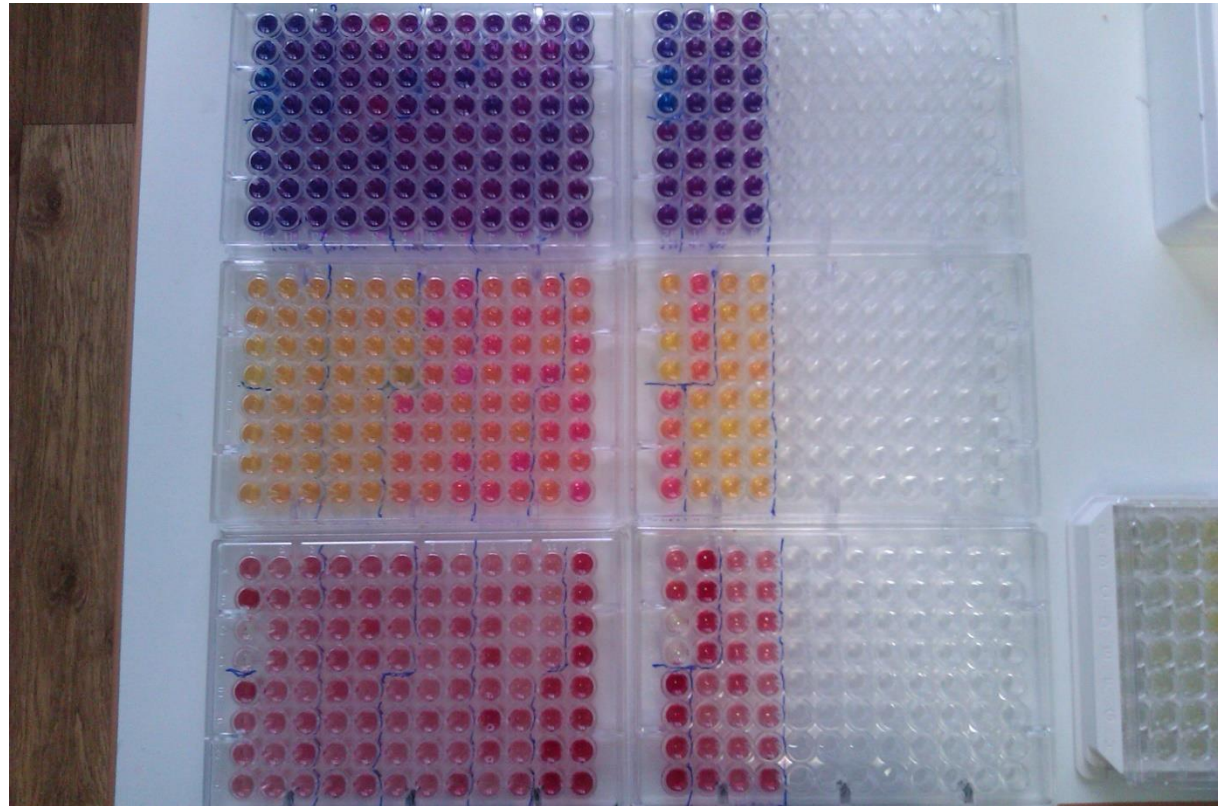


Биохимический мониторинг  
органопатологий и  
эффективности лечения на базе  
ИФА-лабораторий птицефабрик.

**Афонюшкин Василий Николаевич**, к.б.н.,  
заведующий сектором молекулярной  
биологии СФНЦА РАН, ИХБФМ СО РАН, г.  
Новосибирск (+79231176461)

# Какие биохимические тесты можно делать на базе ИФА лаборатории?

- Альбумин
- Кальций
- Магний
- АлАТ
- АсАТ
- Триглицериды
- Мочевая кислота
- Холестерин
- Цинк
- Тимоловая проба
- Хлор



# Техника проведения большинства тестов

- Заранее внесите в лунки микропланшета сыворотку крови и контроли
- Многоканальным дозатором разнесите реагент по лункам микроплашета
- После проведения реакции, проведите учет результатов ИФА ридером и обработайте данные

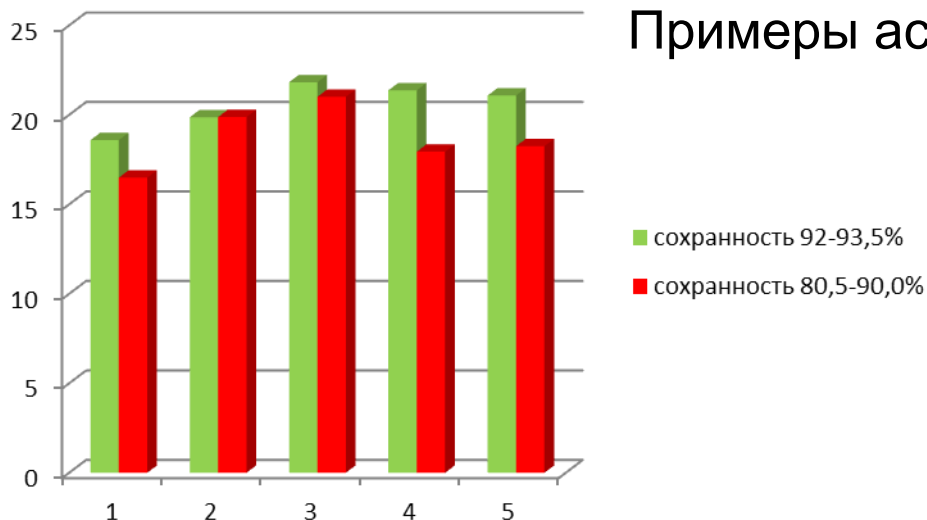


● ● ●

Большое количество птичников, в сочетании с отсутствием возможности пресекать циркуляцию инфекционных агентов методом пусто-занято, обеспечивают хорошую воспроизводимость инфекционных процессов, что позволяет экстраполировать данные с нескольких птичников на все остальное поголовье.

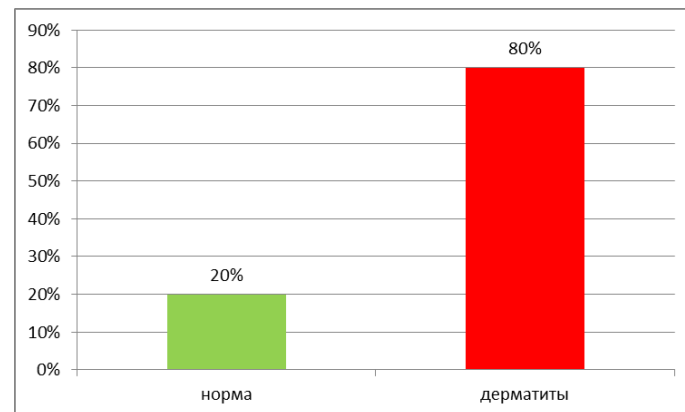
Эта же проблема позволяет одновременно отбирать образцы из птичников с разными показателями (сохранность, продуктивность) и сравнивать их по результатам лабораторных исследований.

- Следует разделять серологические исследования (а также ПЦР и биохимии) на мониторинговые, скрининговые и ассоциативные!




## Примеры ассоциативных исследований

○ Рис. 1 Уровни альбумина в крови в двух группах птичников с наибольшей и наименьшей сохранностью. На фоне астровирусного нефрита цыплят




● Рис. 2. Инфицированность селезенки ВБМ у цыплят с дерматитами и без дерматитов



# Биохимические маркеры органопатологий

Наименование анализируемого параметра	Органопатология	Примечание
Альбумин	Снижение биосинтетической функции печени или развитие воспаления (отрицательный белок острой фазы)	При отравлениях снижается гомогенно. При гепатитах снижение концентрации не у всей птицы. При поражении канальцев почек и обезвоживании (отравление охратоксином) – уровень повышен
АлАТ	Гепатиты, повреждение паренхимы печени	У индейки не повышается
АсАТ	Миокардиты и миозиты	Важно для подбора сроков применения противовоспалительных препаратов
Магний, цинк	Нарушение всасывания (вирусные энтериты, эймериозы, отравления, некрахмалистые полисахариды)	Мониторинг причин снижения продуктивности и эффективности препаратов повышающих резистентность слизистой ж.к.т.



