

[Osoblyvosti bakterialnoi flory ptashynykh ferm riznykh oblastei Ukrainy]. *Visnyk SNAU*, No. 1, pp. 91-93. (in Ukrainian)

7. Stehniy B. T. and Herman V. V. (2003), *Infectious diseases of poultry* [Infektsiini khvoroby ptytsi] : posibnyk. Kharkiv: Folio. 125 p. (in Ukrainian)

8. Fotina T. I. (2002), Spectrum of serovariants of E.coli persistent in organism of poultry in Ukraine. 11 *European Poultry conference*, Bremen, Germany. pp. 183-184.

9. Lutsyk O. [ta in.]. (2001). International histological nomenclature [Mizhnarodna histolohichna nomenklatura], Lviv-Kyiv : Nautilus, 282 p. (in Ukrainian)

Паникар И. И., Сусол Р. Л., Коломак И. А. Морфологические изменения при колибактериозе голубей.

Было исследовано патоморфологические изменения и проведено гистологические исследования внутренних органов голубей при колибактериозе. Исследовали трупы птицы, из органов которой было выделено и идентифицировано возбудителя E. Coli. Возбудители других инфекционных болезней были не патогенны. Колибактериоз голубей сопровождается кахексией и дегидратацией организма. Изменения в печени характеризуются дистрофическими процессами (84 %) и нарушением гемодинамики. В тонком отделе кишечника патологический процесс характеризуется явлениями альтерации и воспалительной инфильтрации слизистой оболочки (94 %), при подостром и хроническом течении – гранулематоз (25 %). В почках при спонтанном колибактериозе у диких голубей установлены признаки очагового интерстициального воспаления (95 %), зернистая дистрофия (89 %), гемосидероз. В отдельных случаях патологический процесс сопровождается продуктивным воспалением с образованием гранулем и разрастанием волокнистой соединительной ткани (25 %).

Ключевые слова: колибактериоз, голуби, патоморфологические изменения, альтерация, воспаление, гемосидероз.

Panikar I., Susol R., Kolomak I. Morphological changes in colibacillosis of pigeons.

Pathomorphological changes were studied and histological investigations of the internal organs of pigeons were carried out with colibacillosis. The corpses of a bird were investigated, from the organs of which the E. Coli pathogen was isolated and identified. The causative agents of other infectious diseases were not pathogenic. Colibacillosis of pigeons is accompanied by cachexia and dehydration of the body. Changes in the liver are characterized by degenerative processes (84 %) and a violation of hemodynamics. In the small intestine the disease process characterized by alteration phenomena and mucosal inflammatory infiltration (94 %) in subacute and chronic course – granulomatosis (25 %). In the kidneys with spontaneous colibacillosis, wild pigeons have signs of focal interstitial inflammation (95 %), granular degeneration (89 %), hemosiderosis. In some cases, the pathological process is accompanied by a productive inflammation with the formation of granulomas and proliferation of fibrous connective tissue (25 %).

Keywords: colibacillosis, pigeons, pathomorphological changes, alteration, inflammation, hemosiderosis.

Дата надходження до редакції: 23.01.2018 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Камбур М. Д.

УДК 619:578.831.3:636.5

УДОСКОНАЛЕННЯ РЕАКЦІЇ ДИФУЗНОЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МЕТАПНЕВМОВІРУСУ ПТИЦІ

Р. А. Дубін, к.вет.н., доцент*

П. В. Шарандак, д.вет.н., доцент**

Л. Г. Улько, д.вет.н., професор***

*Луганський національний аграрний університет, м. Харків

**Білоцерківський національний аграрний університет

***Сумський національний аграрний університет

У статті представлені результати досліджень, щодо удосконалення реакції дифузної преципітації для виявлення метапневмовірусу птиці. За допомогою преципітації сульфатом амонію із гіперімунної сироватки виділено специфічний глобулін. Визначено його концентрацію та діагностичні показники. Отримано дані про неефективність використання хлороформу та петролейного ефіру для очищення ембріонального антигену метапневмовірусу птиці від жовтку.

Ключові слова: метапневмовірус птиці, реакція дифузної преципітації, імуноглобуліни.

