

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург – 2026

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии им. Урбана В.П. федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

Научный руководитель – Джавадов Эдуард Джавадович,
академик Российской академии наук,
доктор ветеринарных наук, профессор.

Официальные оппоненты: Ирза Виктор Николаевич,
доктор ветеринарных наук, доцент,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных», информационно-аналитический центр
Управления ветнадзора, главный научный сотрудник;

Луницин Андрей Владимирович,
кандидат ветеринарных наук, старший научный
сотрудник, ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр вирусологии и
микробиологии», заместитель
директора по производству и качеству.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук».

Защита состоится «03» декабря 2026 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, тел. 8(812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5., и на официальном сайте <http://spbguvm.ru>

Автореферат разослан: «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Кузнецова Надежда Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Развитие индейководческой промышленности в Российской Федерации имеет позитивную тенденцию. 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.

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).

Также в РФ появились свои племенные индейководческие птицефабрики с нарастающим темпом производства инкубационного яйца, что значительно повышает независимость России от других стран. 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.

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. Однако, расширение этой отрасли приводит к повышению рисков возникновения инфекционных болезней.

По данным Макарова В.В. (2017) наиболее актуальным для промышленного индейководства является профилактика опасных болезней (список МЭБ), а именно – ньюкаслской болезни (НБ), гриппа птиц (ГП), инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭМ), респираторного микоплазмоза вызываемого *Mycoplasma gallisepticum* (MG). В этот список также входит одна из самых экономически значимых болезней индеек – геморрагического энтерита индеек (ГЭИ).

Moura-Alvarez J. et al. (2013) в своих исследованиях писали о ряде таких возбудителей, 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*, вызывающие кишечные болезни у индеек, в связи с чем происходит ухудшение конверсии корма и уменьшение прироста массы тела, что и влияет на экономические показатели птицефабрики.

ГЭИ, как писал Kulon F. W. et al. (2013), это экономически значимая острая желудочно-кишечная болезнь, вызываемая вирулентными штаммами аденовируса группы II. Чаще всего острая инфекция наблюдается у индеек старше 4 недель,

Swayne D.E. et al. (2026), в своих трудах указывали, что повсеместно распространённый ВГЭИ обладает иммуносупрессивным действием и, следовательно, может вызывать вторичные бактериальные инфекции у заражённых 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.

Kulon F. W. et al. (2013), 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, заражающие фазанов, могут инфицировать индеек, а изоляты ГЭ, могут инфицировать фазанов, что свидетельствует об их близком родстве. Что касается ГЭИ, Sharma J. M. (1991), высказал предположение, что индюшата 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.

По данным Dhama K. et al. (2017) за последние несколько десятилетий произошла череда событий, которые способствовали изучению вируса ГЭИ. Способы диагностики ГЭИ перешли от традиционных методов к молекулярным, обладающим более высокой чувствительностью и специфичностью.

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

Степень разработанности темы. Диагностика ГЭИ проводится на основании сочетания клинических признаков, гистологических поражений и выявлением 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. 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 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 ВГЭИ (Domermuth C. H. et al. 1973). 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 ГЭИ, 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.

Основные задачи исследования:

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 сыворотке 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. Улучшение методов борьбы с иммунодепрессивными болезнями – приоритет для птицеводческой промышленности. 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 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 «ДК-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 «ДК-24», зарегистрированный в Государственном реестре РФ 23 декабря 2025 г.

Зарегистрирована база 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.

Результаты диссертационного исследования внедрены 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 «ДК-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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

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».

Изучение концентрации вируса. При изучении наиболее подходящего возраста для заражения вирусом геморрагического энтерита индеек патогенным штаммом «ДК-24» заражали индеек кросса «БИГ-6» алиментарно по 0,5 мл вирус-содержащего материала (ВСМ), а также по 0,1 мл интраназально и интраорбитально, изначальный титр ВСМ в РДП составлял 1:2. Было сформировано 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 проводили на 5-6 день после заражения. После убоя отбирались селезёнки, как главный орган-мишень и из них готовился супернатант, титр которого потом контролировался в РДП.

