Badania nad rolą adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit w patologii indyków prowadzone w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie w okresie ostatnich 30 lat

BARTŁOMIEJ TYKAŁOWSKI, ANDRZEJ KONCICKI

Katedra Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Otrzymano 05.05.2017

Zaakceptowano 12.05.2017

Tykałowski B., Koncicki A.

Studies concerning the role of Hemorrhagic Enteritis Virus in the pathology of turkeys conducted in the Department of Poultry Diseases in Olsztyn over the last 30 years

Summary

In Poland, Hemorrhagic Enteritis Virus (HEV) was first isolated in 1987. Over nearly thirty years numerous studies concerning the pathology of HEV infection of turkeys were conducted at the Department of Poultry Diseases in Olsztyn. The results of these studies contributed to one postdoctoral dissertation, five doctoral dissertations and one master's thesis, as well as numerous publications and papers presented at national and international conferences. Over time, through the use of state of art laboratory techniques, such as flow cytometry and molecular biology, it has been demonstrated that Polish isolates of HEV are low pathogenic, but they possess strong immunosuppressive activity; moreover, these viruses occur very frequently in turkey flocks and are involved in pathological conditions of turkeys in our country. It has been further demonstrated that even the HEV isolates which are low pathogenic cause a subclinical course of the disease which impairs both humoral and cell mediated immune mechanisms, leading to exacerbation of ongoing disease processes and decreased vaccine induced immunity development, which consequently cause large economic losses in the turkey industry.

Keywords: turkeys, Hemorrhagic Enteritis Virus (HEV), research in Poland over a 30 year span

Od momentu wyizolowania w naszym kraju po raz pierwszy adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit indyków upłynęło blisko 30 lat. Fakt ten był inspiracją do przedstawienia w zarysie wyników badań prowadzonych w tym czasie w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie nad rolą tego wirusa w patologii indyków.

Krwotoczne zapalenie jelit indyków (Hemorrhagic Enteritis – HE) pierwszy raz opisali Pomeroy i Fenstermacher w stanie Minnesota (USA), w 1937 r. (23). Dwadzieścia lat później epizootię choroby stwierdzono w stanie Ohio, a w 1960 r. w Teksasie i Virginii (6). Następnie została ona zdiagnozowana i opisana w większości krajów prowadzących intensywny chów indyków (2, 12).

W Polsce HE po raz pierwszy rozpoznał Koncicki (cyt. 11, 12) w grudniu 1987 r. u 12-tygodniowych

indyków. Dostarczone do Zakładu Chorób Ptaków ówczesnego Wydziału Weterynaryjnego AR-T w Olsztynie żywe i martwe ptaki pochodziły ze stada liczącego 5,5 tys. sztuk, w którym w ciągu doby padało po około 10-12 indyków. Padnięcia były nagłe, bez jakichkolwiek objawów klinicznych, a przeprowadzone badania bakteriologiczne i parazytologiczne dały wynik ujemny. Leczenie indyków antybiotykami o szerokim spektrum działania nie przyniosło oczekiwanych rezultatów, a choroba po 10 dniach wygasła. Badaniem sekcyjnym u padłych indyków stwierdzono 2-3-krotne powiększenie i marmurkowatość śledziony. W przebiegu pokarmowym zaobserwowano krwotoczne zapalenie błony śluzowej dwunastnicy, która była wypełniona krwistą lub łososiową treścią. Ponadto stwierdzono wybroczyny w tkance tłuszczowej żołądka mięśniowego i pod nasierdziem. Padłe indyki były

dobrze odżywione a w wolu stwierdzono obecność paszy. Przebieg choroby oraz zmiany anatomopatologiczne nasuwały podejrzenie zakażenia adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit. Podjęto wówczas próbę izolacji wirusa z wycinków śledziony i dwunastnicy. W tym celu od padłych indyków pobrano wym. narządy, które po homogenizacji w stosunku 1 : 10 w buforze PBS z dodatkiem penicyliny i streptomycyny trzykrotnie zamrażano i rozmrażano celem uwolnienia wirusów z komórek. Tak przygotowaną zawiesinę wirowano przez 15 minut przy 5000 rpm, a uzyskany, jałowy supernatant zamrażano w temperaturze -20°C celem zabezpieczenia do dalszych badań. Uzyskanym w ten sposób materiałem zakażano eksperymentalnie 6-tygodniowe indyki, podając dożylnie uprzednio rozmrożony supernatant. Po 48 godzinach jeden z sześciu zakażonych eksperymentalnie ptaków padł, natomiast pozostałe poddano eutanazji po 72 godzinach od zakażenia. Badaniem sekcyjnym stwierdzono u wszystkich osobników kilkukrotne powiększenie i marmurkowatość śledziony oraz krwotoczne zapalenie błony śluzowej dwunastnicy tylko u indyka padłego. Od wszystkich ptaków doświadczalnych pobrano śledzionę i dwunastnicę, z których, podobnie jak opisano powyżej, przygotowano homogenat i ponownie zakażono nim wrażliwe indyki. W pięciu kolejnych pasażach wywoływano za każdym razem charakterystyczne dla HE zmiany anatomopatologiczne w śledzionie. Identyfikację wyizolowanego ze śledziony antygeny przeprowadzono testem immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID, Agar Gel Immunodiffusion) metodą mikro (4) z zastosowaniem surowicy diagnostycznej Chicken Reagent Serum Anti HEV firmy SPAFAS, USA (SN: TO127L).

