

Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини

тіла між двома кінцівками у гравітаційному полі Землі. Визначено, що кістки, які формують тазостегновий суглоб у досліджених видів птахів відрізняються за формою та розмірами.

Ключові слова: птахи, біоморфологія, тазостегновий суглоб, кістки.

БИОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОСТЕЙ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА ЖУРАВЛЕОБРАЗНЫХ – ORDO GRUIFORMES

Друзь Н. В., к.вет.н., асистент, druz_nv@nubip.edu.ua

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Аннотация. На основе сравнительно-анатомического анализа, изложены биоморфологические особенности костей тазобедренного сустава у некоторых видов птиц отряда Журавлеобразные. Установлено, что биоморфологические особенности костей тазобедренного сустава птиц обусловлены специфическим бипедализмом, который заключается в расположении оси тела относительно тазовых конечностей и обеспечивает удержание тела между двумя конечностями в гравитационном поле Земли. Определено, что кости, которые формируют тазобедренный сустав в исследованных видах птиц отличаются по форме и размерам.

Ключевые слова: птицы, биоморфология, тазобедренный сустав, кости.

УДК 619:616-076:619:616

МЕТОДИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ

Гаврилiна О.Г., к.вет.н., доцент, elgen@i.ua

Евeрт В.В., к. вет. наук, evert77@mail.ru

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ, Україна

Анотація. Встановлені оптимальні параметри двохетапного непрямого імуногістохімічного методу діагностики при цирковірусній хворобі свиней. Досліджували фрагменти соматичних та вісцеральних лімфатичних вузлів, враховуючи тропізм збудника хвороби. Блокування активності ендогенної пероксидази проводили розчином пероксиду водню у метанолі. Оптимальними параметрами демаскування антигенів була двократна мікрохвильова обробка зрізів по 3 хвилини при потужності печі 600-800 Вт. Безпосередній аналіз проводили за допомогою поліклональних первинних антитілспецифічних до антигенів цирковірусної хвороби свиней та вторинних антитіл проти IgG кроля, які мічені пероксидазою хрому. Для візуалізації імунного забарвлення використовували розчин 3,3-діамінобензидина тетрагідрохлориду, в результаті чого виявлялись ділянки з контрастним коричневим забарвленням. Вперше визначено взаємозв'язок між характером та ступенем виразності патоморфологічних змін у лімфатичних вузлах, залежно від стадії розвитку хвороби та рівнем експресії імуногістохімічних маркерів. У результаті комплексного дослідження розроблені критерії оцінки експресії імуногістохімічних маркерів за цирковірусної інфекції свиней.

Ключові слова: імуногістохімічний метод, антитіло, імунне забарвлення, демаскування антигенів, блокування ендогенної пероксидази, цирковірусна хвороба свиней.

Актуальність проблеми. Розробка ефективної стратегії профілактики та боротьби з інфекційними хворобами залежить від своєчасного якісного проведення комплексу лабораторних досліджень. Сучасна діагностика інфекційних хвороб, зберігаючи свої традиційні риси, характеризується постійним удосконаленням відомих прийомів і методів їх розпізнання та пошуком нових, ефективніших, у тому числі експресних [1,3,7,12,13].

Необхідність подальшої розробки методів діагностики інфекційних хвороб зумовлена рядом причин. Насамперед, з часом помітно змінюється патогенез і клінічна картина інфекційних хвороб. Відзначається тенденція до збільшення кількості патоморфозів, а також атипових форм інфекційних хвороб із затяжним перебігом. Збільшується кількість змішаних захворювань, спричинених одночасно

декількома видами бактерій, вірусів, найпростіших чи грибів. Виявлено нові, раніше невідомі інфекційні хвороби.

Завдяки досягненням імунології значно розширились можливості діагностики інфекційних хвороб за допомогою методів, заснованих на специфічній взаємодії антигену з антитілом [8,9,15]. Окрім традиційних серологічних реакцій, які застосовують для встановлення класифікаційної належності мікроба і виявлення антитіл до його антигенів у сироватці крові, широко впроваджуються методи виявлення антигенів збудника в різних біологічних субстратах (кров, сеча, слина). Виявлення в організмі хворих специфічних антигенів рівноцінне виділенню самого збудника. Сучасні методи індикації антигенів збудника дають можливість встановити етіологію захворювання протягом кількох годин чи навіть хвилин.