Для изучения концентрации вируса в органах-мишенях (селезенка, клоакальная сумка, двенадцатиперстная кишка) в различные дни после заражения были составлены 2 группы индеек кросса «БИГ-6» 28-дневного возраста в количестве 80 особей 1 группа – 70 индеек заражены штаммом «ДК-24»; 2 группа – 10 незараженных индеек. Титры антигена ГЭИ в органах-мишенях изучали при помощи РДП, забивая по 10 индеек на 2,3,4,5,6,7,8 сутки после заражения. Из полученных органов получали супернатант, после чего проводили РДП.

Макроскопические изменения. Для изучения макроскопических изменений в органах (селезенка, клоакальная сумка, 12-перстная кишка, печень, тимус), которые наиболее подвержены изменениям, вызванным репликацией вируса, были отобраны 50 индеек кросса «БИГ-6» 28-дневного возраста и разбиты на 2 группы: 1 группа – 40 индеек, зараженных в 28-и дневном возрасте патогенным штаммом «ДК-24»; 2 группа – контрольная группа – 10 индеек. Все птицы были подвержены убою на 5,5 сутки (через 132 часа) после заражения и было проведено вскрытие трупов для изучения макроскопических изменений.

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 подопытной 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. 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.

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. Птицы были разделены на две равные подгруппы (n=10), для которых была разработана схема отбора цельной крови с целью последующего выделения сыворотки. 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-НЕV (геморрагический энтерит индеек).

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».

Положительные и отрицательные антигены и сыворотка для серологических реакций были получены следующим способом:

1. Положительный инактивированный антиген – 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 ВГЭИ «DK-24». По внешнему виду антиген представляет собой жидкость красного цвета.

2. Положительная сыворотка крови с антителами к ВГЭИ – получена путем иммунизации индеек живой вакциной «Dindoral» (Merial, Франция). Вакцинация проводилась в 28-дневном возрасте. Через 4 недели проводили ревакцинации инактивированным вирусом, смешанным с гелем гидроокиси алюминия. После этого отбор сыворотки крови проводился через 5 недель после ревакцинации. По внешнему виду сыворотка представляет собой жидкость светло-желтого цвета.

3. Отрицательный антиген – супернатант гомогената селезенки незараженной индейки 35-дневного возраста. По внешнему виду представляет собой жидкость красного цвета.

4. Отрицательная сыворотка крови индейки – получена от клинически здоровых, не вакцинированных индеек. Сыворотку крови получали по той же методике, что описана во втором пункте. По внешнему виду представляет собой полупрозрачную жидкость светло-желтого цвета.

Разработка серологического способа диагностики: реакция диффузионной преципитации. Перед постановкой реакции и отработки компонентов готовили стандартную среду для РДП путем смешивания 1 грамма агара «Дифко» (Becton Dickinson, США) и 8 грамм NaCl и добавляли 100 мл дистиллированной воды. После чего ставили колбу с агара-солевым раствором на плиту и кипятили до того состояния, пока пена агара не начнёт подниматься вверх. Затем убрали колбу с плиты, ждали пока пена опустится вниз и снова кипятили. Процедуру проводили трижды. После остывания агара до 55-60 °С его разливали по чашкам Петри так, чтобы уровень агара в чашке составлял 5 мм, и ждали пока он остынет. После того как агар остыл, помещали в чашку Петри вату, смоченную водой. Для получения лунок в агаре использовали специальный пробойник. После этого чашка Петри с агаром была готова к работе. Компоненты реакции, которые были получены, титровали путём последовательного двукратного разведения для определения титра в РДП для дальнейшего подбора рабочей дозы.

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 ВГЭИ. Для этого 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).

2) Очистка глобулинов в сыворотке крови индеек с помощью сульфата аммония с последующим проведением диализа.

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);

2 группа. Для разведения и отмывания латексных микросфер использовался фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (рН=7,0);

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

4 группа – контроль. 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 селезенки индеек, зараженных ВГЭИ, а также 50 мкл латексного диагностикума с добавлением супернатанта гомогената селезенки незараженных индеек. Перемешивали компоненты с помощью деревянного шпателя и ждали 10 минут для учета реакции.