Kolejny przypadek tej choroby w Polsce wystąpił w lutym 1988 r., w stadzie 16-tygodniowych indorów liczącym 3,5 tys. sztuk, w którym wystąpiły nagłe upadki. Padało 80-120 ptaków w ciągu doby z objawami krótkotrwałej depresji. Podobnie jak w poprzednim przypadku, potwierdzono testem AGID zakażenie wirusem HEV, a badaniem bakteriologicznym narządów wewnętrznych wykazano wzrost pałeczek *E. coli*.

Uzyskane w obu przypadkach pierwsze krajowe izolaty (HEV1 i HEV2) wirusa krwotocznego zapalenia jelit indyków zarchiwizowano i w ciągu kolejnych lat szczegółowo badano. Zaowocowało to powstaniem jednej rozprawy habilitacyjnej (11), pięciu prac doktorskich (1, 7, 18, 26, 29) oraz jednej pracy magisterskiej (10), a wyniki tych badań opublikowano w licznych polskich i zagranicznych czasopismach, jak również niejednokrotnie prezentowano podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych (13-15, 20, 21, 31).

W części eksperymentalnej badań własnych scharakteryzowano w zakresie taksonomicznym izolaty HEV uzyskane z pierwszych, opisanych w Polsce przypadków tej choroby u indyków. Określono wiel-

kość wirusów (metodą sączenia filtrami o średnicy porów od 450 do 50 nm), symetrię (techniką mikroskopii TEM), wrażliwość na temperaturę, pH 3 oraz rozpuszczalniki tłuszczowe (eter i chloroform), właściwości hemaglutynacyjne (w stosunku do krwinek kury, indyka i szczura), pokrewieństwo antygenowe z adenowirusami grupy I i II (AGID), zdolność do namnażania w hodowlach komórek zarodka kurzego i komórek nerki zarodka indycznego (11). Ponadto określono ich patogenność dla zakażanych eksperymentalnie indyków, u których szczegółowo obserwowano występowanie objawów klinicznych, zmian anatomopatologicznych oraz ultrastrukturalnych. Wpływ na wybrane wskaźniki immunologiczne u indyków w warunkach eksperymentalnych określano poprzez ich uodpornianie i śledzenie odsetka serokonwersji oraz reakcję na zakażenie kontrolne zjadliwym, zaadaptowanym do indyków szczepem ATCC-VR-898 wirusa MSD (11). W części terenowej badań prowadzono monitoring serologiczny stad oraz analizowano sytuację epizootyczną pod kątem roli zakażeń wirusem HE na zdrowotność i efekty produkcyjne u indyków reprodukcyjnych i rzeźnych (11, 13, 14, 21). Powyższe badania podjęto m.in. z powodu braku jakichkolwiek danych na temat krajowych szczepów HEV, ich rozprzestrzenienia i sytuacji epizootycznej. Dodatkową okolicznością, która przemawiała za podjęciem tego rodzaju badań, był fakt, że żadna placówka w Polsce nie zajmowała się tym zagadnieniem.

Wyizolowane z pierwszych krajowych przypadków wirusy krwotocznego zapalenia jelit (HEV1 i HEV2) są identyczne, a pod względem morfologicznym oraz właściwości fizykochemicznych zakwalifikowano je do rodziny *Adenoviridae*, rodzaju *Adenovirus* grupy II. Natomiast późniejsze badania innych autorów za pomocą technik hybrydyzacji i sekwencjonowania DNA wykazały, że wirus ten różni się od innych adenowirusów ptasich (*Aviadenovirus*) i zaliczono go do rodzaju *Siadenovirus*. Siadenowirusy posiadają charakterystyczny gen kodujący sialidazę, który odróżnia je od innych adenowirusów (12).