Із спектру сучасних високочутливих методів визначення та ідентифікації антигена збудника інфекції в Україні найбільш розповсюдженим є імуноферментний аналіз, проте окрім переваг він має ряд певних недоліків. Цей метод дає інформацію про загальну концентрацію антигенів або антитіл в біологічному субстраті і не дозволяє провести їх диференційний кількісний аналіз, що має вирішальне значення для визначення штамів збудника або їх варіантів. Перспективність розвитку імуногістохімічних досліджень полягає в тому, що вони поєднують у собі можливості сучасної гістології та імуногістохімічного аналізу на клітинному та тканинному рівнях і дають можливість проводити діагностику у фіксованому матеріалі навіть після тривалого його зберігання [2,4,5]. За своїм принципом методи імуногістохімії ґрунтуються на імуноферментному виявленні антигенів за допомогою специфічних або антивидових сироваток, мічених флюорохромами або ферментами, у зрізах тканин, мазках, моношарі клітин та ін. [15]. Реакція добре візуалізується в звичайному оптичному мікроскопі і не потребує дорогого устаткування. Забарвлені зрізи можна зберігати протягом тривалого періоду часу, а архівні парафінові блоки використовувати у подальших ретроспективних дослідженнях. Імуногістохімічні методи дослідження на теперешній час є невід'ємною частиною наукових досліджень. Застосування імуногістохімії значно розширює можливості морфології як у вивченні етіології, патогенезу патологічних процесів, так і в рутинній діагностичній практиці [4,6,10,11,14].

Мета і завдання дослідження: встановлення оптимальних параметрів імуногістохімічного методу з метою виявлення антигенів збудника в органах і тканинах свиней на прикладі цирковірусної інфекції II типу.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проведені в лабораторії гістології, імуноцитохімії і патоморфології НДЦ біобезпеки і екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. Досліджували соматичні та вісцеральні лімфатичні вузли (поверхневі пахові, підщелепні, тонкої кишки, трахеобронхіальні) від здорових та хворих на цирковірусну інфекцію свиней.

Органи від хворих тварин відбирали при діагностичному забої з подальшим патологоанатомічним розтином від поросят 6-12 тижневого віку з клінічними ознаками синдрому мультисистемного виснаження (n=7). Для імуногістохімічних досліджень відбирали фрагменти лімфатичних вузлів (серединні сегменти) безпосередньо після забою тварин із дотриманням вимог МЕБ та існуючих правил біоетики [7]. Для контролю відбирали проби з тих самих органів від 7 SPF від специфічних патогенів поросят. В якості позитивного контролю використовували зрізи виготовлені із зразків від клінічно хворих свиней, для яких наявність збудника цирковірусної інфекції доведена патоморфологічним, серологічним та імуноферментним методами.

Матеріал фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні. Нейтральний рН створювали за допомогою фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБР). Фіксацію проб проводили при кімнатній температурі (15–20°C) впродовж 24-48 год, що забезпечувало мінімальне маскування антигенів.

Критерієм завершення фіксації проби є рівномірне її ущільнення та рівномірне забарвлення на розрізі з відсутністю червоних або рожевих ділянок. Після закінчення фіксації формалін з проб видаляли шляхом промивання їх в проточній воді протягом 24-48 год, в залежності від розмірів проби. Зневоднення (дегідратацію) та ущільнення зразків проводили за загальноприйнятою в гістології методикою.

Зрізи з парафінових блоків товщиною 4-6 мкм виготовляли за допомогою полозкового мікротому. Виготовлені зрізи з ванночки з теплою дистильованою водою виймали вертикально щоб в зрізах не залишалось бульбашок повітря, які погіршують якість препаратів та переносили на предметні скельця з адгезивною поверхнею (Super Frost/Plus Slides (Menzel-Glaser)). Висушували

Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини

зрізи у вертикальному положенні у термостаті при температурі 37°C протягом 2-6 год або при кімнатній температурі протягом доби. Виготовлені зрізи використовували відразу для імуногістохімічної реакції. Висушені зрізи депарафінували у ксилолі протягом 5 хв, а потім обробляли спиртами у концентрації, що знижується: 96%, 80%, 70%, 50% (по 3 хв в кожному). У підготовлених зрізах блокували активність ендогенної пероксидази розчином пероксиду водню у метанолі 10 хв при температурі 20 – 24°C. Для створення вологої атмосфери у пластиковій камері на її дно клали вологий фільтрувальний папір. Всі наступні інкубації зрізів проводили у вологій камері. Після блокування зрізи одноразово промивали ФСБР.