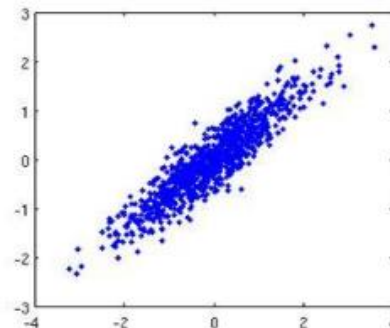
# Биохимические маркеры органопатологий

Наименование анализируемого параметра	Органопатология	Примечание
Триглицериды	Маркер жировой дистрофии печени и избытка обменной энергии в корме	Уровень может снижаться при поражении почек. Полезно оценивать эффективность гепатопротекторов и микосорбентов
Холестерин	В сочетании с триглицеридами и альбумином можно оценить синтетическую активность печени при токсикозах	У индейки не повышается
Мочевая кислота	Подагра и связанные с ней патологии (ИББ, ИБК, нефрозы, артриты)	Важно для выяснения механизмов подагры
Кальций	Нарушение минерального обмена	Так как гомеостаз кальция не позволяет адекватно оценивать средние значения, информативен коэффициент вариации
Хлор	Коррелирует с воспалением	

# Зачем считать коэффициент корреляции?



Положительная корреляция



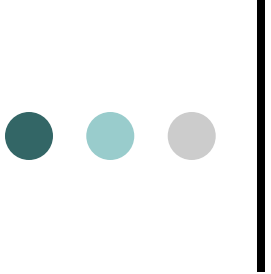
№	альбумин	хлориды, мМл	магний, мг/дл	цинк, мкМл	птичники
нормы					Пт6/11 38дн
1	9,59	82,905	1,842	11,041	
2	21,90	84,092	2,133	52,052	
3	19,24	96,518	2,300	30,600	
4	20,13	84,962	2,158	40,064	
5	21,68	87,416	1,811	34,386	
6	14,25	85,991	2,003	23,029	
7	22,68	88,287	2,170	29,969	
8	14,81	91,769	2,139	23,029	
9	23,68	82,034	1,917	43,219	
10	23,79	88,207	2,578	33,755	
11	26,45	87,020	2,504	55,206	
12	18,13	83,775	2,238	28,076	
13	17,80	92,560	2,034	30,600	
14	21,35	94,064	3,512	33,755	
	19,6771429	87,82857	2,2385	33,48436	Ср. арифм
	4,47888281	4,413994	0,428248	11,55649	Станд.откл
	13,8814959	29,02311	11,20452	25,71017	Св, %
15	31,77	115,275	2,275	19,243	Пт-2/13/37дн
16	22,01	94,935	2,454	31,862	
17	17,69	94,460	2,170	28,707	
18	18,13	95,093	2,294	22,398	
19	22,13	94,302	2,665	33,755	
20	17,58	93,510	2,355	18,612	
21	19,24	93,035	1,372	30,600	
22	24,79	95,647	2,764	35,016	
23	22,13	97,546	2,325	24,291	
24	17,91	95,964	2,201	25,553	
25	17,47	92,244	2,294	23,660	
26	20,35	95,489	2,696	33,124	
27	31,89	94,539	2,869	52,682	
28	20,91	93,194	2,386	40,695	
	21,7142857	96,08807	2,365714	30,01414	Ср. арифм
	4,81828842	5,687455	0,360767	9,110965	Станд.откл
	22,1894861	5,919002	15,2498	30,35557	Св, %

## Пт 6/11-38дн

	альбумин	хлориды	магний	цинк
альбумин		0,032344	0,353912	0,850394
хлориды			0,490331	-0,13674
магний				0,206058
цинк				

## Пт 2/13-37дн

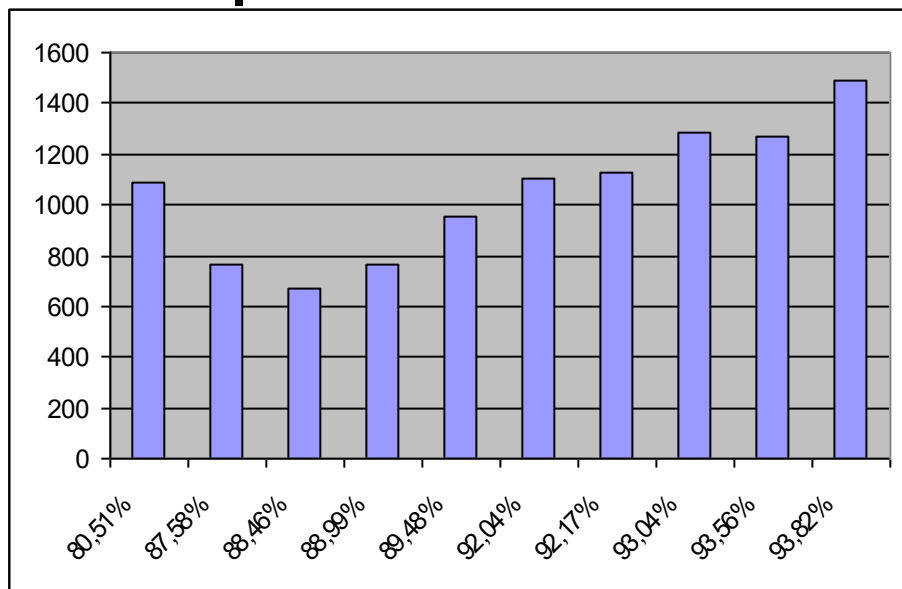
	альбумин	хлорид	магний	цинк
альбумин		0,627664	0,423915	0,432481
хлорид			0,003731	-0,34384
магний				0,436922
цинк				



# Эпизоотологическая биохимия и ее законы:

1. Объектом эпизоотологической биохимии является популяция животных/птицы а не индивидуальная особь
2. Основным критерием патологии является не отклонение биохимического параметра от нормы а ассоциация с патологическим процессом (при сравнительных исследованиях типа «больные-здоровые», совпадения отклонений параметра с динамикой прироста смертности, аномальными изменениями коэффициента вариации (от средних по группам птицы), наличием корреляционных связей между биохимическими маркерами укладывающимися в механизмы патогенеза патологии)
3. Наличие корреляции между двумя биохимическими признаками (различающимися по функциям и участию в биохимических процессах) может быть обусловлено общностью усвоения, выведения, места синтеза – это указывает на вовлечение в патологию соответствующего органа или системы.
4. В стаде где есть больные и здоровые корреляция двух параметров будет затрагивать только часть диапазона значений (например, только меньше нормы или только больше нормы) поэтому коэффициент корреляции будет стремится к 0,5





Различия уровней антител к вирусу МПВИ в птичниках с разным уровнем смертности

## Разные варианты статистического анализа

Параметр	Низкая сохранность	Высокая сохранность
M сохранность	87,00%	92,93%
M титры	849,6	1254,2
P (титры)=	0,0044128	
корреляция (по Пирсону)	0,491737	
корреляция (по Спирмену)	0.85	
Odds ratio (отношение шансов)	33.0000	P = 0.0460

**Odds ratio (отношение шансов) можно рассчитать на этом сайте**

[https://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)

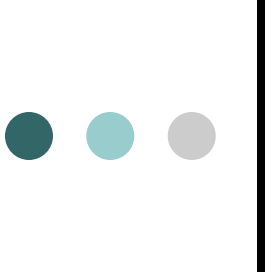
**Корреляцию по Спирмену можно рассчитать на этом сайте**

