

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО СПОСОБА ДИАГНОСТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ЭНТЕРИТА ИНДЕЕК

Красков Дмитрий Андреевич, аспирант, orcid.org/0000-0002-2362-2641
Джавадов Эдуард Джавадович, д-р ветеринар. наук, проф., академик РАН,
orcid.org/0000-0002-1589-6300

Веретенников Владислав Валерьевич, канд. ветеринар. наук, orcid.org/0000-0001-9648-2259
Тарлавин Николай Владимирович, канд. ветеринар. наук, orcid.org/0000-0002-6474-9171
Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

РЕФЕРАТ

В связи с интенсивным развитием промышленного птицеводства, своевременный мониторинг инфекционных болезней птиц является неотъемлемой частью комплекса мероприятий, что предусматривает внедрение в практику диагностических исследований, отвечающих современному уровню развития науки.

Наиболее актуальным для промышленного индейководства является мониторинг особо опасных болезней (список МЭБ): Ньюкаслской болезни (НБ), гриппа птиц (ГП) и экономически значимых болезней индек - геморрагического энтерита индек (ГЭИ), инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП), респираторного микоплазмоза и микоплазменного синовита, вызываемых *Mycoplasma gallisepticum* (МГ) и *Mycoplasma meleagridis* (ММ).

Анализ современного состояния исследований по данной теме показал, что разработка способов диагностики иммунодепрессивных болезней (геморрагический энтерит индек) является актуальным направлением в Российской Федерации. Чтобы не допустить вспышку данной болезни, которая является с экономической и эпизоотологической точки зрения одной из наиболее опасных для индейководческой промышленности, необходимо в плановом порядке проводить диагностический мониторинг, чтобы контролировать благополучие хозяйства по данной болезни, и в случае раннего выявления геморрагического энтерита, предпринять все необходимые меры, для предотвращения дальнейшего распространения и снижения ущерба.

Именно поэтому целью нашего исследования является разработка молекулярно-биологического способа диагностики ГЭИ на примере ПЦР в классическом варианте.

В ходе проведенной работы был подобран наименее варибельный белок ГЭИ, а также праймеры, этапы амплификации и состав ПЦР смеси к этому белку. При постановке реакции получен положительный результат. Все поставленные пробы прореагировали в соответствии с ожидаемыми результатами.

Ключевые слова: геморрагический энтерит индек, индейководство, полимеразная цепная реакция, лабораторная диагностика, иммунодепрессия.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с интенсивным развитием промышленного птицеводства, возникновением новых и изменением уже известных инфекционных болезней птиц, против которых проводится профилактическая вакцинация, требуется разработка чувствительных, высокоспецифичных и поддающихся автоматизации методов оценки как иммунного статуса птиц, так и эпизоотологического благополучия хозяйств. Своевременный мониторинг инфекционных болезней птиц является неотъемлемой частью комплекса мероприятий, направленных на профилактику этой проблемы, что предусматривает внедрение в практику диагностических исследований, отвечающих современному уровню развития науки.

Наиболее актуальным для промышленного индейководства является мониторинг особо опасных болезней (список МЭБ): Ньюкаслской болезни (НБ), гриппа птиц (ГП) и экономически значимых болезней индек - геморрагического энтерита индек (ГЭИ), инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП), респираторного микоплазмоза и микоплазменного синовита, вызываемых *Mycoplasma gallisepticum* (МГ) и *Mycoplasma meleagridis* (ММ), которые определили перечень создаваемых отечественных диагностиче-

ских тест-систем.

Анализ современного состояния исследований по данной теме показал, что разработка способов диагностики иммунодепрессивных болезней (геморрагический энтерит индек) является актуальным направлением в Российской Федерации [1]. Диагностика геморрагического энтерита индек (ГЭИ) проводится на основании сочетания клинических признаков, гистологических изменений и демонстрации вирусного антигена/антител традиционными и молекулярно-биологическими методами [6;7]. Для диагностических целей лучшим источником вируса ГЭИ является содержимое кишечника или образцы селезенки. Чтобы не допустить вспышку данной болезни, которая является с экономической и эпизоотологической точки зрения одной из наиболее опасных для индейководческой промышленности, необходимо в плановом порядке проводить диагностический мониторинг поголовья, чтобы контролировать благополучие хозяйства по данной болезни, и в случае раннего выявления геморрагического энтерита, предпринять все необходимые меры, для предотвращения дальнейшего распространения и снижения ущерба. К сожалению, на данный момент в индейководческих хозяйствах, довольно часто встречается ГЭИ, который нано-

сит существенный экономический ущерб. Это связано с тем, что на сегодняшний день, в Российской Федерации отсутствуют диагностические наборы для диагностики геморрагического энтерита при общем поголовье 18 миллионов индеек.