Для успішної взаємодії антигену та антитіла епітопи (антигенні детермінанти, що приймають участь у імунній реакції) повинні бути легкодоступними, тобто знаходитися на поверхні молекули. При денатурації молекул (наприклад, під дією фіксуєної рідини) епітопи можуть знижувати свою імуногенність. Також на просторову структуру молекул, тобто і на імуногенність її епітопів, впливає рН навколишнього середовища, показники якого повинні строго контролюватися. Фіксація тканин нейтральним формаліном, хоча і в меншій мірі, ніж інші фіксуєні рідини, але все ж змінює тривимірну структуру білка в досліджуваному матеріалі, що призводить до маскування антигенів. За певних умов тривимірну структуру білка можна відновити. Тому в процедуру обробки матеріалу при проведенні імуногістохімічних досліджень вводили етап демаскування. Демаскування антигенів проводили шляхом нагрівання в мікрохвильовій печі. Випробувавши кілька режимів впливу мікрохвиль на досліджувані тканини ми встановили оптимальні параметри використання мікрохвильової печі. Теплову обробку проводили у звичайній побутовій СВЧ-печі трикратно по 5 хвилин при потужності 600-800 Вт. В якості розчину використовували ФСБР з фіксованим рН. При розміщенні скелець в мікрохвильовій печі ємності заповнювали розчином так, щоб він покривав зрізи. Відстань між скельцями має бути не менше 2-4 мм для вільного руху бульбашок повітря в рідині.

Наступний етап – інкубування зрізів із специфічними до антигенів вірусу хвороб антитілами, для чого наносили на кожний зріз від 0,05 см³ до 0,1 см³ робочого розчину антитіл. Для приготування робочого розчину специфічних до антигенів вірусу ІБХ та хвороби Марека антитіл у 10 см³ ФСБР розчиняли 0,07 см³ вихідного розчину кролячих специфічних до антигенів вірусів антитіл (Ig G). Скельця із зрізами розміщували у вологій камері і витримували 60 хв при температурі 37±0,50 С. Після інкубації із специфічними до антигенів вірусів ІБХ та хвороби Марека антитілами скельця із зрізами відмивали ФСБР три рази по 5 хв. Залишок розчину навколо зрізів ретельно видаляли за допомогою фільтрувального паперу. На відмиті зрізи наносили від 0,05 см³ до 0,1 см³ робочого розчину вто ринних антитіл. Для приготування робочого розчину у 10 см³ ФСБР розчиняли 0,07 см³ вихідного розчину антитіл проти IgG кроля, які мічені пероксидазою хрому.

Інкубували зрізи протягом 60 хв при температурі 37±0,5°C. Після інкубації із вторинними антитілами скельця із зрізами відмивали ФСБР 3 рази по 3 хв. Залишок розчину видаляли за допомогою фільтрувального паперу. Важливим етапом будь-якого імуногістохімічного методу є візуалізація результатів реакції „антиген-антитіло”. Виявити антитіла, що зв'язалися з антигенами, можна використовуючи різні мітки, пов'язані з Fc-фрагментом антитіл. Такими мітками є флюорохроми, ферменти, метали та металопротеїни,

радіоізотопи, проміжні сполучні речовини (біотин, дігосин та ін.). Вони можуть бути кон'юговані як з первинними антитілами, так і з вторинними. Якщо мітка кон'юговані з первинними антитілами – це прямий метод візуалізації. Чутливість цього методу вкрай низька, тому що на одну молекулу антигену припадає одна мітка. При використанні непрямого методу чутливість набагато підвищена, коли первинні антитіла не несуть на собі ніякого мітки, на відміну від вторинних, для яких первинні антитіла є антигеном.

У своїй роботі ми використовували двохетапний непрямий метод. Забарвлення ділянок на зрізах, з якими специфічно реагують антитіла, проводили при температурі 20 – 24°C. На кожний зріз наносили від 0,05 см³ до 0,1 см³ розчину 3,3-діамінобензидину тетрагідрохлориду (ДАБ) і пероксиду водню у трис-буфері (рН 7,2). Реакцію фарбування проводили 4-6 хв. Після чого скельця із зрізами відмивали дистильованою водою 2 хв. В подальшому зрізи дофарбовували гематоксиліном Ерліха, зневоднювали спиртами у концентрації, що зростає та ксилолом і заводили в канадський бальзам або полістерол. Для правильної інтерпретації імуногістохімічного дослідження одночасно з досліджуваними препаратами обробляли контрольні зрізи: позитивний і негативний контроль антигену, негативний контроль антитіл. Аналіз зрізів проводили методом світлової мікроскопії, фотографували за допомогою цифрової камери і зберігали зображення у форматі малюнків на

електронних носіях. За основу критеріїв оцінки експресії імуногістохімічних маркерів при цирковірусній інфекції свиней брали напівкількісний метод Манна-Уїтні у авторській модифікації (табл.).