<http://math.semestr.ru/corel/spirmen.php>

	триглицериды г/л	Магний mg/dL
Корпус2 17дн	50 до 380	2,4 до4,8
	-	3,143
	100,40	2,490
	40,62	2,565
	116,22	2,659
	41,42	1,956
	98,79	3,287
	111,93	2,358
	87,80	2,471
	104,69	2,075
	81,37	2,082
	37,94	2,446
	149,20	2,785
	188,87	3,281
	258,58	3,218
	94,77	2,370
	163,40	2,490
70,91	2,452	
средн знач	110,5894	2,595765
С <sub>у</sub> .%	51,19342	16,13812
Корпус 6 14дн.	139,28	1,862
	152,14	3,400
	220,51	3,356
	103,35	3,922
	140,88	4,204
	413,00	3,915
	340,62	3,815
	204,16	4,254
	613,27	3,589
	200,94	4,097
	230,70	4,330
	151,88	3,796
	173,59	3,432
	142,23	4,386
	311,66	3,011
	96,38	3,890
	492,90	-
средн знач	249,2631	249,2631
С <sub>у</sub> .%	58,5115	58,5115

## Очередная птицефабрика

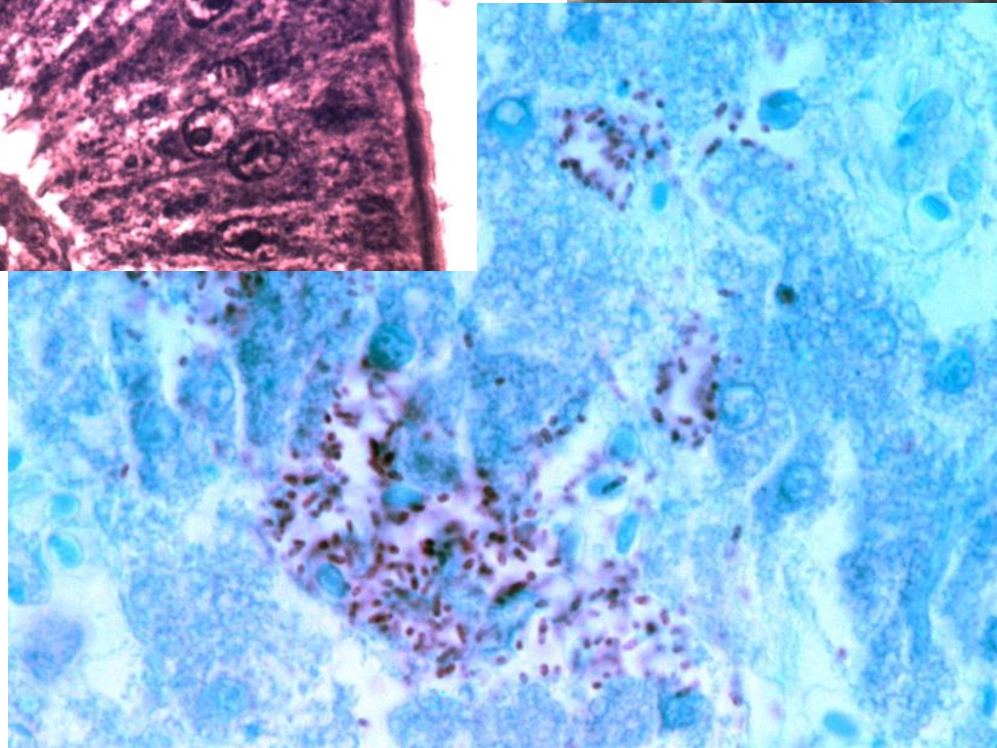
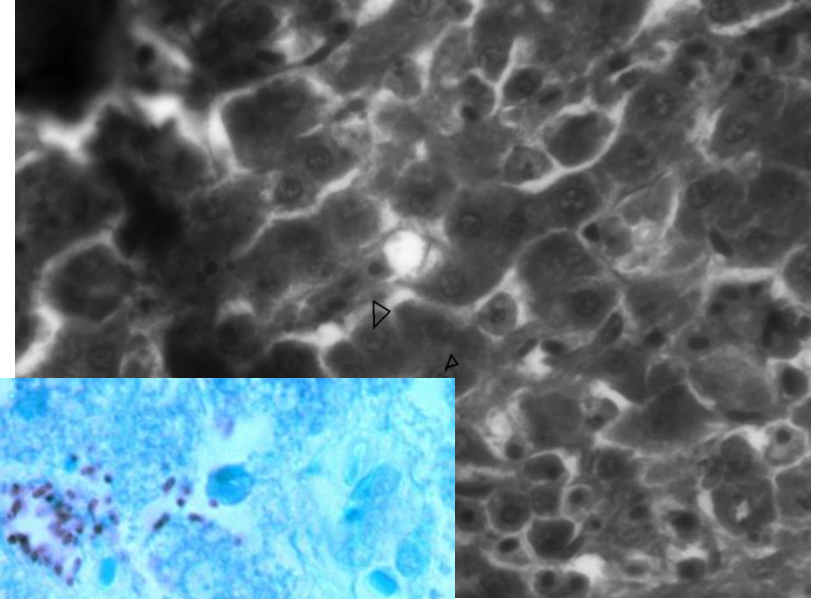
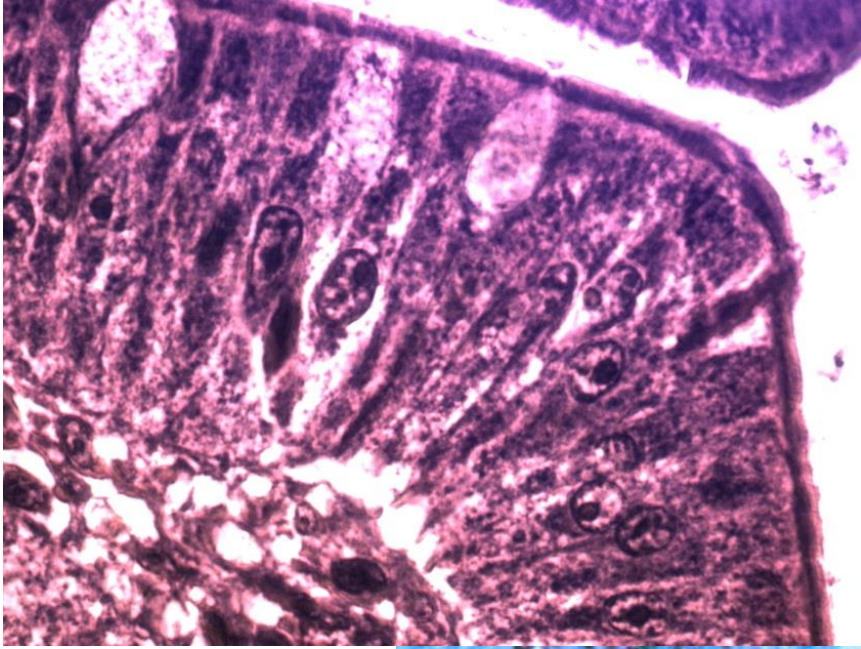
- В корпусе 2 наблюдается снижение уровня триглицеридов в нескольких пробах (это может быть связано с мальабсорбцией о чем свидетельствует корреляция с магнием 0,63). В корпусах 6 и 7 наблюдается повышение концентрации триглицеридов, что ассоциируется с нарушением обмена жиров (например, жировая дистрофия печени).
- Во всех трех корпусах отмечено незначительное снижение уровня магния это может быть связано с нарушением всасываемости (и привести к увеличению отхода при поражениях сердца).