Именно поэтому целью нашего исследования является разработка молекулярно-биологического способа диагностики ГЭИ на примере ПЦР в классическом варианте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены на базе Научно-консультационного диагностического центра по птицеводству кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Для разработки ПЦР в классическом варианте была изучена нуклеотидная последовательность многих патогенных и вакцинных штаммов, для выбора наименее варибельного белка. Данным белком является Нехон состоящий из 2721 нуклеотидов и отвечающий за иммуногенность [8], к части этого белка (около 200 нуклеотидов) и были подобраны праймеры:

F5'-CTGGTTCAGCAGAAAGTTCTTC-3'
R5'-CAGTAGAGTCATAAGCAACSTAT-3'

Синтез праймеров был заказан в компании «Евроген». После чего были подобраны этапы амплификации (95 Co – денатурация 3 минуты, далее 30 циклов (денатурация, отжиг праймеров, элонгация): 95 Co – 30 секунд, 53 Co – 30 секунд, 72 Co – 1 минута, далее 72 Co – элонгация 2 минуты) и компоненты для ПЦР смеси (Tersus bufer 2,5 мкл; F rg 0,2 мкл; R rg 0,2 мкл; днк матрица 0,5 мкл; вода 20,6 мкл; полимеразы 0,5 мкл; dNTP 0,5 мкл), после проведения амплификации полученные пробы (1 проба – положительный контроль (вакцина Dindoral), 2 проба – положительный контроль (вакцина H.E.Vac), 3,4,5 пробы – надосадочная жидкость гомогената селезенки индеек содержащая в себе вирус геморрагического энтерита индеек; 6 проба – отрицательный контроль (надосадочная жидкость гомогената селезенки неинфицированной индейки), помещали в камеру с агарозным гелем (0,7% гель в

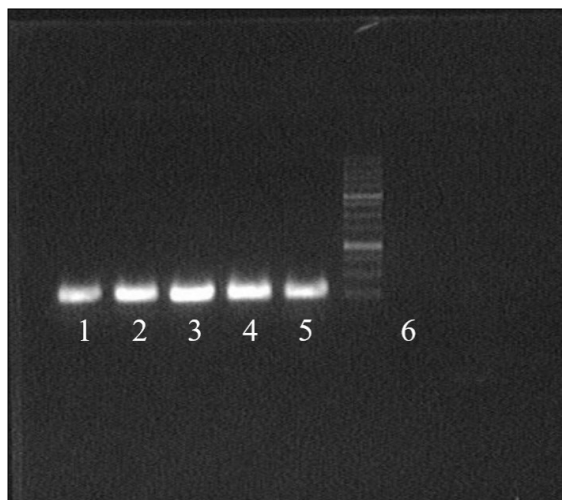


Рисунок 1. Результаты ПЦР в классическом варианте. Пробы №1-5 – положительный результат; проба №6 – отрицательный результат.

буфере ТАЕ: (40 mM ледяная уксусная кислота, 40 mM трис-HCl, 0,5 M ЭДТА pH 8.0)) и подвергали электрофорезу с напряжением в 60 вольт, учет результатов проводили через 40 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проверки разработанного молекулярно-биологического способа диагностики ГЭИ на примере ПЦР в классическом варианте были получены следующие данные: проба №1 (Dindoral производства фирмы Merial (Франция)), проба №2 (H.E.Vac производство фирмы ARKO laboratories (США)), проба №3-5 – патологический материал от павших индеек в Ленинградской области – показали положительный результат (в агарозном геле видны участки белка, к которому были подобраны праймеры); проба №6 – отрицательный результат (Рис.1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении исследований разработанного молекулярно-биологического способа диагностики на ГЭИ был получен положительный результат, все пробы в реакции прореагировали в полном соответствии. Исходя из этого, можно сделать вывод, что праймеры, этапы амплификации и компоненты для ПЦР смеси подобраны правильно, и в данной реакции улавливается часть белка Нехон как в вакцинных, так и патогенных штаммов, а соответственно данный способ диагностики, можно использовать для обнаружения вируса ГЭИ в патологическом материале.

ЛИТЕРАТУРА

- Джавадов, Э. Д. Геморрагический энтерит индеек / Э. Д. Джавадов, Д. А. Красков // БИО. – 2021. – № 7(250). – С. 16-19.
- Красков, Д. А. Разработка серологического метода диагностики геморрагического энтерита индеек / Д. А. Красков, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлашин // 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.
- Мраморная селезенка фазанов: патогенез, диагностика, лечение и профилактика / Э. Д. Джавадов, Д. А. Красков, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлашин // БИО. – 2021. – № 9(252). – С. 4-6.
- Alkie, T. N., Guenther, R., & Rautenschlein, S. (2017). Molecular Characterization of Hemorrhagic Enteritis Viruses (HEV) Detected in HEV-Vaccinated Commercial Turkey Flocks in Germany. *Avian Diseases*, 61(1), 96–101. doi:10.1637/11506-092916-reg
- Dhama, K., Gowthaman, V., Karthik, K., Tiwari, R., Sachan, S., Kumar, M. A., Munir, M. (2017). Haemorrhagic enteritis of turkeys – current knowledge. *Veterinary Quarterly*, 37(1), 31–42.
- Lobová, D., & Celer, V. (2015). Expression and serological reactivity of hemorrhagic enteritis virus hexon protein. *Folia Microbiologica*, 61(3), 227–232.
- Shah JD, Scharber SK, Cardona CJ. Development and application of quantitative real-time PCR for the rapid detection of hemorrhagic enteritis virus in tissue samples. *Avian Dis*. 2013 Jun;57(2):300-2.
- Victor Palomino-Tapia, Darko Mitevski, Tom