За визначенням ВОЗ до імуноглобулінів відносять білки тваринного походження, що мають активність антитіл, а також білки, що мають схожість з антитілами по хімічній структурі та антигенній специфічності. Антитіла містяться в γ -глобуліновій фракції сироватки крові, тому для їх максимального очищення слід виділяти саме цю фракцію. Імуноглобуліни мають 5 класів, з них лише три мають діагностичне значення при виявленні антигену *in vitro*: IgG, IgM та IgA, а їх вміст в сироватці відповідно 8-16 мг/мл, 0,5-1,9 мг/мл і 1,4-4,2 мг/мл. Антитіла різної специфічності можуть міститися в будь-якому класі імуноглобулінів. За допомогою 1,49-2,05 М розчину сульфату амонію ці білки можна осадити з розчину [3].

Чутливість різних методів для виявлення антитіл варіює: для імунопреципітаційного методу вона складає 30-60 мкг/мл, тоді як колориметричний біуретовий метод дозволяє визначити 120 мкг/мл [3]. Але навіть при використанні такого

чутливого методу як ІФА можна отримати псевдопозитивні та псевдонегативні результати аналізу, що викликане неспецифічною реакцією компонентів тест систем та біологічними факторами дослідного матеріалу [4]. Тому слід максимально очищувати реагенти від супутніх продуктів для підвищення діагностичної цінності отриманого результату.

Для очищення антитіл найбільш загальним є метод преципітації сульфатом амонію. Отриманий цим методом продукт не досить чистий, але показує підвищену активність в реагуючих системах і його подальше очищення не потрібне [6].

Для контролю якості антитіл застосовують наступні рекомендації: 1) використовують стандартний антиген (очищена речовина у розчині, мікроорганізми); 2) за можливості завжди використовують контрольну сироватку; 3) завжди включати в систему контролю ті методи, заради яких отримано діагностичний реагент [1].

Метою наших досліджень було отримання діагностичного глобуліну, визначення його хімічних і діагностичних характеристик, а також знайти кращий метод очищення ембріонального антигену для РДП.

Мета і методи досліджень. Метою наших досліджень було отримання діагностичного глобуліну, визначення його хімічних і діагностичних характеристик, а також знайти кращий метод очищення ембріонального антигену для реакції дифузної преципітації (РДП).

Глобуліни отримували шляхом дворазового висолювання насиченим розчином сульфату амонію гіперімунної сироватки кроля, яка мала титр в РДП 1:64 (специфічний глобулін) та контрольної сироватки (контрольний глобулін) при співвідношенні сироватки до розчину сульфату амонію 5:3). Після висолювання глобулін осаджували центрифугуванням протягом 30 хв. при 1000 г. Осад розчиняли в фосфатно-сольовому буфері з рН=7,0 [7].

Вміст білка глобулінової фракції та антигену визначали на фотоелектроколориметрі (КФК) за допомогою біуретової реакції. Для цього використовували діагностичний набір фірми Фелісіт-Діагностика для визначення загального білка.

Концентрацію визначали спочатку за допомогою калібрувальної кривої, використовуючи полумікрометод визначення за вимогами фірми-виробника набору, щоб одержати дані про приблизну концентрацію білку у розчині для подальшого дослідження. Коротко, до 2 мл біуретового реактиву додавали 40 мкл розчину білка (калібрувального або дослідного). Після інкубації при кімнатній температурі на протязі 30 хв. визначали оптичну щільність калібрувальних розчинів з концентрацією 40 г/л, 60 г/л, 80 г/л, 100 г/л. Отримані значення наносили на координатну площу: ось абсцис – концентрація, а ось ординат – показники оптичної щільності. Точки з'єднували в криву на якій по показникам оптичної щільності визначали концентрацію отриманого протеїну в розчині.