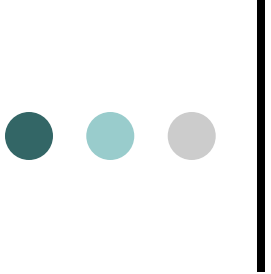


# Инклюзионный гепатит- гидроперикардит: диагностика

- 1. Патологоанатомические исследования: гепатиты, гидроперикардиты, асциты
- 2. Эпизоотологический анализ: рост числа гепатитов и миокардитов на вскрытии после 18 - 20 дня сменяющийся ростом числа миокардиосклерозов и асцитов после 30 дн. возраста. Резкий рост пораженности тушек сальмонеллами.
- 3. Патогистологические исследования (окончательный диагноз) – Печень: выявление телец включений типа Рубарта, периваскулярных инфильтратов, поражение клеток Купфер. В селезенке и бурсе Фабрициуса поражение клеток СМФ.
- 4. Биохимия – роста активности АЛат более 20 ед.
- 5. ПЦР, ИФА (дополнительные подтверждающие тесты). Птица почти всегда инфицирована различными серотипами аденовирусов, поэтому специфическая диагностика актуально только в рамках идентификации эпизоотологически-значимого серотипа

# Гистологическая диагностика аденовирусных инфекций



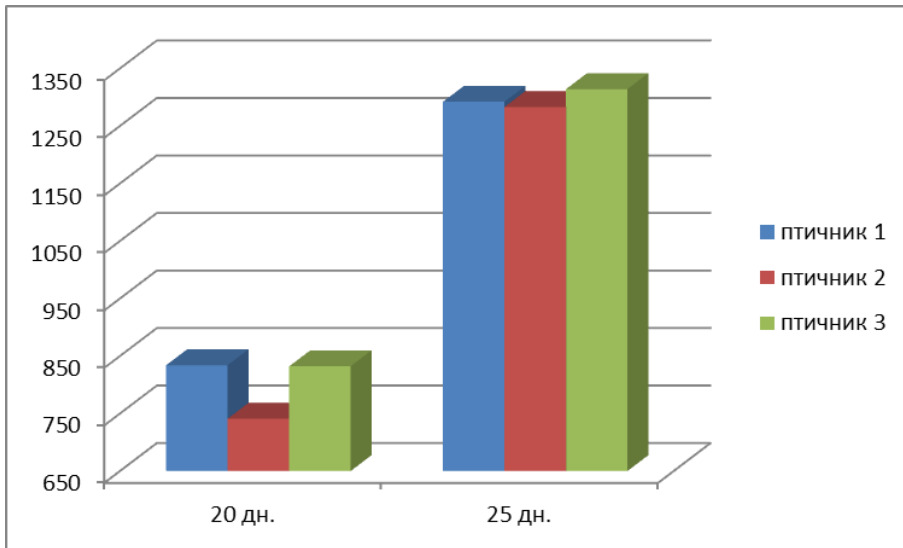


# Факторы провоцирующие аденовирусные инфекции

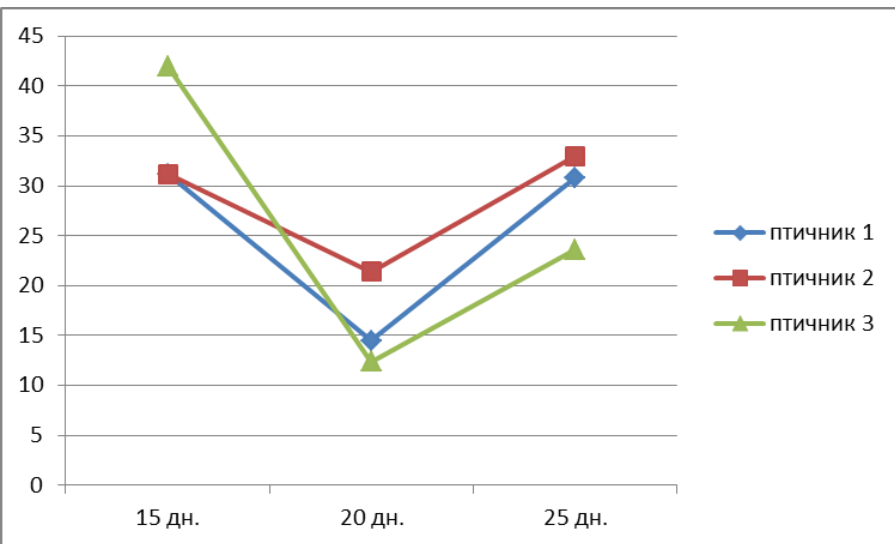
- Гипоксия и ацидоз тканей
  - Проблемы с вентиляцией,
  - клеточное содержание,
  - инфекционная анемия,
  - анемии иной этиологии,
  - органические кислоты в период повышенного риска инфекции?
  - Отравление кормовыми консервантами и антиоксидантами
- Отравление Т2 токсином!!
- Несбалансированные рационы!!!
- Комплектация поголовья из разных источников (на двух идентичных птицефабриках, различающихся только по склонности руководства одной из фабрик регулярно менять поставщика цыплят разница по сохранности превышала 8%)

# Биохимический мониторинг миокардитов

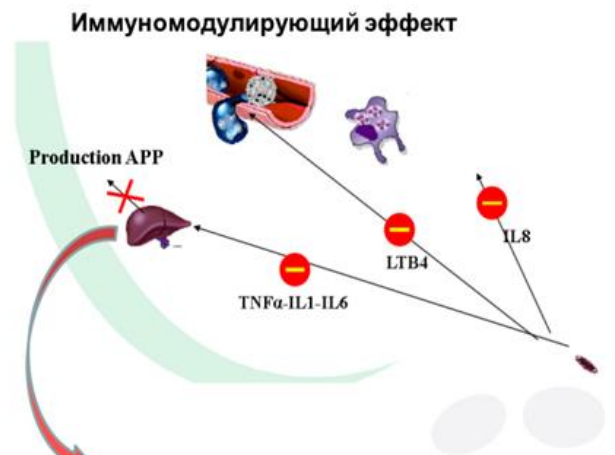
Противовоспалительный эффект за счет ингибции продукции ИЛ8 и ЛТБ4




Изменение средней массы птицы, получавшей различные макролидные антибиотики



Динамика активности АСТ в сыворотке крови птицы, получавшей различные макролидные антибиотики

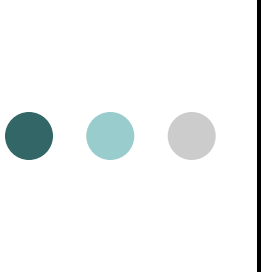


Иммуномодулирующие эффекты тилмикозина (Korri et al. 2000г.)



# Вопросы фармакотерапии и профилактики

- 1. Инклюзионные гепатиты – факторная болезнь и устранение предрасполагающих факторов, исходя из нашего опыта, более эффективно, чем попытки специфической терапии и профилактики. Применение гепатопротекторов было эффективнее противовирусной терапии и попыток вакцинопрофилактики
- 2. Повышенный отход птицы нередко наблюдается на фоне вторичных изменений во внутренних органах (миокардиосклероз, портальная гипертензия => асцит). Поэтому важно точно установить временной интервал когда вирус оказывает свое действие и в этот краткий период потратиться на витамины, аминокислоты, качественную вентиляцию (можно использовать патологоанатомический или биохимический мониторинг).
- 3. Гуморальный иммунитет к аденовирусам довольно надежен (трансовариальный иммунитет защищает до 20 дня), но серотипоспецифичен. Если у вас есть инклюзионный гепатит, то при поставке цыплят или яйца от нового поставщика, есть риск гибели птицы начиная с 5 суток.
- 4. Если аденовирусная инфекция провоцирует на птицефабрике срыв вакцинопрофилактики болезни Марека, следует проводить контроль качества вакцинации после переболевания аденовирусной инфекцией (методом ПЦР)



# Лечение и профилактика аденовирусных инклюзионных гепатитов

- 1. выявление и устранение фактора вызвавшего массовое проявление ИГ-ГП
- 2. применение гепатопротекторов типа «Гепавекса», необходимо до развития асцитов и гидроперикардитов т.е. необходимо выявлять сроки когда птица бессимптомно переболевает гепатитами, например путем оценки активности АЛТ в крови.
- 3. Полезно увеличение в рационе (или в составе гепатопротекторов) незаменимых аминокислот, цинка, каротиноидов
- 4. Существует мнение что, нежелательно применение органических кислот в период возникновения гепатитов аденовирусной этиологии