Подбор праймеров, реакционной смеси и этапов амплификации полимеразной-цепной реакции в классическом варианте для молекулярно-биологической диагностики геморрагического энтерита индеек. Для подбора праймеров и этапов амплификации ПЦР в классическом варианте была изучена нуклеотидная последовательность многих патогенных и вакцинных штаммов для выбора наименее вариабельного белка. Данным белком является Нехон генетическая последовательность, которого состоит из 2721 нуклеотидов, к наименее вариабельной генетической части этого белка (около 200 нуклеотидов) и были подобраны следующие праймеры:

F5'-CTGGTTCAGCAGAAAGTTCTTC-3'

R5'-CAGTAGAGTCATAAGCAACSTAT-3'

Синтез праймеров был заказан в компании «Евроген». После чего были подобраны этапы амплификации (95 °C – денатурация 3 минуты, далее 30 циклов (денатурация, отжиг праймеров, элонгация): 95 °C – 30 секунд, 53 °C – 30 секунд, 72 °C – 1 минута, далее 72 °C – 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 мМ ледяная уксусная кислота, 40 мМ трис-HCl, 0,5 М ЭДТА pH 8.0)), электрофорез проводили с напряжением в 60 вольт.

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).

Результаты собственных исследований

Исследование макроскопических изменений

По результатам изучения изменений у всех индеек (40 голов – 100%) в селезёнке была выявлена либо атрофия, либо гипертрофия с характерным мраморным рисунком – патогномоничный признак при данной болезни. Также обнаружено, что из 40 индеек у 11 (27,5%) выявлена гипертрофия клоакальной сумки с точечными кровоизлияниями. У 22 (55%) индеек из 40 обнаружен дуоденит с характерной гиперемией слизистых оболочек. У 4 (10%) индеек из 40 выявлен гепатит. У 30 (75%) индеек из 40 была выявлена гипотрофия и атрофия тимуса с точечными кровоизлияниями.

Исследование микроскопических изменений

При рассмотрении микрофотографий клоакальной сумки контрольной и подопытных групп 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. Следует отметить, что во всех представленных группах в центре предполагаемого мозгового вещества лимфоидных фолликул, находятся скопления крупных, светлых оксифильных клеток. При рассмотрении клоакальной сумки группы заражения выявлены серьёзные патологические изменения: место слияния двух крупных фолликулов, в центре одного из которых, видны рассредоточенные очаги бесцветных тканевых структур, а эпителиальная пластинка утратила целостность, обнажив лежащую под ней соединительную ткань собственной пластинки.

В группе контроля у тимуса выявляется типичное дольчатое строение, хорошо различаются корковое и мозговое вещество, в котором визуализируются тельца Гассала. В тимусе у зараженных индеек можно заметить выраженную

дольчатость органа при неявной дифференциации на корковое и мозговое вещество. Также отмечается появление значительного количества бесцветных тканевых структур по сравнению с тимусом индеек в группе контроля, и расположению их как в мозговом, так и в корковом веществе.

При рассмотрении селезёнки у индеек в группе контроля отмечается нормальное соотношение белой и красной пульпы. Центральные артерии и соединительнотканые трабекулы также хорошо дифференцируются. Однако, в группе, зараженной ВГЭИ отмечается значительное преобладание белой пульпы над красной. Т-зоны у индеек 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 у индеек из группы контроля.

В двенадцатиперстной кишке в контрольной группе обнаружена правильная гистоархитектоника. Кишечные ворсинки имеют вид длинных тонких выпячиваний, эпителиальная пластинка сохранена, клетки чётко дифференцируются, собственная пластинка также без изменений. У зараженных птиц 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.

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

Как видно из таблицы 1, индюшата (кросса «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).

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

Концентрации вируса в органах-мишенях в различные дни после заражения

Исходя из данных таблицы 2 и 3 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 улавливается на 2 и 8 день после заражения.

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

Определение периода полураспада материнских антител к вирусу геморрагического энтерита индеек

Анализ данных представленных в таблице 4, показывает, что среднесуточное снижение титров материнских антител 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 остается стабильным на протяжении первых трех дней жизни индюшонка. Период полураспада материнских антител у кросса БИГ-6 в среднем равняется 2,5 суткам. При этом материнские антитела удерживаются на достаточном уровне (титр ≥ 500) на протяжении не менее двух недель.

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	

Разработка серологических способов диагностики.

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). 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. 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. Также проводили РДП с другими вирусами обладающими преципитирующими свойствами (вирус гидроперикардита 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). Результаты реакции отрицательные.

Реакция латекс-агглютинации

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.