Wirus HE jest bezotoczkowym, dwudziestościnnym kapsydem wielkości 70-80 nm, złożonym z 252 kapsomerów, z czego 240 to niewierzchołkowe heksony i 12-wierzchołkowe pentony. Hekson jest głównym białkiem kapsydu, kodowanym przez bardzo zmienne domeny genomu, z czym wiąże się zmienność antygenowa wirusa. Te zmienne fragmenty białka tworzą pętle L1, L2 i L4. Pętle L1 i L2 ze względu na występowanie na powierzchni heksonu są odpowiedzialne za indukowanie odpowiedzi immunologicznej. Wirus HE na pentonach posiada tylko po jednym włóknie, co różni go od rodzaju *Aviadenovirus* (dawniej ptasich adenowirusów grupy I), które posiadają po dwa włókna, a przypomina wirusy ssaków należące do rodzaju *Mastadenovirus*. HEV nie przenosi się drogą pionową w odróżnieniu od adenowirusów grupy I

i atadenowirusów (dawniej adenowirusów grupy III), ale jest za to bardzo oporny na niekorzystne czynniki środowiskowe i wiele powszechnie stosowanych do dezynfekcji substancji chemicznych. Wirus HE, jak wszystkie adenowirusy, replikuje się w jądrze zakażonych komórek, w których są widoczne za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), jako puste lub gęste formy kapsydu układające się w luźno skupione pakiety lub krystaliczne szeregi (11). Po zakończeniu formowania kompletnych wirionów dochodzi do zniszczenia (cytolizy) zakażonej komórki gospodarza i uwolnienia wirusów potomnych. Przejawia się to uszkodzeniem błony jądrowej, marginacją chromatyny, zanikiem struktur błoniastych i poliribosomów oraz występowaniem licznych wakuoli w cytoplazmie. Niestety, HEV, w przeciwieństwie do większości adenowirusów ssaków i ptaków, nie namnaża się łatwo w dostępnych na rynku liniach komórek, co potwierdzają wyniki badań własnych (11). Można go namnażać jedynie w oryginalnej, transformowanej nowotworowo wirusem choroby Mareka linii limfoblastów B indyka (MDTC-RP 19), a także w indyckich leukocytach krwi obwodowej (9). Ten stan rzeczy wymusił nieco inne podejście do diagnostyki zakażeń tym wirusem, w której izolacja na zarodkach SPF czy w hodowli komórkowej nie odgrywa większego znaczenia.

Badania patogenności izolatu HEV1 potwierdziły, że zakażone nim drogą dożylną indyki, poza przejściowym posmutnieniem (u około 25%) osobników w 2.-3. dniu po infekcji (p.i.), nie wykazują innych objawów klinicznych. Jedynym powtarzalnym wskaźnikiem świadczącym o zakażeniu były zmiany anatomopatologiczne w śledzionie i podwyższony indeks śledzionowy pomiędzy 24. a 96. godziną p.i., ze szczytem w 72. godz., przy braku zmian krwotocznych w jelitach u większości (około 75%) indyków doświadczalnych. Zmiany te występowały jedynie u indyków, które wykazywały przejściową depresję. Kontrastujące z tymi obserwacjami było wykazanie zmian histopatologicznych w wątrobie, nerkach, torbie Fabrycjusza i błonie śluzowej dwunastnicy. W pierwszych dwóch narządach zaobserwowano m.in. przekrwienie oraz zmiany dystroficzne, a w tych ostatnich nacieki licznych komórek, głównie limfocytów. Ponadto badania testem AGID nad patogenizacją zakażenia dowiodły, że wirus osiąga wysokie miana nie tylko w śledzionie, ale również w innych narządach, np. w 72. godz. p.i. od $10^{-3.2}$ w nerce, sercu i żołądku gruczołowym do $10^{-4.7}$ w wątrobie. Dowiedziano zatem, że wirus namnaża się nie tylko w układzie immunologicznym zakażonych indyków, a miano wirusa w badanych narządach określono po raz pierwszy na świecie i wyrażano je w postaci ujemnych logarytmów obliczonych metodą Reeda i Muencha (11).

Podstawowe znaczenie w rozprzestrzenianiu zakażeń wirusem HE ma, wspomniana wcześniej, jego duża