Точну концентрацію визначали за допомогою математичного методу. Для цього робили розчин контрольного білку з набору в концентрації, близької до концентрації білка в дослідних розчинах, згідно з даних калібрувальної кривої. Після цього використовували модифіковану біуретову реакцію за методикою Горналла, Бардавілла і Девіда: до 0,5 мл дослідного розчину білку додавали 2,5 мл біуретового реактиву. Після витримки на протязі 30 хв. вимірювали концентрацію контрольного і дослідних розчинів на КФК при довжині оптичного шляху 0,5 см і довжині хвилі 540 нм [5]. Одержані дані підставляли в формулу (1):

$$C_x = C_s \cdot \frac{A_x}{A_s} \quad (1)$$

де C_x – концентрація дослідного протеїну в розчині, C_s – концентрація калібрувального протеїну (відома), A_s – оптична щільність калібрувального протеїну, A_x – оптична щільність дослідного протеїну [2].

Таким чином визначили концентрацію дослідного глобуліну гіперімунної сироватки кроля, глобуліну контрольної сироватки кроля та антигену – польового ізоляту PV-3 метанемовірусу.

Для визначення чутливості використовували РДП із титруванням контрольного і дослідного глобулінів проти антигену, а також титрування антигену з коефіцієнтом розбавлення 2 проти гіперімунної сироватки та отриманого з неї глобуліну.

Результати власних досліджень та їх обговорення. Після дворазового очищення отримали прозорий опалесцючий розчин, об'єм якого в 1,5 рази перевищував об'єм використаної сироватки. За результатами визначення оптичної щільності калібрувальних розчинів побудували калібрувальну криву (рис. 1), за допомогою якої визначили концентрації специфічного та контрольного глобулінів і специфічного антигену.

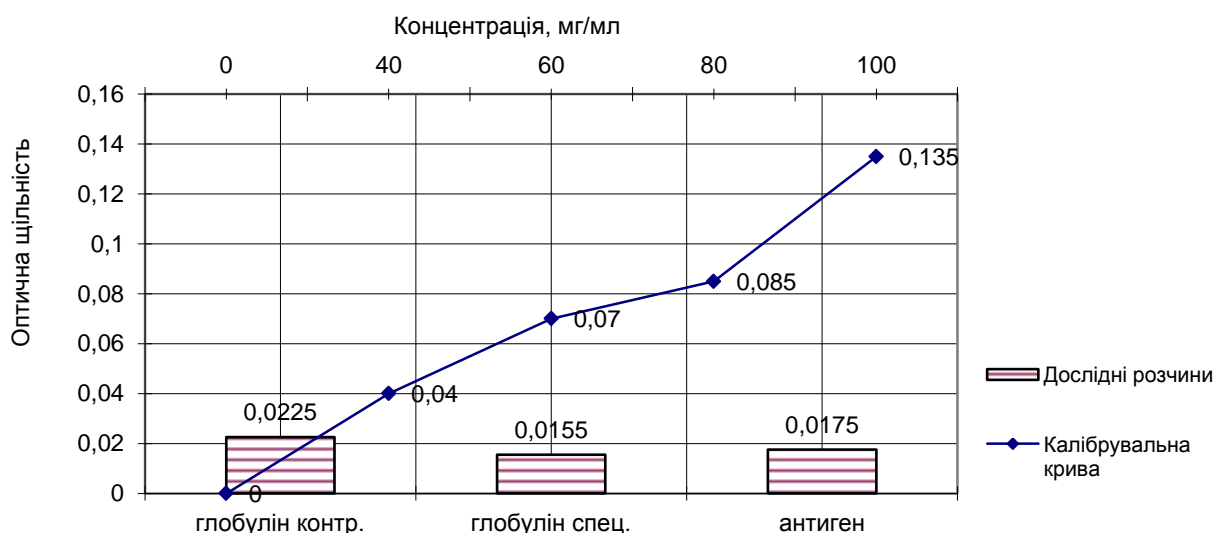


Рис. 1. Калібрувальна крива для грубого визначення концентрації білка в дослідному розчині.

За даними калібрувальної кривої концентрації дослідних розчинів приблизно однакові і лежать в межах 10-20 мг/мл.

Тому для математичного методу ми використали ка-

лібрувальний розчин з концентрацією 4 мг/мл шляхом розбавлення калібрувального розчину з концентрацією 40 мг/мл з коефіцієнтом 10^{-1} . Отримані дані оптичної щільності і обчисленої концентрації подані в таблиці 1.