DEVELOPMENT OF A MOLECULAR BIOLOGICAL METHOD FOR DIAGNOSING HEMORRHAGIC ENTERITIS OF TURKEYS

Dmitriy An. Kraskov, PhD student, orcid.org/0000-0002-2362-2641

Eduard Dz. Dzhavadov, Dr.Habil. of Veterinary Sciences, prof., academician of the Russian Academy of Sciences, orcid.org/0000-0002-1589-6300

Vladislav V. Veretennikov, Ph.D. of Veterinary Sciences, orcid.org/0000-0001-9648-2259

Nikolay Vl. Tarlavin, Ph.D. of Veterinary Sciences, orcid.org/0000-0002-6474-9171

Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia

Due to the intensive development of industrial poultry farming, timely monitoring of infectious diseases of birds is an integral part of a set of measures that provides for the introduction into practice of diagnostic studies that meet the current level of scientific development.

The most relevant for industrial turkey breeding is the monitoring of particularly dangerous diseases (OIE list): Newcastle disease (ND), avian influenza (AI) and economically significant diseases of turkeys - hemorrhagic enteritis of turkeys (HET), infectious encephalomyelitis of birds (IEB), respiratory mycoplasmosis and mycoplasmic synovitis caused by *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma meleagridis* (MM).

An analysis of the current state of research on this topic has shown that the development of diagnostic methods for immunosuppressive diseases of birds (hemorrhagic enteritis of turkeys) is an urgent area in the Russian Federation [1]. In order to prevent an outbreak of this disease, which is from an economic and epizootological point of view one of the most dangerous for the turkey breeding industry, it is necessary to carry out diagnostic monitoring of livestock on a planned basis in order to monitor the well-being of the farm for this disease, and in case of early detection of hemorrhagic enteritis, take all necessary measures to prevent further spread and reduce damage which she could have inflicted.

That is why the purpose of our study is to develop a molecular biological method for diagnosing HET using the example of PCR in the classical version.

In the course of the work carried out, the least variable GEI protein was selected, as well as the correct primers, amplification stages and the composition of the PCR mixture for this protein. When setting up the reaction, a positive result was obtained. All delivered samples reacted in accordance with the expected results.

Key words: Hemorrhagic enteritis of turkeys, turkey breeding, polymerase chain reaction, laboratory diagnostics, immunosuppression.

REFERENCES

1. Javadov, E. D. Hemorrhagic enteritis of turkeys / E. D. Javadov, D. A. Kraskov // BIO. – 2021. – № 7(250). – Pp. 16-19.
2. Kraskov, D. A. Development of a serological method for diagnosing hemorrhagic enteritis of turkeys / D. A. Kraskov, V. V. Veretennikov, N. V. Tarlavin // Proceedings of the 77th International Scientific Conference of young Scientists and Students of St. Petersburg State University of Economics, dedicated to the 80th anniversary of the breakthrough of the siege of Leningrad, St. Petersburg, April 03-10, 2023. – St. Petersburg: St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 2023. – pp. 130-132.
3. Marble spleen of pheasants: pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention / E. D. Javadov, D. A. Kraskov, V. V. Veretennikov, N. V. Tarlavin // BIO. – 2021. – № 9 (252). – Pp. 4-6.
4. Alki, T. N., Gunter, R., & Rautenschlein, S. (2017). Molecular characterization of hemorrhagic enteritis (HEV)

- viruses found in herds of commercial HEV-vaccinated turkeys in Germany. Avian diseases, 61(1), 96-101. doi:10.1637/11506-092916-reg
5. Dhama K., Gauthaman V., Kartik K., Tiwari R., Sachan S., Kumar M. A., Munir M. (2017). Hemorrhagic enteritis of turkeys – current data. Veterinary Journal, 37 (1), 31-42.
6. Lobova D., Celer V. (2015). Expression and serological reactivity of the hexon protein of the hemorrhagic enteritis virus. Folia Microbiologica, 61(3), 227-232.
7. Shah D.D., Sharber S.K., Cardona S.J. Development and application of quantitative real-time PCR for rapid detection of hemorrhagic enteritis virus in tissue samples. Air Raid, June 2013; 57(2):300-2.
8. Victor Palomino-Tapia, Darko Mitevski, Tom Inglis, Frank van der Meer, Mohamed Faisal Abdul-Karim. Molecular characterization of hemorrhagic enteritis virus (HEV) obtained from clinical samples in Western Canada in 2017-2018. August 26, 2020;12(9):941.

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц. Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35, Моб. тел.: 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**