oporność na niekorzystne czynniki środowiskowe. Źródłem zakażenia są zazwyczaj zanieczyszczone wirusem indyczniki, ściółka, pasza, woda i sprzęt do obsługi ptaków. Choroba często występuje w miejscach (indyczniki, ферmy, regiony chowu), w których była wcześniej notowana. Na naturalne zakażenie wrażliwe są przede wszystkim indyki w wieku powyżej 4.-6. tygodnia życia, a zachorowania najczęściej występują u ptaków 7-9-tygodniowych. Ptaki młodsze niż 4 tyg. są odporne na zakażenie, co potwierdzono w badaniach własnych, w których podawano dożylnie HEV1 indykom w wieku 2, 6, 16 i 28 dni. Po 4 dniach p.i. u żadnego z zakażonych eksperymentalnie indyków nie wykazano obecności antygenu wirusowego w śledzionie techniką AGID oraz nie stwierdzono charakterystycznych zmian anatomopatologicznych w tym narządzie (11). Dotychczas opisano na świecie tylko jeden przypadek HE u 2,5-tygodniowych indyków nieposiadających przeciwciał matczynych przeciwko HEV w surowicy (cyt. 12). Ogromną rolę w protekcji zakażenia wirusem HE przypisuje się humoralnym mechanizmom odporności, dlatego w badaniach własnych określono okres utrzymywania się przeciwciał matczynych u młodych indyków oraz zbadano swoistą odpowiedź czynną u starszych ptaków. Indyki wyklute z jaj pochodzących od niosek, które przeżyły zakażenie HEV bądź były szczepione, są odporne na zakażenie do 5.-6. tygodnia życia, pomimo braku lub niemożliwości wykrycia przeciwciał (zbyt niskie miana w surowicy) u osobników 4-tygodniowych. Można zatem przypuszczać, że nawet bardzo niskie (niewykrywalne) miana przeciwciał skutecznie hamują rozwój zakażenia lub że odporność indyków w pierwszych tygodniach życia nie zależy tylko od poziomu przeciwciał biernych i może być związana np. z niedorozwojem torby Fabrycjusza (5), a co za tym idzie – brakiem odpowiedniej liczby dojrzałych limfocytów B w organizmie. Po zakażeniu wirusy docierają do śledziony drogą krwi i przedostają się z zatok do perielipsoidalnego obszaru miazgi białej tego narządu, bogatej w limfocyty B, które razem z mononuklearnymi komórkami fagocytarnymi stanowią ich główny cel i miejsce replikacji. W zakażonych komórkach rozprzestrzeniają się po całym organizmie, docierając do kolejnych narządów i miejsc bogatych w limfocyty B i makrofagi, powodując spadek ich odsetka, na co wskazywali inni autorzy (24-28), a co potwierdzono w badaniach własnych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (17, 29, 30).

Oprócz śledziony HEV replikuje się także w migdałkach jelit ślepych, wątrobie, torbie Fabrycjusza, grasicy, błaszcze właściwej błony śluzowej dwunastnicy, nerkach i mięśni piersiowym, co potwierdzono badaniami własnymi z wykorzystaniem metod AGID i PCR (10, 11, 29). Wirus HE upośledza tym samym humoralne i komórkowe mechanizmy immunologiczne u zakażonych indyków, skutkując wzrostem

wrażliwości na zakażenia wtórne patogenami powszechnie występującymi w środowisku indycznika, zaostreniem się toczących procesów chorobowych, pogorszeniem skuteczności szczepień profilaktycznych i w konsekwencji powodując duże straty ekonomiczne w produkcji indyków. W związku z powyższym podjęto badania własne, których celem było określenie wpływu atenuowanego wirusa szczepionkowego HE oraz zakażeń indyków krajowym izolatem HEV1 na ich odporność poszczepienną przeciwko wirusowi ND oraz wrażliwość na zakażenie patogennym serotypem O₇₈K₈₀H₉ pałeczek *E. coli*. Uwzględniono przy tym także wpływ odstępu czasu między zakażeniem eksperymentalnym wirusem HE a szczepieniem indyków przeciwko ND lub zakażeniem pałeczkami *E. coli*. Ponadto zbadano wpływ szczepu Domermutha HEV używanego do produkcji szczepionki Dindoral SPF (Merial) na wrażliwość uodpornianych nim indyków na zakażenie izolatem HEV1 i/lub pałeczkami *E. coli* oraz na odpowiedź poszczepienną przeciwko NDV. Uzyskane wyniki badań wykazały u badanych indyków, zakażonych izolatem HEV1, niższą efektywność szczepień przeciwko NDV oraz wyższą wrażliwość tych ptaków na zakażenie pałeczkami *E. coli*. To immunosupresyjne oddziaływanie było znacznie silniejsze w układzie doświadczalnym, gdzie odstęp pomiędzy zakażeniem eksperymentalnym a szczepieniem przeciwko NDV wynosił 7 dni, w porównaniu do jednoczesnego zakażenia i wakcynacji. Podobne wyniki uzyskano w przypadku zakażenia HEV1 i pałeczkami *E. coli* (7). Było to spowodowane znaczną redukcją liczby limfocytów B (IgM⁺) i T (CD3⁺CD8⁺) we krwi i w śledzionie w okresie od 4. do 7. dnia p.i. Dodatkowo wirus HE powoduje w śledzionie istotny wzrost odsetka subpopulacji limfocytów T CD4⁺, w tym także subpopulacji CD4⁺IFNγ⁺ intensywnie wydzielającej interferon gamma (17, 29, 30). Szczepionkowy wirus HE nie wpływał na odpowiedź immunologiczną indyków po uodpornieniu ich przeciwko wirusowi ND oraz na ich wrażliwość na zakażenie pałeczkami *E. coli* (7). Jest on na tyle atenuowany, by nie powodować immunosupresji, zwłaszcza gwałtownego spadku liczby dojrzałych limfocytów B (IgM⁺) we krwi, śledzionie oraz innych narządach układu immunologicznego indyków, co wykazano niejednokrotnie w badaniach własnych, przy zachowaniu właściwości immunogennych potwierdzonych testem ELISA oraz zakażeniem kontrolnym (7, 29, 30).