Дані математичного методу обчислення концентрації протеїнів в дослідних розчинах

Показники	Дослідна речовина	Калібрувальний протеїн	Контрольний глобулін	Специфічний глобулін	Антиген пташиного метапневмовірусу
Оптична щільність		0,0525	0,184	0,12	0,29
Обчислена концентрація, мг/мл		4	14	9,1	22,1

При проведенні детекції в РДП встановлено, що титр отриманого специфічного глобуліну до використаного антигену склав 1:32 (рис. 2 а), що в 2 рази менше за титр використаної для його виготовлення сироватки. При титруванні антигену встановлено, що за допомогою специфічної сироватки можна визначити його титр 1:4 (рис. 2 б) але реакція супроводжувалася появою димчастих артефактів навколо центральної лунки, тоді як використання глобуліну дозволяє визначити титр антигену 1:64 без артефактів (рис. 2 в). Контрольний глобулін не давав позитивної реакції (рис. 2 г).

ватки можна визначити його титр 1:4 (рис. 2 б) але реакція супроводжувалася появою димчастих артефактів навколо центральної лунки, тоді як використання глобуліну дозволяє визначити титр антигену 1:64 без артефактів (рис. 2 в). Контрольний глобулін не давав позитивної реакції (рис. 2 г).

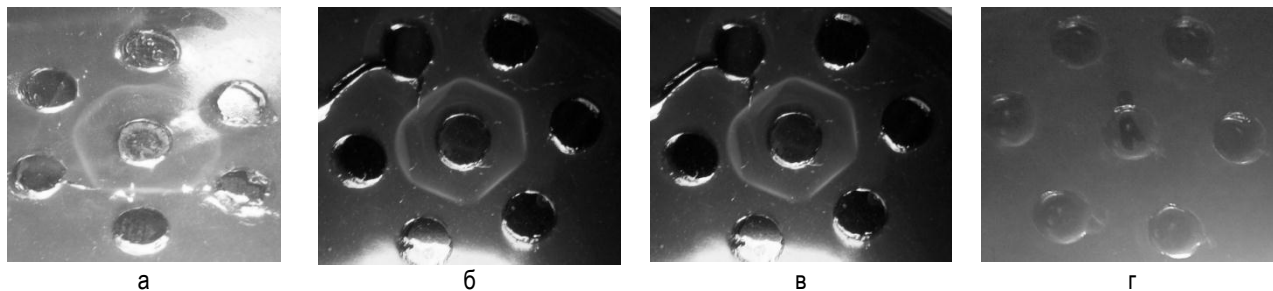


Рис. 2. Реакція дифузної преципітації:

- а) титрування отриманого глобуліну; б) титрування антигену проти специфічного глобуліну; в) титрування антигену проти сироватки, з якої отримали глобулін; г) титрування контрольного глобуліну.

Таким чином чутливість глобулінового препарату була вище чутливості гіперімунної сироватки в 16 разів, отриманий глобуліновий препарат здатний визначити 0,34 мг/мл антигену пташиного метапневмовірусу в дослідному розчині антигену і достатньо 0,28 мг/мл концентрації глобуліну для позитивної детекції.

Висновки і пропозиції. Використання двічі очище-

ного препарату глобуліну з гіперімунної сироватки кроля дає змогу отримати діагностичний засіб у 16 разів чутливіший за попередній. За допомогою отриманого специфічного глобуліну можна виявити антиген МПВ птиці при концентрації до 0,34 мг/мл у РДП. Ефективною концентрацією отриманого специфічного глобуліну для детекції антигену в РДП є 0,28 мг/мл.

Список використаної літератури:

1. Кэти Д. Антитела. Методы. Москва, 1991. С. 33-133.
2. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Ленинград, 1986. С. 173-174.
3. Вершигора А.А. Основы иммунологии: руководство. Киев, 1980. С. 92-200.
4. Кислых Е. Н., Максименко Е. В., Сергеева Т. А., Шагинян В. Р. Ошибки иммуноферментной диагностики. *Лабораторная диагностика*, 2005. Вип. 4 (34). С.43-49.
5. Скоупс Р. Методы очистки белков Москва. 1985. 341 с.
6. Immunoassays. A practical approach. Oxford University Press, 2000. 52 p.
7. Nowotny A. Basic exercises in immunochemistry. Springer-Verlag, 1979. P. 1-3.