Помимо этого, 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. По всей видимости, это связано с несоответствием значений рН и ионной силой 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 с 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...1:16. 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. Наиболее подходящей глобулиновой 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 его остатки блокируют адсорбционные сайты на поверхности латексных микросфер, препятствуя связыванию с глобулиновой фракцией. С карбоксилированным латексом диаметром 400 нм с осажденной на нем глобулиновой фракцией, очищенной с помощью сульфата аммония с проведением последующего диализа в разведение 1:2...1:16, были поставлены пробы с другими вирусами из семейства Adenoviridae, а именно вирус гидроперикардита из 1 группы и вирус синдрома снижения яйценоскости из 3 группы для определения наличия перекрестной реакции (ложноположительный результат). Результаты реакции отрицательные.

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

ПЦР осуществляли с выделенными нуклеиновыми кислотами, экстракцию которых проводили с помощью коммерческого набора «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. Vac), пробы № 3,4,5 – надосадочная жидкость гомогената селезенки индеек, содержащая вирус геморрагического энтерита индеек; проба №6 – отрицательный контроль (надосадочная жидкость гомогената селезенки интактной индейки).

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза при рабочем напряжении 60 В. Визуализацию и учет результатов проводили через 40 минут непрерывного флуоресценции (рис.1).

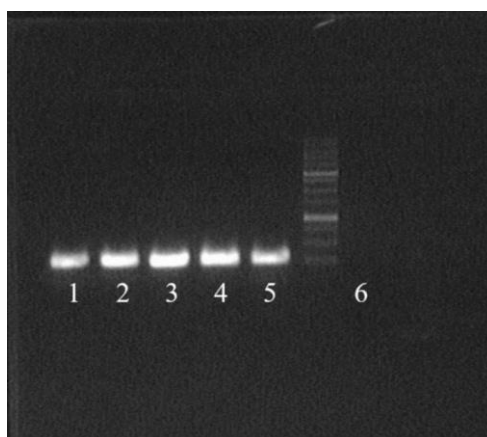


Рисунок 1 – Результат проведенной ПЦР в агарозном геле

По результатам реакции видно, что положительный и отрицательный контроли 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 семейства Adenoviridae (вирус гидроперикардита из

1 группы, вирус синдрома снижения яйценоскости из 3 группы) для проверки наличия ложноположительных результатов (так как у всех вирусов из семейства Adenoviridae присутствует белок Hexon). Результаты реакции отрицательные.

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 сыворотке крови.

5. Для диагностики на базе реакции латекс-агглютинации подобран оптимальный буферный раствор для сенсibilизации латексных микросфер (трис-НСI 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. Подобраны 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.

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.

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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, внесённых в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. Разработка набора для проведения серологической диагностики геморрагического энтерита индеек / **Д. А. Красков**, Э. Д. Джавадов, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Ветеринария Кубани. – 2025. – № 5. – С. 33-35.

5. 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. 58-68.

6. Красков Д.А. Гистологические изменения в иммунокомпетентных органах индеек при геморрагическом энтерите/ **Д. А. Красков**, К.В. Сидоренко // Ветеринария Кубани. – 2026. – № 1. – С. 19-21.

Статьи, опубликованные в сборниках научных трудов, материалах Конференций и журналах:

1. **Красков Д. А.** Геморрагический энтерит индеек. Современные представления о болезни / **Д. А. Красков** // Ветеринария в АПК: Материалы Международной научно-практической конференции, Новосибирск, 04–06 июня 2024 года. – Новосибирск: Союзмолоко, 2024. – С. 83-85.

2. 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.

3. Патогенез геморрагического энтерита индеек/ **Д. А. Красков**, А. С. Дубовой, Г. Н. Самусева, В. С. Бочкарев // SPbVetScience : сборник научных трудов. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2025. – С. 56-60.

4. **Красков Д. А.** Разработка серологического метода диагностики геморрагического энтерита индеек / **Д. А. Красков**, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Материалы 77-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, посвященной 80-летию прорыва блокады Ленинграда, Санкт-Петербург, 03–10 апреля 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – С. 130-132.

5. **Красков Д. А.** Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма вируса геморрагического энтерита индеек / **Д. А. Красков**, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Материалы 77-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, посвященной 80-летию прорыва блокады Ленинграда, Санкт-Петербург, 03–10 апреля 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – С. 132-134.

6. Джавадов Э. Д. Геморрагический энтерит индеек / Э. Д. Джавадов, **Д. А. Красков** // БИО. – 2021. – № 7(250). – С. 16-19.

7. 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.