Zakażenie samym wirusem HE czy dodatkowo innymi patogenami oportunistycznymi prowadzi do uruchomienia kaskady reakcji organizmu zwanej reakcją ostrej fazy. Aktywowane komórki zakażonego organizmu wydzielają cytokiny i doprowadzają do zmiany metabolizmu całego organizmu, który zaczyna wykorzystywać składniki odżywcze w kierunku wzmożenia procesów immunologicznych. Jednym z procesów zachodzących podczas wczesnej fazy odpowiedzi za-

palnej jest zmiana koncentracji specyficznych białek osocza, określanych jako białka ostrej fazy (BOF), które pojawiają się szybciej niż specyficzne przeciwciała oraz wzrasta poziom lizozymu. BOF, syntetyzowane podobnie jak u ssaków, w hepatocytach są zaangażowane w różne procesy fizjologiczne prowadzące do odzyskania homeostazy zaburzonej działaniem zakaźnych i niezakaźnych czynników patologicznych (18). W badaniach własnych wykazano, że odpowiedź ostrej fazy u indyków zakażonych wyłącznie wirusem HE jest dużo słabsza niż podczas zakażeń bakteryjnych, np. pałeczkami *E. coli* (18-20). Istotny wzrost aktywności lizozymu w surowicy, obserwowany u indyków od 4. do 6. doby po zakażeniu krajowym izolatem HEV był także notowany u 5-dniowych piskląt indyckich wykłutych z jaj, do których w 26. dobie inkubacji aplikowano szczepionkowy szczep Domermutha wirusa HE. W badaniach tych, których głównym celem było określenie wpływu syntetycznego immunomodulatora – izoprynozy, podawanej do jaja w 26. dobie inkubacji, na wyniki wylęgu piskląt indyckich oraz na ich układ immunologiczny i wskaźniki biochemiczne, oceniano także skuteczność uodporniania tych ptaków przeciwko HE metodą *in ovo* z jednoczesną immunomodulacją (1, 16).

Wymienione wcześniej, niezwykle złożone mechanizmy immunosupresji występujące u zakażonych HEV indyków były inspiracją do wykorzystania w badaniach własnych zjawiska immunomodulacji z zastosowaniem naturalnych i syntetycznych preparatów, celem przywrócenia prawidłowej reaktywności układu odpornościowego u zakażonych tym wirusem indyków (1, 26, 29). Postępowanie takie ma na celu, z jednej strony, ograniczyć negatywne skutki oddziaływania czynników immunosupresyjnych, w tym powszechnie występujących zakażeń wirusowych, z drugiej – polepszyć zdrowotność indyków, a przez to, zmniejszając ilość stosowanych chemioterapeutyków, poprawić efektywność chowu i jakość pozyskiwanych produktów drobiarskich. Zastosowana w badaniach własnych izoprynozy, zarówno *in ovo*, jak i *per os*, jest skuteczna w modulowaniu procesów immunologicznych, gdyż pobudza nieswoiste mechanizmy odporności humoralnej i komórkowej wyrażonej korzystnym wpływem na odsetek subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD4⁺ w śledzionie, a także CD3⁺CD8⁺ i B IgM⁺ we krwi mierzony metodą cytometrii przepływowej. Ponadto izoprynozy wykazuje właściwości antywirusowe, co potwierdzono metodą PCR oraz badaniami *in vitro* limfocytów T CD4⁺, które istotnie zwiększały syntezę IFN-γ w odpowiedzi na stymulację mitogenami (30). Przekładało się to na zmniejszenie liczby próbek, w których wykryto obecność materiału genetycznego wirusa HE w różnych odstępach czasu po zakażeniu eksperymentalnym. Również β-glukany izolowane z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suplementowane do paszy w dawce 170 mg/kg paszy przez

14 dni przed lub przez 14 dni przed i przez 5 dni po infekcji wykazują u zakażonych HEV indyków działanie przeciwwirusowe i immunokorygujące, czego dowodem było zahamowanie ponadnormatywnego wzrostu odsetka limfocytów T CD3⁺CD4⁺ w śledzionie (29).