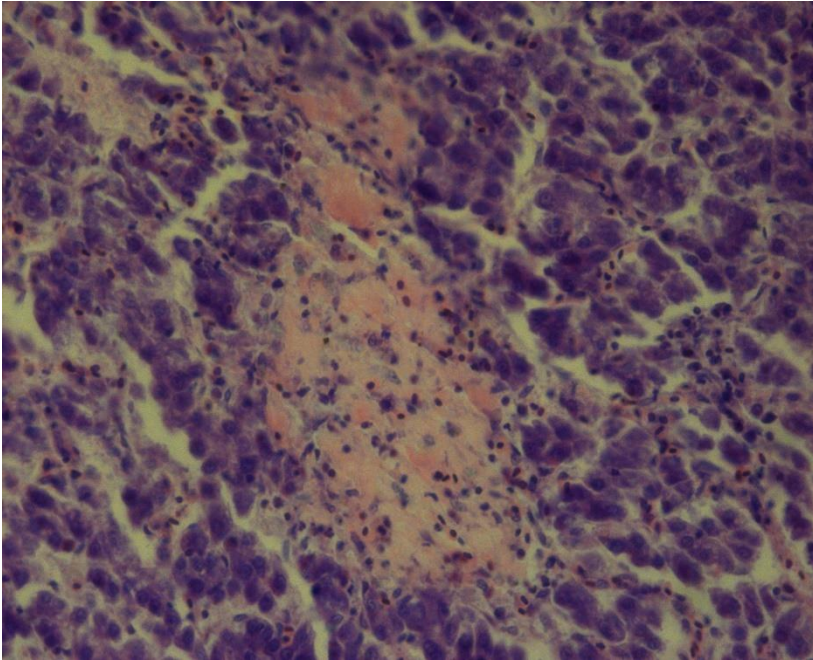


# Реовирусная инфекция

**Синдром мальадсорбции** более выражено нарушение усвоения питательных веществ из кормов, в первую очередь соединений кальция. Распространение – бройлерные кроссы.

- Сопровождается резким отставанием в росте и развитии заболевшей птицы начиная с 7-10-дневного возраста
- Отмечают нарушение формирования оперения («вертолетики», как при авитаминозах В4, В2 и РР, недостатке марганца и Т-2 токсикозах)
- Зачастую сопровождается искривлением киля, остановкой роста трубчатых костей в длину и повышенной ломкостью костяка у птицы
- По мнению некоторых специалистов - На вскрытии часто встречается анемичный «белый» кишечник
- У птицы предубойного возраста (по мнению некоторых специалистов) наблюдают как разрушение головки бедренной кости, так и поражение скакательного сустава
- При серологическом исследовании часто регистрируют только незначительный прирост титра антител к периоду убоя птицы (у бройлера)
- Также поражается печень. Гепатиты реовирусной этиологии часто путают с аденовирусными. Высокопатогенные штаммы реовирусов вызывают развитие мелкоочаговых некрозов в печени и почти не затрагивают другие ткани. Также недавно появились в РФ штаммы реовирусов поражающие трахею и бронхи.

# Гепатиты вызываемые высокопатогенными формами реовируса, проблемы диагностики и вакцинопрофилактики

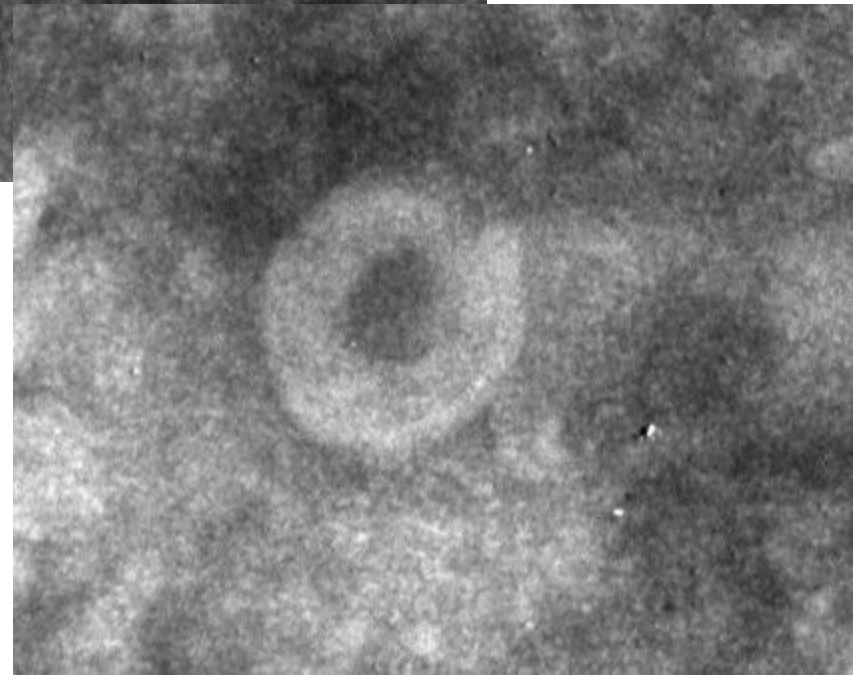
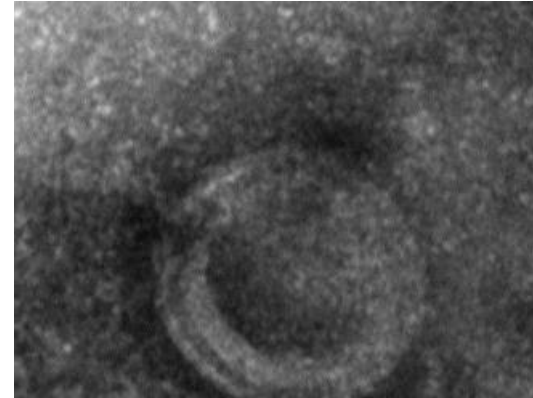


- Мелкоочаговые некрозы в печени. Отсутствуют бактерии и гетерофильная инфильтрация.

## Нерешенные научные проблемы

1. Вариантные штаммы
2. Высокая вероятность появления реассортантов
3. Низкая эффективность вакцинопрофилактики и серодиагностики в первых двух случаях
4. «Экзотические» формы реовирусной инфекции затрудняющие клиническую диагностику

# RSS синдром расслоения стада по массе



- Сопровождается снижением привесов, неоднородностью стада по массе, резко ухудшаются барьерные свойства тонкого отдела кишечника в отношении патогенных бактерий, наблюдается мальадсорбция, иногда перозис, резко снижается эффективность вакцинации живыми вакцинами при выпаивании

