 г. Пенза

Утверждаю
 Начальник Централизованной лаборатории
 Д.Г. Губанов
 12.04.2024 г.


А К Т

О результатах применения набора для диагностики геморрагического энтерита индеек в реакции диффузионной преципитации (далее РДП) в Ветеринарной диагностической лаборатории ООО «ПензаМолИнвест» ГК «Дамате» за период с 22.04.2024 по 25.04.2024 г.

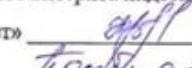
Мы, нижеподписавшиеся заведующий лаборатории Настина Юлия Владимировна и ветеринарный врач Пособцева Надежда Николаевна составили настоящий акт о результатах проверки набора для диагностики геморрагического энтерита индеек в РДП в Ветеринарной диагностической лаборатории ООО «ПензаМолИнвест» разработанный аспирантом кафедры эпизоотологии им. Урбана В.П., ФГБОУ ВО СПбГУВМ Красковым Дмитрием Андреевичем.

Данными РДП наборами в период с «22» апреля 2024г. по «25» апреля 2024 г. было исследовано 10 сывороток крови индеек полученных от комплекса по выращиванию индеек ООО «ПензаМолИнвест» с заранее известным положительным титром (более 1:1500 в ИФА) и 10 сывороток крови с отрицательным титром (ниже 1:500 в ИФА). Исследование сывороток крови проводили в соответствии с инструкцией по применению РДП набора. Срок постановки реакции составил 3-е суток с момента раскапывания компонентов в лунки.

Через 3-е суток проводили учёт реакции, все 10 сывороток крови с известным положительным титром прошли в реакции (образовались полосы преципитации), а все 10 сывороток крови с отрицательным титром нет. На момент постановки реакции одновременно с этими сыворотками крови также были поставлены контроли (отрицательные и положительные антитела из набора), с которыми РДП сработала должным образом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

РДП набор для диагностики геморрагического энтерита индеек обладает всеми необходимыми требованиями и свойствами для серологического метода диагностики и рекомендуется как способ диагностики геморрагического энтерита индеек.

Заведующий лабораторией ВДЛ ООО «ПензаМолИнвест»  Ю.В. Настина
 Ветеринарный врач ВДЛ ООО «ПензаМолИнвест»  Н.Н. Пособцева

Приложение 5. Справка о внедрение в учебный процесс

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургский
Государственный университет
ветеринарной медицины»; 196084,
Санкт-Петербург, Ул. Черниговская, д.5

СПРАВКА

О внедрение в учебный процесс результатов
диссертационного исследования Краскова Д.А.

Настоящим подтверждается, что результаты диссертационного исследования Краскова Д.А. «Изучение биологических свойств возбудителя и разработка способов диагностики геморрагического энтерита индеек» обладают высокой актуальностью, и большим практическим интересом и были внедрены в образовательную программу Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский Государственный университет Ветеринарной медицины»;

И.О. Проректора по научной работе
и международным связям
Герасимов Сергей Вадимович



Дата: 23.03.2026

Приложение 6. Заключение экспертов успешности реализации гранта

Общие заключения экспертов и интегральные оценки успешности реализации проекта по результатам экспертизы итогового отчета о выполнении в 2025 году проекта № 24-26-20116 «Разработка отечественных серологических тест-систем для диагностики иммунодепрессивных болезней птиц».