Результати дослідження. Характерні клінічні прояви синдрому мультисистемного виснаження у поросят в значному ступеню визначаються тропізмом цирковирусу II типу, який безпосередньо інфікує імунокопетентні клітини – макрофаги та лімфоцити, викликаючи імунопатологічний ефект. Дослідження патоморфологічних змін у органах імунної системи свиней при синдромі мультисистемного виснаження в період максимального прояву клінічних ознак має суттєве діагностичне значення. У хворих тварин відмічали наявність специфічних клінічних ознак: втрату ваги, виснаження, задишку, субфебрильну лихоманку, дерматити, кишкові розлади. При комплексному патоморфологічному дослідженні виявляли чисельні ураження різних органів.

Таблиця

Рівень експресії імуногістохімічних маркерів при цирковірусній хворобі

Результат	Рівень експресії (бали)	Тлумачення результату
-	0	менше 1% позитивно забарвлених клітин
+	I	до 10% позитивно забарвлених клітин
++	II	10-20% позитивно забарвлених клітин
+++	III	20-40% позитивно забарвлених клітин
++++	IV	більше 40% позитивно забарвлених клітин

Найбільш значні зміни встановлювали в органах імунної системи, що пов'язано з високою лімфотропністю вірусу і розвитком прогресуючої лімфаденопатії. Інтенсивний розвиток вірусу у клітинах імунної системи призводив до їх загибелі та розвитку імунодефіцитного стану, що й являлось передумовою виникнення вторинних інфекцій викликаних умовно-патогенною мікрофлорою.

Відмічали збільшення лімфатичних вузлів, особливо поверхневих пахвинних, прямокишкових та черевних. Їх капсула напружена, на розрізі органи мали цегляне забарвлення, яке у центрі набувало салоподібного, блідо-рожевого кольору. Відмічали гіперплазію кіркової речовини, посилення процесів загибелі лімфоїдних клітин у всіх структурно-функціональних зонах та заміщення лімфатичної тканини на сполучну.

У стадію ранньої активної інфекції в лімфатичних вузлах визначали ознаки запальної реакції за типом ексудативного запалення – гострий серозний лімфаденіт. При дослідженні імуногістохімічних змін у лімфатичних вузлах було встановлено, що антиген у вигляді дрібних глибок накопичувався переважно у кірковому плато органу.

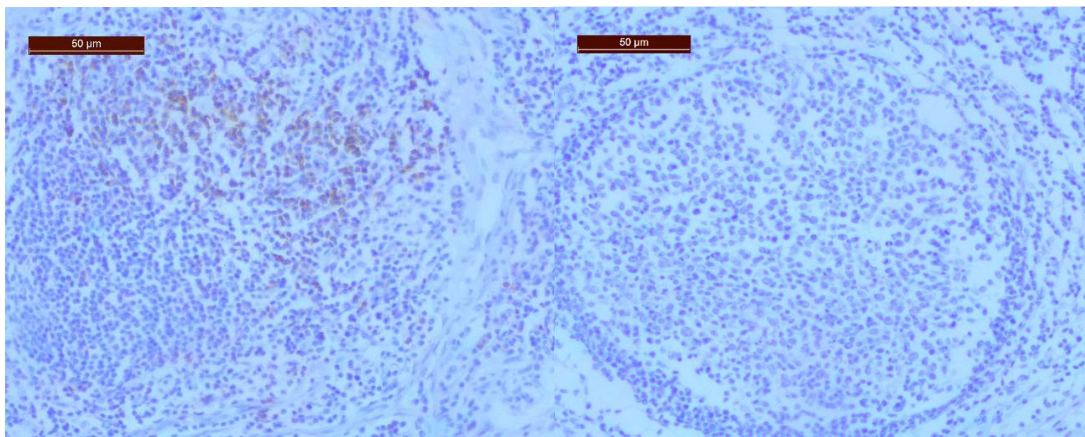


Рис. 1. Гістопрепарат поверхневого пахвинного лімфатичного вузла з позитивним імунозабарвленням при цирковірусній хворобі свиней II типу. (specific Monoclonal Antibody PCV VP2 type 2, Ingenasa (Іспанія)). Рівень експресії II. x200. Leica DM1000