References:

1. Cathy D. (1991), Antibodies: methods [Antytela. Metody]. Moscow, pp.33-133. (in Russian)
2. Bulatov M. And Kalinkin I. (1986), Practical guide for fotometric methods of analysis [Praktyčeskoe rukovodstvo po fotometryčeskym metodam analiza]. Leningrad, pp. 173-174. (in Russian)
3. Vershhygora A. A. (1980), Basis of immunology: guide [Osnowy ymmunolohyy: rukovodstvo]. Kiev, pp. 92-200. (in Russian)
4. Kislykh E. N., Maximenok E. V., Sergeeva T. A. and Shaginyan V. R. (2005), "Mistakes of Elisa diagnostics" [Ošybky ymmunofermentnoj dyahnostyky], *Laboratory diagnostics*. Is. 4 (34), pp. 43-49. (in Russian)
5. Scoups P. (1985), Methods of purification of proteins [Metody očystky belkov], Moscow, 341 p. (in Russian)
6. Immunoassays. A practical approach (2000), Oxford University Press, 52p.
7. Nowotny, A. (1979), Basic exercises in immunochemistry. Springer-Verlag, pp. 1-3.

Дубин Р. А., Шарандак П. В., Улько Л. Г. Усовершенствование реакции дифузной преципитации для выявления метапневмовируса птицы.

В статье представлены результаты исследований, по усовершенствованию реакции диффузной преципитации для выявления метапневмовируса птицы. С помощью преципитации сульфатом аммония в гипериммунной сыворотке выделен специфический глобулин. Определены его концентрацию и диагностические показатели. Получены данные о неэффективности использования хлороформа и петролейного эфира для очистки эмбрионального антигена метапневмовируса птицы от желтка.

Ключевые слова: метапневмовирус птицы, реакция диффузной преципитации, иммуноглобулины.

Dubin R.A., Sharandak P.V., Ulko L. G. Improvement of the diphsic precipitation reaction for detection of metapneumavirus of the bird.

The article presents the results of studies on the improvement of the diffuse precipitation reaction for the detection of metapneumovirus of a bird. With the precipitation of ammonium sulfate in hyperimmune serum, a specific globulin was isolated. Its concentration and diagnostic indices are determined. Data on the inefficiency of the use of chloroform and petroleum ether for purification of the embryonic antigen of the metapneu-

movirus of poultry from yolk have been obtained.

Keywords: bird metapneumovirus, diffuse precipitation reaction, immunoglobulins.

Дата надходження до редакції: 06.02.2018 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В. Ю.

УДК 619:616 (612.41+612.42)

ОСОБЛИВОСТІ ПАТОГЕНЕЗУ, ПАТОМОРФОЛОГІЇ ТА ІМУНОПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЯВІВ ЦИРКОВІРУС-АСОЦІЙОВАНОГО РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ

В. В. Еверт, к.вет.н.

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет

Автором встановлено особливості патогенезу цирковірус-асоційованого респіраторного синдрому і визначено, що саме ураження імунокомпетентних клітин, обумовлене PCV-2, призводить до розвитку імунодефіцитного стану, і, як наслідок, ко-інфікування бактеріально-вірусними респіраторними патогенами і різноманіттю проявів патоморфологічних змін. Розглянуто патоморфологічні зміни в організмі поросят за цирковірус-асоційованого респіраторного синдрому, та доведено ураження багатьох систем і органів, особливо респіраторної та лімфоїдної. Висвітлені зміни з боку респіраторної системи, які у переважній більшості характеризувались інтерстиціальними та некротичними пневмоніями, з периваскулярною інфільтрацією незрілими клітинами лімфоїдного типу, та з боку органів лімфоїдної системи - гіперплазіями різного ступеня порушення структури органів, прогресуючою лімфаденопатією з послідуною дегенерацією. На підставі проведених досліджень автором доведено, що PRDC перебігає в асоційованій формі за різних комбінаціях бактеріальних і вірусних агентів. Рівень виявлення асоціації патогенів становив від 7,14 % до 28,57 %, найвищий за РРСС, а найнижчий за актинобацилярної плевропневмонії, бордетельозу, мікоплазмозу та стафілококозу.