Руководитель проекта: Веретенников Владислав Валерьевич

Организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

Эксперт	Общие заключения экспертов и интегральные оценки успешности реализации проекта
Эксперт 1	Общее заключение по отчету: «План реализации успешно выполнен в полном объеме. Были определены эффективные условия культивирования, концентрации и очистки рекомбинантного белка VP2 и его аналогов вируса инфекционной бурсальной болезни, получены данные по иммуногенности рекомбинантного белка и положительная сыворотка от иммунизированных кур и индеек. Поставлен опыт по применению рекомбинантного белка в качестве компонента вакцины. После вакцинации на 14 день средний титр антител к белку VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни у птиц составлял 1:4 в РДП, что говорит об иммуногенности рекомбинантного белка VP2. Оптимизирован протокол проведения иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного белка. Для создания российского набора на проведение иммуноферментного анализа на выявление антител на белок VP2 вируса ИББ в рамках проекта отработана методика анализа и произведен аналог полистиролового планшета с рекомбинантным белком VP2. Отработана методика получения антигена (вируса геморрагического энтерита индеек) из органов инфицированной птицы и методика получения и очищения специфических антител у индейки. Проведен эксперимент по иммунизации птицы живой вакциной против геморрагического энтерита индеек, для получения очищенных специфических антител против ГЭИ и эксперимент по заражению птицы патогенным штаммом вируса геморрагического энтерита индеек, для выделения антигена из органов птицы. Разработан диагностический набор на определение антител в реакции диффузионной преципитации с использованием гипериммунной сыворотки и антигена (инактивированного вируса геморрагического энтерита индеек), а также диагностический набор на определение антител в реакции латекс-агглютинации с использованием гипериммунной сыворотки, антигена (инактивированного вируса геморрагического энтерита индеек) и карбоксилированного латекса с размером частиц от 200 до 400 нм. Авторами получены справки об апробации разработанных диагностических наборов на промышленных птицеводческих предприятиях Российской Федерации: набор на определение антител к белку VP2 вируса ИББ в реакции диффузионной преципитации на птицефабрике АО "Синявинская" (крупнейшая в Российской Федерации птицефабрика яичного направления, использует зарубежные векторные вакцины на основе белка VP2 вируса ИББ), который поможет сократить затраты на диагностические исследования с использованием наборов зарубежного производства; набор на определение антител к вирусу геморрагического энтерита индеек в реакции диффузионной преципитации в лаборатории ООО «АИЛК «ЭКСПЕРТ», которая входит в ГК Дамате (крупнейший в Российской Федерации производитель мяса индейки). В ходе выполнения работ по гранту были получены прототипы диагностических наборов, которые будут использоваться в промышленном птицеводстве. Для дальнейшей коммерциализации необходима госрегистрация данных наборов на территории Российской Федерации и производить их на базе крупных биофабрик. Заявленные в проекте результаты достигнуты в полном объеме».

	Интегральная оценка успешности реализации проекта: «отлично».
Эксперт 2	Общее заключение по отчету: «-». Интегральная оценка успешности реализации проекта: «отлично».

Приложение 7. Акт лабораторных испытаний

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный научный центр
«Всероссийский научно-исследовательский технологический институт птицеводства»
(ФНЦ «ВНИТИП»)
филиал
«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»
(ВНИВИП)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ВНИВИП филиала
ФНЦ «ВНИТИП»
В.В. Веретенников
«...» 2026 г.
М.П.



А К Т
лабораторных испытаний набора специфических компонентов для
диагностики геморрагического энтерита индеек в реакции
диффузионной преципитации (РДП)

Комиссия в составе старшего научного сотрудника отдела вирусологии Самусевой Г.Н., старшего научного сотрудника отдела вирусологии Дубового А.С., старшего научного сотрудника отдела вирусологии Бочкарева В.С. в период с 21.07.2025 по 25.07.2025г. в условиях отдела вирусологии «Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства» (ВНИВИП) - филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» провела лабораторные испытания набора специфических компонентов для диагностики геморрагического энтерита индеек в реакции диффузионной преципитации (РДП), разработанный аспирантом кафедры эпизоотологии им. Урбана В.П., ФГБОУ ВО СПбГУВМ Красковым Д. А.

В ходе комиссионного испытания специфические компоненты набора проверили в РДП на активность и специфичность. Затем провели исследования 20 проб полевых сывороток крови индеек, полученных из индейководческой птицефабрики, находящейся в Приволжском федеральном округе, с помощью испытуемого РДП набора и ИФА набора для выявления антител к вирусу ГЭИ производства АО «Вектор-Бест». Исследование проб сывороток крови проводили в соответствии с методическими рекомендациями по постановке РДП и инструкцией по постановке ИФА. Учет реакции проводили через 48 часов после постановки.