Рис. 2. Гістопрепарат поверхневого пахвинного лімфатичного вузла з негативним імунозабарвленням. (specific Monoclonal Antibody PCV VP2 type 2, Ingenasa (Іспанія)). x200. Leica DM1000

При наявності позитивної реакції на зрізах реєстрували ділянки з контрастним коричневим імунозабарвленням, інтенсивність якого прямо пропорційна кількості антигенів вірусу і складала 10-20% позитивно забарвлених клітин на площу зрізу. Рівень експресії сягав II бали (рис.1). При негативній імунній відповіді виявляли рівномірне синє забарвлення (рис.2).

У стадію активної інфекції соматичні та вісцеральні лімфатичні вузли збільшені у об'ємі, повнокровні. Запальний процес проявляється активною гіперемією кровоносних судин мікроциркуляторного русла, серозним набряком строми, розширенням синусів. Імуноморфологічні зміни проявляються різким збільшенням кількості плазмобластів і плазматичних клітин, лімфоцитів, макрофагів у кірковій речовині і мозкових тяжах.

Стадія активної інфекції при синдромі мультисистемного виснаження у свиней характеризується утворенням специфічних гранульом, які являють собою вогнищеву проліферацію здатних до фагоцитозу клітин моноцитарно-макрофагальної природи з формуванням епітеліоїдних клітин, а в подальшому – гігантських багатоядерних клітин Пирогова-Ланганса.

У досліджених лімфатичних вузлах відмічали розвиток гранулематозного лімфаденіта з наявністю специфічних тілець-включень у моноцитах і макрофагах та формуванням гігантських багатоядерних клітин. Основна мішень вірусу PCV2, це - макрофаги і дендритні клітини, що є важливою передумовою розвитку гранулематозного запалення, морфогенез якого проходить декілька стадій. Спочатку у вогнищі пошкодження накопичуються юні моноцитарні фагоцити, в подальшому вони диференціюються у макрофаги з утворенням макрофагальної гранулеми. На наступному етапі відбувається трансформація моноцитарних фагоцитів та макрофагів у епітеліоїдні клітини, їх злиття та утворення гігантських клітин та гранулем.

При дослідженні імуногістохімічних змін у лімфатичних вузлах реєстрували ділянки з контрастним коричневим імунозабарвленням, інтенсивність якого сягала 20-40%, отже рівень експресії за шкалою складав III бали.

У стадію пізньої інфекції (розрешення та реконвалесценції) визначали ознаки продуктивного лімфаденіту, з морфологічними ознаками виснаження лімфоїдної тканини. Стадія розрешення та реконвалесценції цирковірусної інфекції у лімфатичних вузлах характеризується деградацією В-клітинних зон. У більшості зразків визначається майже відсутність лімфатичних вузликів із центрами розмноження.

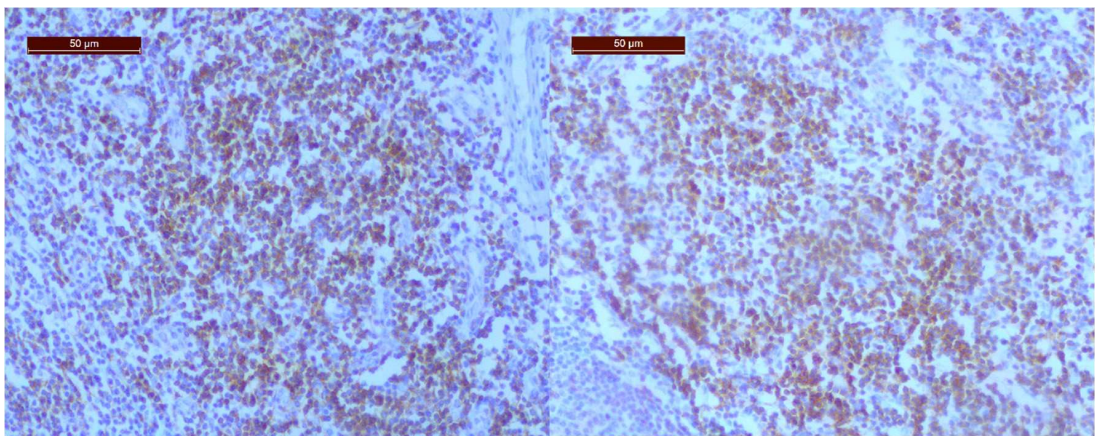


Рис. 3. Гістопрепарат поверхнього пахвинного лімфатичного вузла з позитивним імунозабарвленням при цирковірусній хворобі свиней II типу. (specific Monoclonal Antibody PCV VP2 type 2, Ingenasa (Іспанія)). Рівень експресії III. x200. Leica DM1000