W badaniach własnych wykazano także wysoko istotny wzrost ekspresji genu kodującego IFN- γ w komórkach mononuklearnych wyizolowanych ze śledziony indyków po 14 dniach od zakażenia eksperymentalnego HEV1, przy jednoczesnym spadku liczby kopii genu hexon wirusa HE w tym narządzie, oznaczanych opracowaną w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie metodą Real-Time PCR (31). Świadczy to o ogromnej roli tego czynnika w eliminacji wirusa u zakażonych indyków, którego wydzielanie można skutecznie stymulować poprzez zastosowanie naturalnych lub syntetycznych immunomodulatorów.

Stan immunosupresji u zakażonych bezobjawowo wirusem HE indyków ma ogromne znaczenie praktyczne, czego wyrazem jest występowanie zespołów (syndromów) chorobowych będących wypadkową interakcji pomiędzy różnymi czynnikami zakaźnymi i niezakaźnymi. Ponieważ obraz kliniczny w takich przypadkach jest najczęściej wynikiem wtórnych procesów chorobowych (kolibakterioza, ornitobakterioza, bordeteloza), podjęte leczenie nie może być z oczywistych względów skuteczne, gdyż nie likwiduje czynnika pierwotnego. Zatem jest to tylko terapia objawowa, która nie chroni indyków przed występowaniem podobnych problemów w fermie podczas kolejnych wstawień, co jest zadaniem poprawnie ułożonego programu profilaktyki swoistej, w tym szczepienia przeciwko wirusowi HE oraz prawidłowego przygotowania budynków i przestrzegania zasad bioasekuracji.

W profilaktyce swoistej krwotocznego zapalenia jelit indyków znajduje zastosowanie szczepionka żywa Dindoral SPF (Merial), którą podaje się jednorazowo z wodą do picia w 28.-35. dniu życia, chociaż jest także skuteczna po podaniu *in ovo* (16). Szczepionkę stanowi homogenat śledzion indyków zakażonych niepatogennym szczepem Domermutha wirusa HE. Należy jednak pamiętać, że wirus szczepionkowy może również w pewnych okolicznościach wywołać immunosupresję lub szczepienia mogą być nieskuteczne. Dowodem tego są badania przeprowadzone z użyciem nowoczesnych metod biologii molekularnej na terenie Węgier, w których wykazano, że w stadzie indyków po 3-4 tygodniach od ich szczepienia przeciwko wirusowi HE wystąpiła kolibakterioza. W wyizolowanym od padłych ptaków materiale stwierdzono bowiem obecność adenowirusa o sekwencji genu hexon w pełni homologicznej ze szczepionkowym szczepem Domermutha. Ponadto, u padłych indyków stwierdzono powiększenie i marmurkowatość śledziony z silnym rozplemem

miazgi białej (22). Podobne sytuacje mają miejsce niezwykle rzadko, a ich mechanizm jak dotąd nie został wyjaśniony, chociaż można przypuszczać, że wysoki poziom przeciwciał matczynych w dniu szczepienia doprowadził do neutralizacji wirusa szczepionkowego. Takie indyki, u których nie powstała odporność poszczepienna, mogły ulec zakażeniu immunosupresyjnym szczepem terenowym wirusa HE w pełni homologicznym ze szczepem szczepionkowym. Dla uniknięcia takich sytuacji zaleca się oznaczanie miana przeciwciał w surowicy indyków przed planowanym terminem wakcynacji, czego nie musimy wykonywać podając szczepionkę zarodkom.

W badaniach własnych również sekwencjonowano fragment genu hexon o długości 1647 pz u krajowych izolatów HEV1 i HEV2 oraz u wirusów szczepionkowego (Dindoral SPF) i standardowego (Charles River Lab., USA). Badania wykazały ponad 99% homologii w sekwencji tego genu u badanych wirusów, zatem nie jest on dobrym markerem do określania różnic pomiędzy szczepami o zróżnicowanej zjadliwości (31).

Niestety, krwotoczne zapalenie jelit indyków nie jest możliwe do rozpoznania wyłącznie na podstawie objawów klinicznych, których, jak wspomniano wcześniej, zazwyczaj brak. Charakterystyczne powiększenie i marmurkowatość śledziony mogą nasuwać podejrzenie HE. Rozpoznanie choroby należy potwierdzić badaniami laboratoryjnymi. Obecność wirusa w materiale biologicznym pobranym od padłych indyków (np. śledziony) można potwierdzić szybko, dość czułą, a przede wszystkim taną i niewymagającą drogiego sprzętu metodą, jaką jest AGID (4, 11). Coraz powszechniej jednak w laboratoriach wirus krwotocznego zapalenia jelit jest wykrywany w badanych próbkach za pomocą klasycznej metody PCR (8). Metoda ta jest jeszcze bardziej czuła niż AGID i pozwala wykryć materiał genetyczny nawet śladowych ilości wirusa w badanych próbkach, jednak nie można za jej pomocą określić liczby kopii genu poszukiwanego wirusa w badanym materiale (10, 29). Stąd lepszą i czulszą techniką wykrywania obecności w badanym materiale wirusa HE okazała się opracowana i zoptymalizowana w Katedrze Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie metoda Real-Time PCR. Dołączając do tego sekwencjonowanie genów odpowiedzialnych za wirulencję, takich jak ORF1, E3 i Fib knob, które są wykonywane w Katedrze, można potwierdzić, z jakim szczepem HEV ma się do czynienia. Kontakt indyków z wirusem HE można również potwierdzić, określając miano przeciwciał anty-HE w surowicy z zastosowaniem komercyjnych testów ELISA.