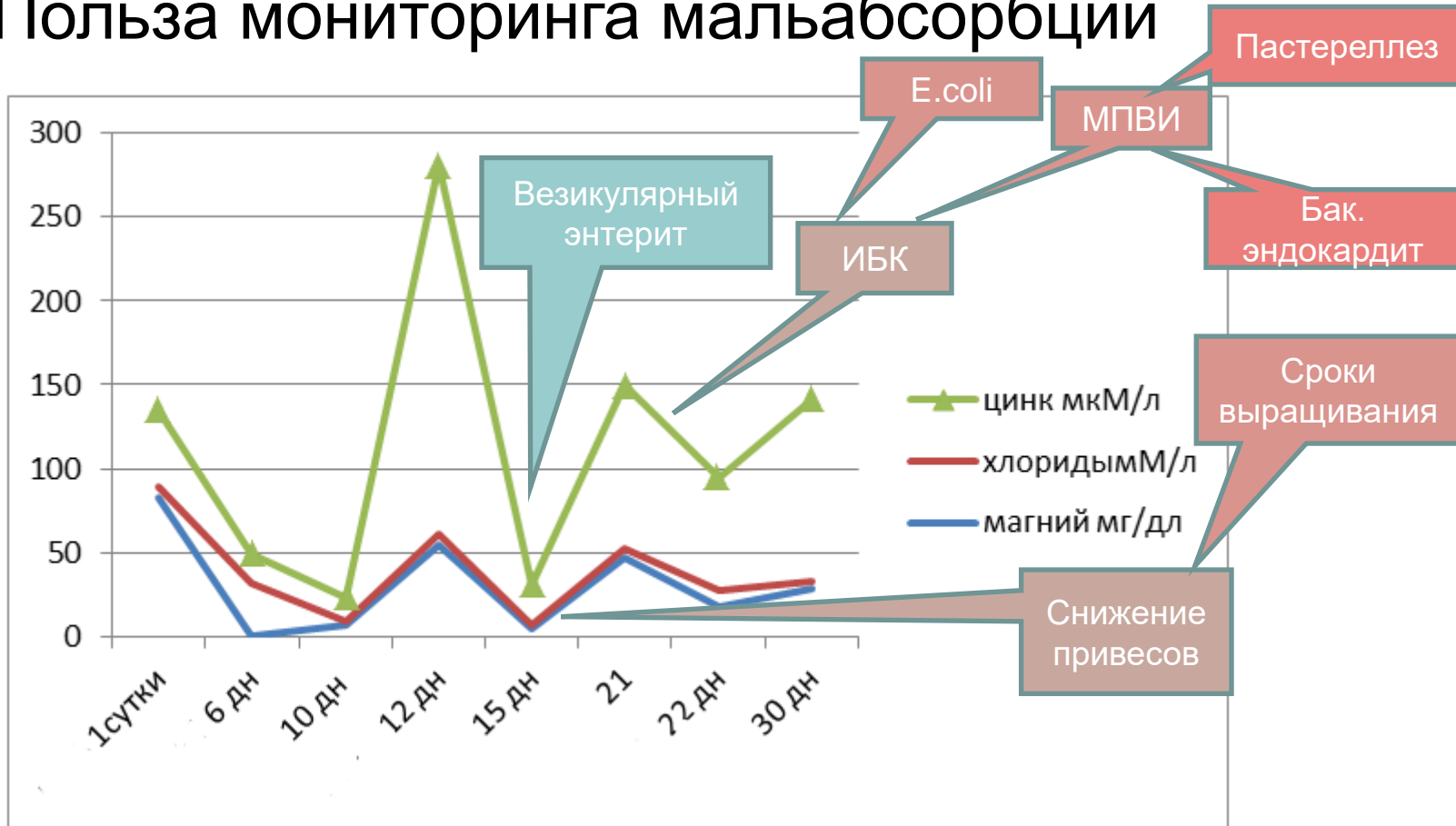
- ● ●

# RSS: дилатация железистого желудка на фоне хронического интерстициального гастрита



Лечение – специфическая профилактика и терапия отсутствует однако использование споровых пробиотиков, выпаивание препаратов персульфатов, компенсация дефицита микроэлементов, повышенный ввод аскорбиновой кислоты позволяют снизить ущерб.

# Полезьа мониторинга мальабсорбции

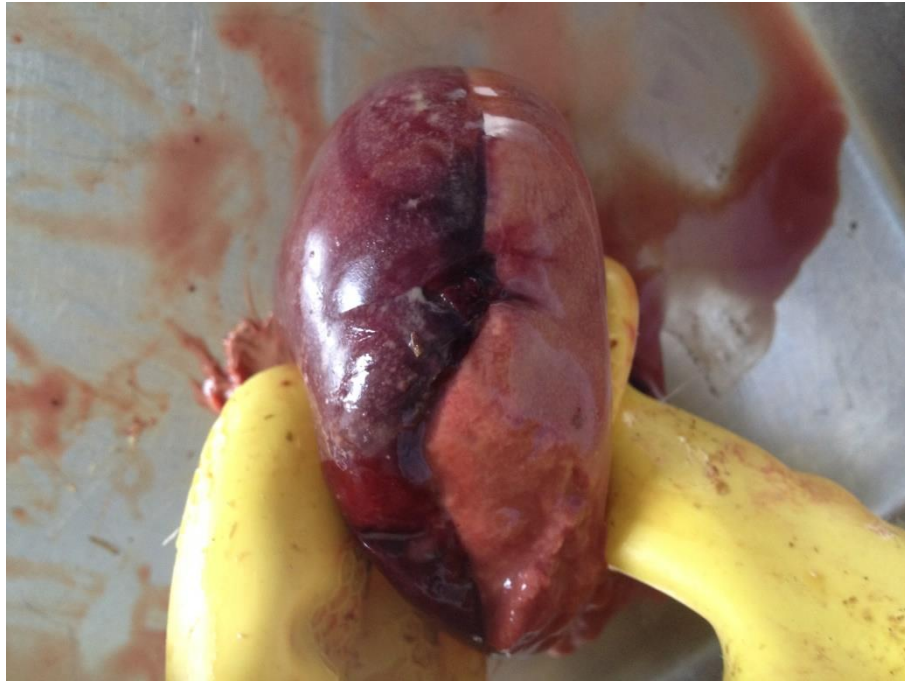


- Динамика мальадсорбции (маркеры – магний и цинк) и воспалительных процессов (маркер -хлориды)

# Дифференциальная диагностика у бройлеров и рем. молодняка

признаки	Реовирусная инфекция	Аденовирусный провентрикулит	Флавивирусная инфекция	RSS
провентрикулит	+	+	-	+
овариит				+
гепатит	+	+		+
кутикулит		+	+	
тельца включения		+		
везикулярный энтерит				+
панкреатит		+	+	+

# Гепатоспленомегалия – вирус гепатита E



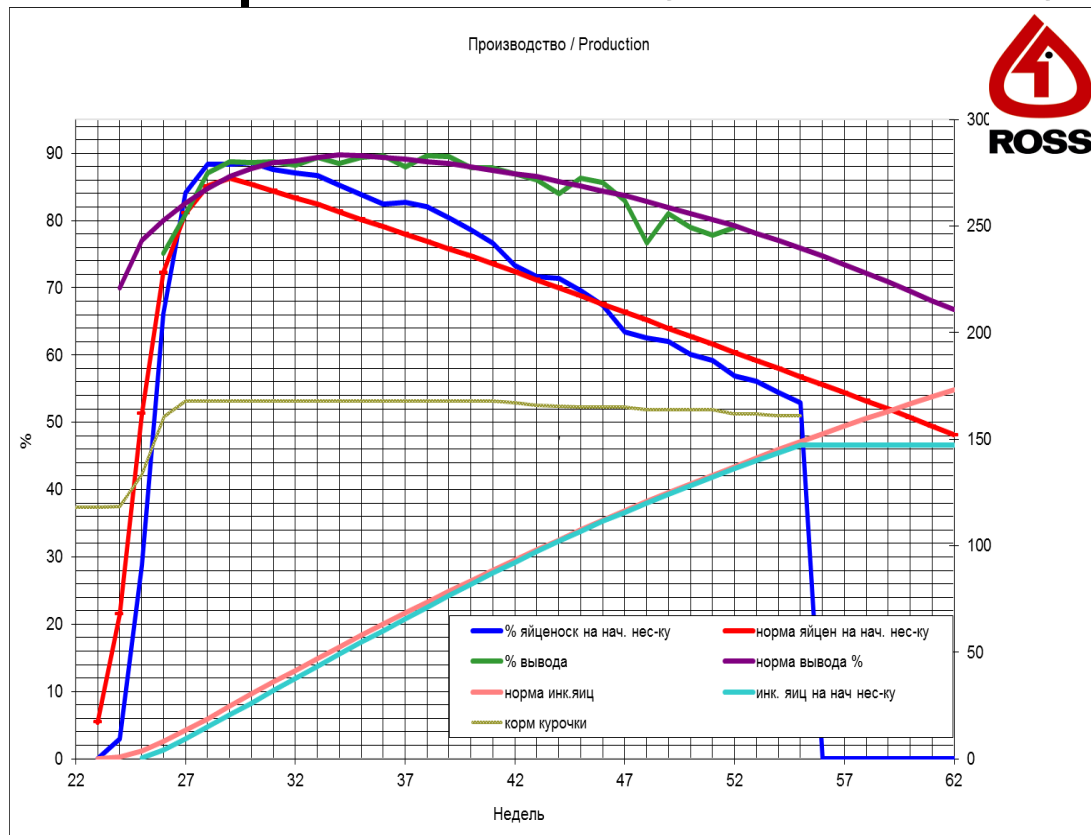
- Подкапсульные кровоизлияния, жировая дистрофия, тотальные некрозы