Рис. 4. Гістопрепарат поверхнього пахвинного лімфатичного вузла з позитивним імунозабарвленням при цирковірусній хворобі свиней II типу. (specific Monoclonal Antibody PCV VP2 type 2, Ingenasa (Іспанія)). Рівень експресії IV. x200. Leica DM1000

Отже, отримані результати свідчать про те, що імуногістохімічний метод виявлення антигену цирковірусної хвороби свиней може надати вичерпну інформацію про імуногенні особливості вірусу, тропність і кількісний вміст в органах і тканинах.

Висновки

1. Імуногістохімічна діагностика цирковірусної хвороби свиней базується на двухетапному непрямому методі, який складається із послідовних етапів: відбору та фіксації матеріалу, отримання парафінових зрізів, зневоднення, блокування ендогенної пероксидази, демаскування антигенів, інкубації з первинними та вторинними сироватками, імунного забарвлення, дофарбовування і заведення гістологічних зрізів. Враховуючи специфічність досліджуваних органів, блокування активності ендогенної пероксидази проводили розчином пероксиду водню у метанолі. Оптимальними параметрами демаскування антигенів у мікрохвильовій печі була двократна обробка зрізів по 3 хвилини при потужності печі 600-800 Вт. Безпосередній аналіз проводили за допомогою поліклональних специфічних до антигенів вірусу цирковірусної хвороби свиней первинних антитіл та вторинних антитіл проти IgG кроля, які мічені пероксидазою хрому. Для візуалізації імунного забарвлення використовували розчин 3,3-діамінобензидина тетрагідрохлориду, в результаті чого виявлялись ділянки з контрастним коричневим забарвленням.

2. Враховуючи лімфотропність вірусу PCV2 найбільш виражене імунне забарвлення було виявлено у гістологічних зрізах лімфатичних вузлів у стадію активної та пізньої інфекції.

3. На кожному етапі розвитку патологічного процесу при цирковірусній інфекції захоплюються всі основні структури і ланки системи органів кровотворення та імунного захисту, а патологічні зміни варіюють від гострого серозного запалення у стадію ранньої активної інфекції, до формування гранульом і зрілої рубцевої тканини на стадії розрешення і реконвалесценції.

4. Імуногістохімічні дослідження є обов'язковим методом сучасної лабораторної діагностики цирковірусної хвороби свиней II типу, які доводять не лише наявність збудника у тканинах, але й дозволяють встановити тип та рівень експресії, що сприяє розумінню основних аспектів патогенезу дії збудника.

Література

1. Малоголовкин А.С. Проблема цирковирусных инфекций в патологии животных и человека / А.С. Малоголовкин // Ветеринария и кормление. – 2008. – № 2. – С. 30-31.
2. Гаврилін П.М. Методичні особливості застосування імуногістохімічного аналізу для діагностики вірусних хвороб птиці / П. Гаврилін, В. Недзвецкий, Д. Масюк, О. Прокушенкова // Наукові праці Полтавської державної аграрної академії. Серія: „Ветеринарна медицина”, Вип.2. – Полтава, 2011. – С.8-18.
3. Гаврилін П.М. Морфологічні критерії ідентифікації патогістологічних змін в органах і тканинах при цирковірус-асоційованих синдромах свиней / П. Гаврилін, О. Прокушенкова, В. Недзвецкий, Д. Масюк // Науковий вісник Луганського національного аграрного університету: Серія Ветеринарні науки. – Луганськ: «Елтон 2» - 2013. - № 49.- С.20-26.
4. Гаврилін П.М. Особливості імуногістохімічної діагностики цирковірусної інфекції свиней // П. Гаврилін, О.Прокушенкова, Д. Масюк // Десятий міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини: матеріали конгресу. –Київ. - 4-5 жовтня 2012 рік. – С. 88-90.
5. Гаврилін П.М. Патоморфологічні зміни в органах та тканинах при цирковірусній інфекції свиней / П. Гаврилін, О. Прокушенкова, Д. Масюк // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: матеріали II міжнародної наукової конференції. – Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013. – С.92.
6. Гаврилін П.М. Патоморфологічні характеристики органів і тканин свиней при цирковірус-асоційованих синдромах / П. Гаврилін, О. Прокушенкова, В. Недзвецкий, Д. Масюк // Науковий вісник НУБіП України. Вип.172. –Ч.3., Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». –Київ, 2012.- С. 53-62.
7. Гаврилин П.Н. Особенности патоморфологии органов иммунной системы свиней при синдроме мультисистемного истощения в зависимости от стадии развития инфекционного процесса / П. Гаврилин, В. Эверт, Е. Прокушенкова // Інноваційні технології та інтенсифікація розвитку національного виробництва: матеріали II Міжнародної науково-практичної Інтернет конференції. 20-21 жовтня 2015 р. – Тернопіль: Крок, 2015. – 383 с.
8. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, – 2000. – 592 с.
9. Allan J.M. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain. Denmark and Northern Ireland /J.M. Allan, F. McNeilly, B.M. Meehan // Vet Microbiol. – 1999. – Vol. 66. – P.115-123.