W badaniach wykonanych w 2016 r. współfinansowanych ze środków Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” opracowano test ELISPOT do wykrywania we krwi indyków limfocytów T pamięci immunologicznej, swoiście uczu-

lonych przeciwko wirusowi HE, które, jak wiadomo, utrzymują się w organizmie zdecydowanie dłużej niż przeciwciała czy wirusy. Zarówno techniką ELISA, jak i ELISPOT nie można jednak odróżnić indyków zakażonych wirusami terenowymi od ptaków szczepionych, co obecnie jest możliwe wyłącznie w przypadku zastosowania technik biologii molekularnej (3).

Z uwagi na ograniczoną objętość opracowania przedstawiono tylko zarys badań własnych prowadzonych w okresie ostatnich trzydziestu lat nad rolą krajowego izolatu wirusa HE w patologii indyków. Z wyników tych badań można jednak wyprowadzić dwa istotne wnioski. Po pierwsze, że zakażenia indyków wirusem HE o silnych właściwościach immunosupresyjnych są w naszym kraju powszechne, i po drugie, że metodyka badań własnych z tego zakresu w opisanym okresie ulegała radykalnej zmianie i bazuje aktualnie na cytometrii przepływowej i technikach biologii molekularnej.

Piśmiennictwo

1. Andrzejewski M.: Wpływ metisoprinolu zastosowanego in ovo na układ odpornościowy oraz wybrane wskaźniki biochemiczne krwi u indyków. Praca doktorska, UWM Olsztyn 2007.
2. Arbuckle J. B., Parsons D. G., Luff P. R.: Haemorrhagic enteritis syndrome of turkeys. *Vet. Rec.* 1979, 104, 435-436.
3. 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.* 2009, 90, 1978-1985.
4. Domermuth C. H., Gross W. B., DuBoise R. T., Douglass C. S., Reubush C. B.: Agar gel diffusion precipitin test for hemorrhagic enteritis of turkeys. *Avian Dis.* 1972, 16, 852-857.
5. Fitzgerald S. D., Reed W. M.: Pathogenesis of marble spleen disease in bursectomized and non-bursectomized ring-necked pheasants following oral inoculation with cell-culture-propagated virus. *Avian Dis.* 1991, 35, 579-584.
6. Gross W. B., Moore W. E. C.: Hemorrhagic enteritis of turkeys. *Avian Dis.* 1967, 11, 296-307.
7. Guiro S.: Badania nad immunosupresyjną rolą wirusa krwotocznego zapalenia jelit u indyków. Praca doktorska, UWM Olsztyn 2000.
8. Hess M., Raue R., Hafez H. M.: PCR for specific detection of hemorrhagic enteritis of turkeys, an avian adenovirus. *J. Virol. Meth.* 1999, 81, 199-203.
9. Hurk J. V. van den: Efficacy of avirulent hemorrhagic enteritis virus propagated in turkey leukocyte cultures for vaccination against hemorrhagic enteritis in turkeys. *Avian Dis.* 1990, 34, 26-35.
10. Janta M.: Badanie rozprzestrzeniania się wirusa krwotocznego zapalenia jelit w organizmie indyków metodą łańcuchowej reakcji polimerazy; optymalizacja warunków reakcji. Praca magisterska, UWM, Olsztyn 2008.
11. Koncicki A.: Charakterystyka krajowych izolatów adenowirusa krwotocznego zapalenia jelit (HE) indyków i ocena sytuacji epizootycznej w Polsce. Rozprawa habilitacyjna. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst., Veterinaria* 1996, 22, 1-43.
12. Koncicki A.: Krwotoczne zapalenie jelit indyków (Hemorrhagic Enteritis – HE), [w:] Mazurkiewicz M. (red.): *Choroby drobiu*. Wrocław 2011, s. 440-444.
13. Koncicki A., Krasnodębska-Depta A., Guiro S.: Haemorrhagic enteritis virus infection in turkey farms in Poland. XI Internat. Congress World Vet. Poult. Ass., Budapeszt 1997, s. 256.
14. Koncicki A., Krasnodębska-Depta A., Guiro S., Jankowski J.: Analiza sytuacji epizootycznej w zakresie zakażeń wirusem krwotocznego zapalenia jelit i jego wpływ na produktywność indyków rzeźnych. *Mat. VII Symp. Drob. pt. „Aspekty zootechniczno-weterynaryjne chowu drobiu grzebiącego ze szczególnym uwzględnieniem indyków”*. Polanica Zdrój 1997, s. 69-70.