# Гепатоспленомегалия – вирус гепатита Е





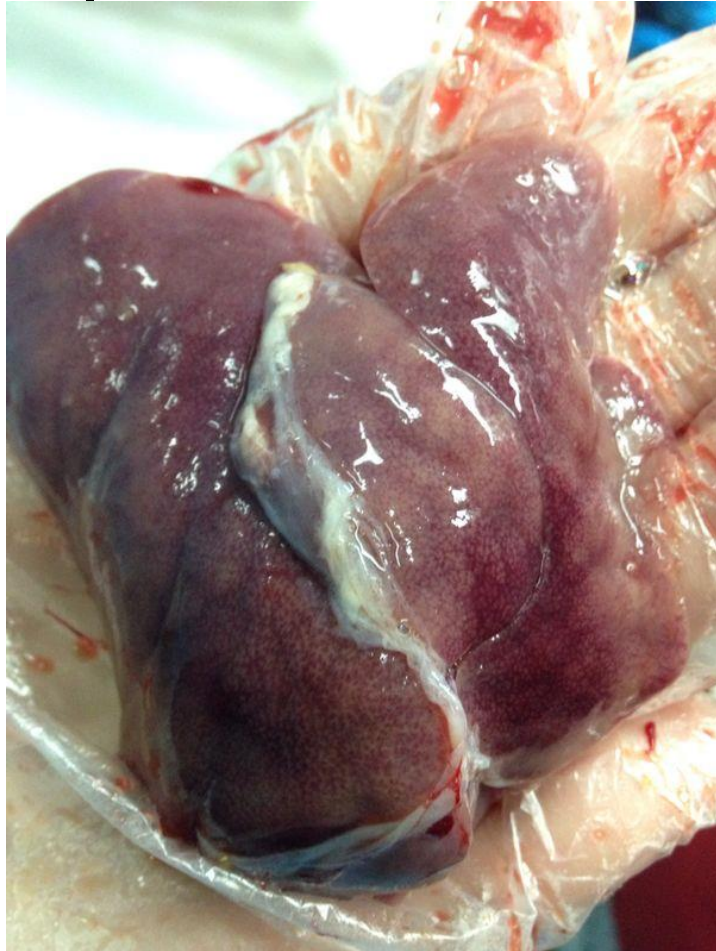
# Вирус гепатита Е – влияние на яичную продуктивность



- Появление печени с подкапсульными кровоизлияниями и жировой дистрофией сопровождалось снижением яичной продуктивности на 17%

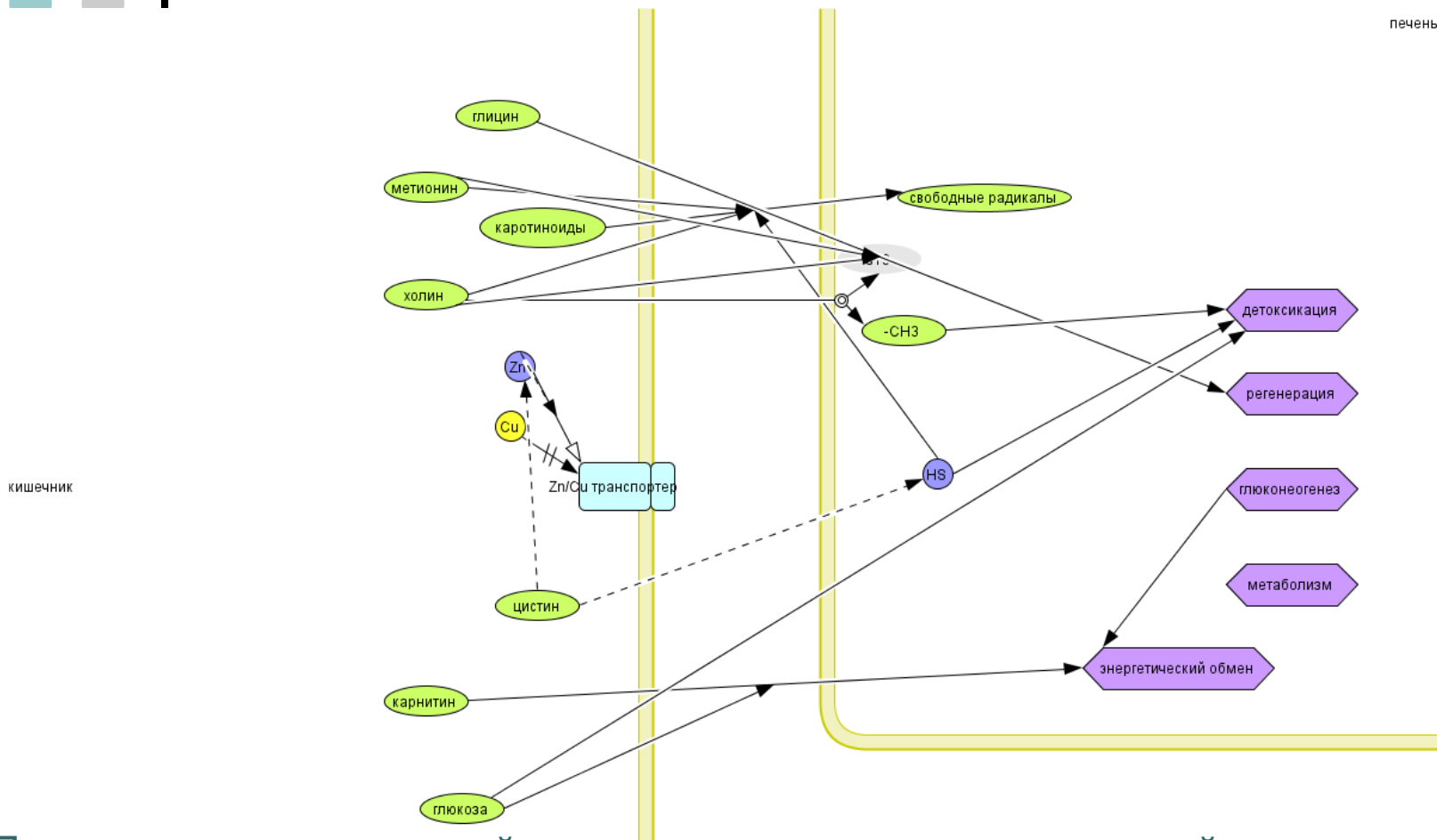
- В период пика заболеваемости гепатоспленомегалией появляются кровоизлияния в желтках и после переболевания увеличивается количество мелких яиц

# Гепатоспленомегалия у бройлеров?



- С целью минимизации ущерба следует применять аскорбиновую кислоту через воду начиная с 20 дневного возраста курсами по 2-4 дня
- Также можно параллельно вводить гепавекс 3 дня, затем ФЛС-микс 2-3дня.
- Специфическая терапия и профилактика отсутствуют