10. Ellis J. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field / J. Ellis, E. Clark, D. Haines, K. West, S. Krakowka, S. Kennedy, G.N. Allan // *Vet. Microbiol.* – 2004. – Vol.98 (2). – P.159-163.
11. Opriessnig T. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. / T. Opriessnig, S. Yu, E.L. Thacker // *J Swine Health Prod.* – 2004. – Vol. 12. – P.186-191.
12. Opriessnig T. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies / T. Opriessnig, Xiang-Jin Meng, P.G. Halbur // *J Vet Diagn Invest.* – 2007. – Vol 1. – P. 591- 615.
13. Rosell C. Hepatitis and Staging of Hepatic Damage in Pigs Naturally Infected with Porcine Circovirus Type 2 / C. Rosell, J.Segales, M.Domingo // *Vet. Pathol.* – 2000. – Vol 37 (6). – P. 687- 692.
14. Segales J. Porcine circovirus diseases /J. Segales, G.M. Allan, M. Domingo// *Anim Health Res Rev.* – 2005. – Vol. 6. – P.119-142.
15. Sorden S. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffinembedded tissue / S. Sorden, P. Harms, P. Nawagitgul [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.*– 1999.–№ 11.–P. 528–530.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ**

Гаврилина Е.Г., к.вет.н., доцент, elgen@i.ua

Еверт В.В., к. вет. наук, evert77@mail.ru

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепропетровськ,
Украина

Аннотация. Установлены оптимальные параметры двухэтапного непрямого иммуногистохимического метода диагностики при цирковиральной инфекции свиней. Исследовали фрагменты соматических и висцеральных лимфатических узлов, учитывая тропизм возбудителя болезни. Блокировку активности эндогенной пероксидазы проводили раствором перекиси водорода в метаноле. Оптимальными параметрами демаскировки антигенов была двукратная микроволновая обработка срезов по 3 минуты при мощности печи 600-800 Вт. Непосредственный анализ проводили с помощью поликлональных первичных антител специфичных к антигенам цирковиральной инфекции свиней и вторичных антител против IgG кролика, которые мечены пероксидазой хрена. Для визуализации иммунной окраски использовали раствор 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорида, в результате чего оказывались участки с контрастной коричневой окраской. Впервые определена взаимосвязь между характером и степенью выраженности патоморфологических изменений в лимфатических узлах, в зависимости от стадии развития болезни и уровнем экспрессии иммуногистохимических маркеров. В результате комплексного исследования разработаны критерии оценки экспрессии иммуногистохимических маркеров при цирковиральной инфекции свиней.