15. Koncicki A., Rumińska-Groda E., Mazur-Gonkowska B., Krasnodębska-Depta A., Bukowska A., Andrzejewski M.: Wpływ izoprynozy podawanej in ovo na nieswoiste parametry odporności humoralnej i komórkowej u indyków zakażonych wirusem HE i pałeczkami *E. coli*, [w:] Wieliczko A. (red.): *Immunosupresja i immunomodulacja układu odpornościowego ptaków – możliwości immunoprofilaktyki*. Wyd. E.P.H. „ELMA”, Wrocław 2003, s. 3-84.
16. Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Andrzejewski M.: Assessment of the efficiency of applying methisoprinol and vaccination of turkeys against the haemorrhagic enteritis virus using in ovo methods. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2009, 53, 13-15.
17. Koncicki A., Tykałowski B., Stenzel T., Śmialek M., Pestka D.: Effect of infection of turkeys with haemorrhagic enteritis adenovirus isolate on cellular immunity and the course of colibacillosis. *Polish J. Vet. Sci.* 2012, 15, 215-220.
18. Mazur-Gonkowska B.: Białka ostrej fazy i inne wybrane parametry odporności nieswoistej u indyków zakażonych wirusem HE lub pałeczkami *E. coli*. Praca doktorska, UWM, Olsztyn 2001.
19. Mazur-Gonkowska B., Koncicki A., Krasnodębska-Depta A.: Assessment of acute phase response in turkeys experimentally infected with *Escherichia coli* or Haemorrhagic enteritis virus. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2004, 48, 19-23.
20. Mazur-Gonkowska B., Koncicki A., Krasnodębska-Depta A.: The activity of lisozymy and a complement in turkeys infected with haemorrhagic enteritis virus. *Polish J. Vet. Sci.* 2001, 4, 135.
21. Minta Z., Koncicki A., Tomczyk G., Krasnodębska-Depta A., Ramza J.: Current status of turkey diseases in Poland. 1st Internat. Symp. on Turkey Diseases, Berlin 1998, s. 21-22.
22. Palya V., Nagy M., Glávits R., Ivanics E., Szalay D., Dán A., Süveges T., Markos B., Harrach B.: Investigation of field outbreaks of turkey haemorrhagic enteritis in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 2007, 55, 135-149.
23. Pomeroy B. S., Fenstermacher R.: Hemorrhagic enteritis in turkeys. *Poult Sci.* 1937, 16, 378-382.
24. Rautenschlein S., Sharma J. M.: Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys. *Devel. Comp. Immunol.* 2000, 24, 237-246.
25. Rautenschlein S., Suresh M., Sharma J. M.: Pathogenic avian adenovirus type II induces apoptosis in turkey spleen cells. *Arch. Virol.* 2000, 145, 1671-1683.
26. Rumińska-Groda E.: Wpływ izoprynozy na dynamikę zjawisk immunologicznych oraz przebieg zakażenia wirusem HE i pałeczkami *E. coli* u indyków. Praca doktorska, UWM, Olsztyn 2002.
27. Suresh M., Sharma J. M.: Hemorrhagic enteritis virus induced changes in the lymphocyte subpopulations in turkeys and the effect of experimental immunodeficiency on viral pathogenesis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995, 45, 139-150.
28. 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, 70, 30-36.
29. Tykałowski B.: Wpływ methisoprinolu i β -glukanów na wybrane parametry odporności nieswoistej oraz na przebieg zakażenia adenowirusem krwotocznego zapalenia jelit (HEV) u indyków. Praca doktorska, UWM, Olsztyn 2012.
30. Tykałowski B., Koncicki A.: Wpływ zakażenia indyków wirusem krwotocznego zapalenia jelit i immunomodulacji na kształtowanie się odsetka subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+ syntetyzujących IFN- γ . *Cytometria Polska* 2012, 1, 85-105.
31. Tykałowski B., Śmialek M., Kowalczyk J., Pestka D., Stenzel T., Koncicki A.: The influence of haemorrhagic enteritis virus infection on the immunological system and the associated risk of pathogenic *E. coli* in turkeys in Poland. 11th Turkey Science and Production Conference, UK, Chester 2017, s. 38-40.

Adres autora: dr wet. Bartłomiej Tykałowski, ul. Hallera 4a/17, 10-693 Olsztyn; e-mail: bartlomiej.tykalowski@uwm.edu.pl