Ключові слова: цирковірус-асоційований респіраторний синдром, PRDC, комплекс респіраторних захворювань свиней, PCV-2, імунопатологія, імунодефіцит, бактеріальні та вірусні асоціати, патоморфологічні зміни.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Дослідження останніх років щодо ролі PCV-2 в інфекційній патології свиней, свідчить про його участь у розвитку та окремих проявів комплексу респіраторних захворювань свиней (PRDC) [22, 24]. Згідно даних закордонних дослідників PRDC – патологічний стан організму, головним чином 8-26 тижневих свиней, що викликаний дією багаточисельних респіраторних патогенів вірусної та бактеріальної природи [17, 21, 23, 25, 28].

Цирковірус-асоційований респіраторний синдром свиней характеризується комплексом ознак: зниженням темпів росту та ефективності використання кормів, анорексією, лихоманкою, кашлем та задихом [10, 13, 16]. Наявність довготривалого та надзвичайно тяжкого клінічного респіраторного захворювання, що проявляється гранулематозною інтерстиціальною бронхопневмонією з бронхіолітом та бронхіолярним фіброзом, свідчать про ураження PCV-2, а пов'язана з PCV-2 пневмонія, є одним із проявів комплексу респіраторних захворювань свиней (PRDC) [15, 19, 29]. На підставі експериментальних досліджень також встановлено, що при PRDC крім патології респіраторного тракту, виникає ураження лімфоїдних тканин [1-8, 14, 20, 27].

Інтенсивне розмноження PCV-2 у клітинах імунної системи приводить до їх гибелі і розвитку імунодефіцитного стану. У таких тварин створюються умови для зараження кількома інфекційними агентами, у тому числі парвовірусом, коронавірусом, герпесвірусами, збудниками респіраторно-репродуктивного синдрому, грипу, мікоплазмозу, актинобацильозу, пастерельозу, гемофільозу, бордетельозу, стафілококозу, стрептококозу, аспергильозу. Ко-інфікування організму свиней за цирковірус-асоційованого респіраторного синдрому утруднює діагностику, через схожість (імітацію) клінічних ознак [18, 26, 30-31].

Безперечним є і той факт, що тяжкість захворювання і різноманіття проявів цирковірус-асоційованого респіраторного синдрому залежить від адаптаційних можливостей ор-

ганізму тварин. Перехід від норми до патології, від здоров'я до хвороби проходить поступово, по мірі зниження адаптаційних можливостей організму, по мірі переходу від напруження регуляторних систем до їх перенапруження та виснаження. Зниження адаптаційних можливостей організму супроводжується ростом специфічних патологічних змін, що проявляються у вигляді різноманітних клінічних ознак [1-9, 11, 12].

Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. На даний час залишаються нез'ясованими питання патоморфології та імунопатологічних проявів захворювань асоційованих з цирковірусами за змішаних інфекцій. Патоморфологічні зміни за поліетіологічного інфекційного процесу, з участю PCV-2, надзвичайно різноманітні і потребують детального вивчення для встановлення діагностичного значення.

Мета дослідження: визначити особливості патогенезу, патоморфології та імунопатологічних проявів цирковірус-асоційованого респіраторного синдрому свиней.

Матеріали і методи досліджень. Робота виконувалась у свинарських господарствах України, з інтенсивною технологією вирощування свиней і науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського ДАЕУ. Вивчали особливості патогенезу, патоморфологічні зміни в організмі свиней, загиблих від цирковірус-асоційованого респіраторного синдрому.

Роль збудника цирковірусної інфекції та асоціантів у розвитку респіраторного синдрому підтверджена результатами ІФА та кількісного ПЛР-аналізу. Для визначення бактеріальних асоціантів додатково проводили бактеріологічне дослідження патологічного матеріалу.

Для дослідження відбирали тварин з позитивними показниками оптичної щільності специфічних антитіл (Ig G і Ig M) до цирковірусу свиней II типу в сироватці крові, а також поросята з клінічними ознаками активної PCV-2 інфекції, у 1 мл цільної крові яких, містилося понад 10^7 копій геном еквівалентів PCV-2 вірусу (Т. Oriessnigetel, 2007). Стадію