**METHODICAL FEATURES OF DIAGNOSIS IMMUNOCHISTOCHEMICAL CIRCOVIRUS INFECTION
PIGS**

Havrylina O.G., Ph.D., Associate Professor, elgen@i.ua

Evert V.V. Ph.D., evert77@mail.ru

Dnepropetrovsk State Agrarian and Economic University,
Dnepropetrovsk, Ukraine

Summary. The optimal parameters of a two-step indirect immunohistochemical diagnostic method for porcine circovirus infection were established. We studied the fragments of somatic and visceral lymph nodes, given the tropism of the pathogen. Blocking endogenous peroxidase activity was carried out with a solution of hydrogen peroxide in methanol. The optimal parameters of unmasking antigens was twice microwave processing slices for 3 minutes at a power of 600-800 W oven. Direct analysis was performed using polyclonal primary antibodies, which were specific for circovirus infection antigen of pigs and secondary antibodies anti-rabbit IgG, which are labeled with horseradish peroxidase. To visualization the immunostaining we used a solution of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, whereby portions with contrast appeared brown in color. For the first time defined the relationship between the nature and the severity of pathological changes in the lymph nodes, depending on the stage of the disease and the level of expression of immunohistochemical markers. As a result, a comprehensive study developed criteria for evaluating the expression of immunohistochemical markers in swine circovirus infection.

In the early stage of active infection in the lymph nodes define the signs of inflammatory reactions by type of exudative inflammation - acute serous lymphadenitis were defined. With immunohistochemical study

of changes in the lymph nodes, it was found that the antigen in the form of fine deep accumulated mainly in the cortical plateau body.

The stage of active infection with the syndrome with multisystemic wasting of pigs characterized by the formation of specific granulomas with focal proliferation of cells capable of phagocytosis of monocyte-macrophage nature with the formation of epithelioid cells, and in the future - the giant multinucleated cells.

In the late stage of infection (resolution and convalescence) the signs of productive lymphadenitis, with morphological signs of depletion of lymphoid tissue were determined. Resolution and convalescence stage of infection circovirus characterized in lymph nodes degradation B cell zones. In most of the samples is determined by the almost absence of lymph nodules with breeding centers.

Thus, the results indicate that the immunohistochemical method for detecting antigen circovirus swine diseases may provide detailed information about the features of immunogenic viral tropism and quantitative content in organs and tissues.

Immunohistochemical studies is required by modern laboratory diagnostics circovirus swine disease type II, which prove not only the existence of the pathogen in the tissues, but also allow you to set the type and level of expression, promotes understanding of key aspects of the pathogenesis of the action of the pathogen.

УДК 616-073.7:591.471.35:598.25

РЕНТГЕНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КІСТОК ТАЗОСТЕГНОВОГО СУГЛОБА ДЕЯКИХ ПТАХІВ РЯДУ ГУСЕПОДІБНИХ – *ORDO ANSERIFORMES*

Друзь Н.В., к. вет.н., асистент, (druz_nv3011@ukr.net)

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Анотація. В статті порівняно і досліджено будову і розвиток кісток ділянки тазостегнового суглоба у деяких представників ряду гусеподібних, на цій основі, встановили дійсні закономірності формування його скелетних елементів в процесі еволюційних перетворень. Викладено морфологічні особливості рентгенологічних досліджень скелетних елементів тазостегнового суглоба представників ряду гусеподібних та встановлено, що ступінь розвитку кісток тазового поясу мають певні міжвидові відмінності, що спричинили біоморфологічні особливості стато-локомоції.

Ключові слова. канадська казарка, свійська гуска, каролінська качка, крижень, попелюха, чубата чернь, мала та велика чирянки

Актуальність проблеми. Заслужують на увагу фундаментальні морфо-функціональні роботи Боева З. Н. та Линдемана К. Е., в яких розглядаються особливості будови птахів [1; 2]. Ці роботи заклали основу для морфо-функціонального вивчення, зокрема тазових кінцівок птахів. Найбільша кількість робіт з вивчення скелета сучасних птахів проведена переважно на свійській птиці, особливістю наших досліджень є посилення інтересу до порівняльно-морфологічного вивчення скелета на значному порівняльно-анатомічному матеріалі [3; 4; 5].

Завдання дослідження. Порівняти і дослідити будову і розвиток кісток ділянки тазостегнового суглоба у деяких представників ряду гусеподібних, на цій основі, встановити дійсні закономірності формування його скелетних елементів в процесі еволюційних перетворень. Викласти морфологічні особливості рентгенологічних досліджень скелетних елементів тазостегнового суглоба представників ряду гусеподібних – канадська казарка, свійська гуска, каролінська качка, крижень, попелюха, чубата чернь, мала та велика чирянки. Встановити, ступінь розвитку кісток тазового поясу.

Матеріал та методи дослідження. Робота виконана на кафедрі анатомії тварин ім. акад. В. Г. Касьяненка Національного університету біоресурсів і природокористування України, деякі дослідження проводилися на базі Вроцлавського природничого університету. Дослідження