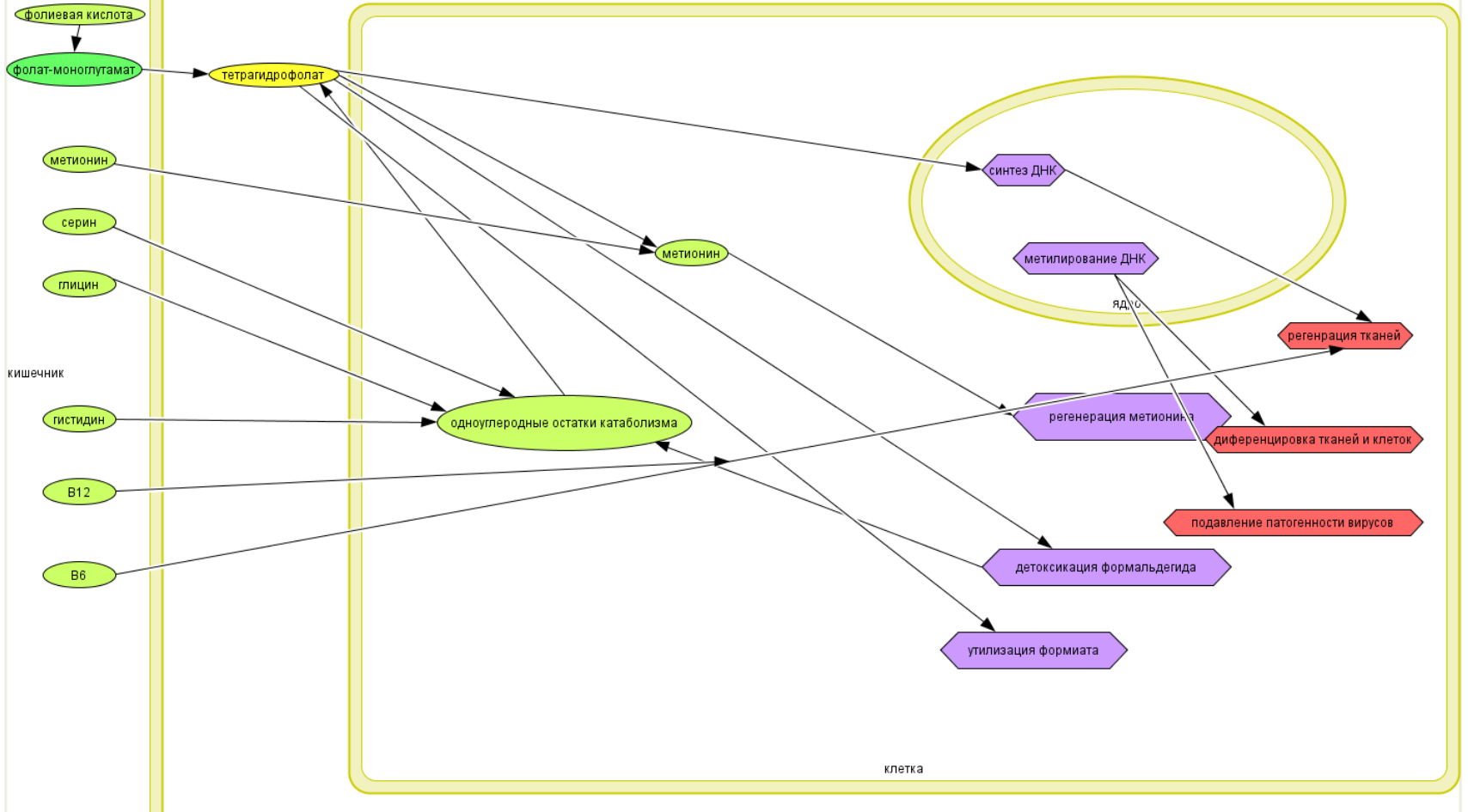
# Защита печени, как делать это?

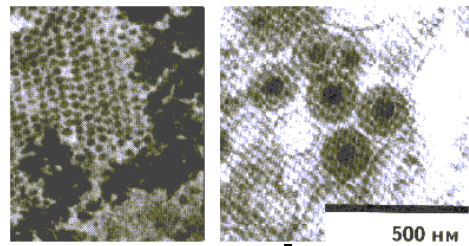


Показания: инклюзионный гепатит, прочие гепатиты вирусной и токсической этиологии (болезнь Гамборо, ИБК, реовирусный гепатит, гепатиты бактериальной этиологии).

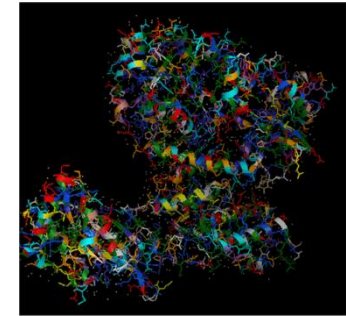
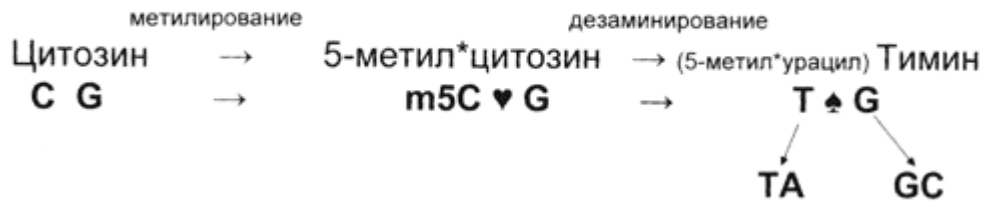
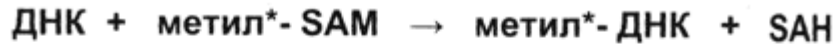
Гепатит+ (нужно добавить Метионин, Инозитол, Янтарную кислоту)  
Для синтеза эндогенного аденинметионина и фосфатидилхолина

# Коррекция фолатного цикла!!!





# Эпигенетика вирусных инфекций? Или купите гепавекс ежели не хотите все это изучать

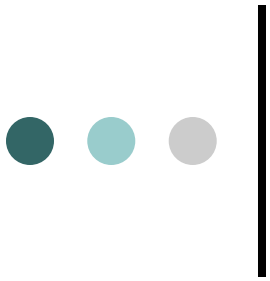


▶ Третичная структура фосфопротеина вируса болезни Марекы VP22

	Локализация CpG островка FC126	Гомологичной последовательности в геноме CVI988	Штамм CVI 988		
			C/A	C/T	C/G
1	96611-6817	86850-87056	30	45	25
2	29261-29572	38024-38341	62,5	18,75	18,75
3	66745-67136	75773-76174	27,77	58,33	13,88
4	77714-78152	87285-87764	34,37	34,5	31,25
5	138090-138334	156563-156820	20,83	54,16	25
6	111449-111735	121763-122055	20	51,42	40
7	86991-87211	96731-96956	21,73	39,13	32

	124	130	140	150	160	170
fc126 Length 287	122	TCGTCGATCC	TTTGCCCA	TCGTTGC	AAATTACA	AGTCCGATCGCCATG
CU2	118	CAATCCAGGA	TTTCCCCG	TCCTGGAA	CATGTCTAGATAGAC	ATTCTAAATTG
CVI988	118	CAATCCAGGA	TTTCCCCG	TCCTGGAA	CATGTCTAGATAGAC	ATTCTAAATTG
Md5	118	CAATCCAGGA	TTTCCCCG	TCCTGGAA	CATGTCTAGATAGAC	ATTCTAAATTG
RB-1B	118	CAATCCAGGA	TTTCCCCG	TCCTGGAA	CATGTCTAGATAGAC	ATTCTAAATTG

штамм	Распределение CpG островков по геному	серотип	патогенен
RB-1B (EF523390)		1	да
MD-5 (AF243438)		1	Да
CVI988 (DQ530438)		1	нет
GAHV-2 (AF147806)		1	неизвестна
MDV Ser2 UL region (AY510475)		2	нет
FC126 (NC002641)		3	нет



○ Спасибо за внимание!