Результаты исследований специфических компонентов для диагностики геморрагического энтерита индеек в РДП на активность и специфичность в реакции диффузионной преципитации представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты исследований специфических компонентов для диагностики геморрагического энтерита индеек в РДП на активность и специфичность

Сыворотки	SS ГЭИ	SS ССЯ-76	SS CELO	SS НБ	SS ИББ
Антигены					
Аг ГЭИ	1:8	–	–	–	–
Отр. Аг	–	–	–	–	–
Антигены	Аг ГЭИ	Аг ССЯ-76	Аг CELO	Аг НБ	Аг ИББ
Сыворотки					
SS ГЭИ	1:4	–	–	–	–
NS ГЭИ	–	–	–	–	–

Обозначения: SS – иммунная сыворотка, NS – нормальная (отрицательная сыворотка)

Результаты исследований 20 проб полевых сывороток крови индеек на наличие антител к ГЭИ в ИФА и РДП представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты исследований полевых сывороток крови индеек на наличие антител к ГЭИ в ИФА и РДП

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Возраст	4 дня	4 дня	13 дней	13 дней	23 дня	23 дня	33 дня	33 дня	48 дней	48 дней
Титр в ИФА	Отр.	Отр.	581	Отр.	713	Отр.	1100	1756	2342	3017
Титр в РДП	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Ц	Ц	Ц	1:2
№ пробы	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Возраст	65 дней	65 дней	90 дней	90 дней	105 дней	105 дней	119 дней	119 дней	135 дней	135 дней
Титр в ИФА	6946	7100	10802	11130	9451	10457	12954	11412	6800	23552
Титр в РДП	1:4	1:4	1:6	1:6	1:6	1:6	1:6	1:6	1:4	1:12

Примечание: Диагностический титр в ИФА - 1:500; В РДП – цельное разведение.

В исследуемых пробах сыворотки крови индеек выявлены антитела в реакции иммуноферментного анализа в титрах от отрицательного до 23552, а в реакции диффузионной преципитации от отрицательного до 1:12. В ИФА выявлено 4 отрицательных сыворотки, в РДП – 6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, лабораторные испытания продемонстрировали специфичность и активность специфических компонентов набора для диагностики геморрагического

энтерита индеек в реакции диффузионной преципитации (РДП), и, как следствие данный набор может быть использован для диагностических целей.

С.н.с. отдела вирусологии

С.н.с. отдела вирусологии

С.н.с. отдела вирусологии



Самусева Г.Н.

Дубовой А.С.

Бочкарев В.С.

Приложение 8. База данных способов молекулярно-биологической диагностики

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**RU2026622485**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
**ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ
АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ**

Номер регистрации (свидетельства):

2026622485

Дата регистрации: 01.06.2026

Номер и дата поступления заявки:

2026621725 21.04.2026

Дата публикации и номер бюллетеня:

01.06.2026 Бюл. № 6

Автор(ы):

Красков Дмитрий Андреевич (RU),

Тарлавин Николай Владимирович (RU),

Веретенников Владислав Валерьевич (RU),

Берёзкин Владислав Александрович (RU),

Сидоренко Карина Владимировна (RU)

Правообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего

образования "Санкт-Петербургский

государственный университет ветеринарной

медицины" (RU),

Красков Дмитрий Андреевич (RU)

Название базы данных:

Способы молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек с помощью полимеразной цепной реакции (включая авторский)

Реферат:

База данных «Способы молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек с помощью полимеразной цепной реакции (включая авторский)» предназначена для систематизации и хранения сведений о методах ПЦР-диагностики геморрагического энтерита индеек (HEV) и применяется в ветеринарной вирусологии, эпизоотологии, диагностических лабораториях и при разработке тест-систем. База данных содержит 5 записей в табличной форме, каждая из которых включает: номер, название метода, ген-мишень, тип образца, принцип метода, чувствительность/специфичность, авторов и год, примечания. Представлены стандартная ПЦР, qPCR, Real-Time RT-PCR (коммерческий набор), мультиплексная ПЦР и авторский метод (ПЦР с аллель-специфичными праймерами для дифференциации полевых и вакцинных штаммов). Тип ЭВМ: IBM PC-совместимая архитектура. ОС: MS Windows XP-7-10-11

Вид и версия системы управления базой
данных:

MS Visual FoxPro

Объем базы данных:

118 МБ