

ISSN 0321-0502

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
«ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ»**

ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

**МІЖВІДОМЧИЙ
ТЕМАТИЧНИЙ
НАУКОВИЙ
ЗБІРНИК**

109

**ХАРКІВ
2023**

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Головний редактор: **Стегній Б. Т.**, проф., акад. НААН (Україна)

Заступник головного редактора: **Завгородній А. І.**, д-р вет. наук, проф.,
член-кор. НААН (Україна)

Відповідальний секретар: **Вовк Д. В.** (Україна)

ЧЛЕНИ РЕДАКЦІЙНОЇ КОЛЕГІЇ

Богач М. В., д-р вет. наук, проф. (Україна), **Болотін В. І.**, канд. вет. наук, ст. наук. співроб. (Україна), **Бусол В. О.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Вільчек С.**, д-р вет. наук, проф. (Словаччина), **Влізло В. В.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Вовк С. І.**, канд. вет. наук (Україна), **Вольфель Р.**, д-р мед. наук, проф., полк-к ВМ (Німеччина), **Гамкрелідзе А.**, д-р мед. наук, проф. (Грузія), **Гладій М. В.**, д-р екон. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Головко А. М.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Горайчук І. В.**, канд. біол. наук (США), **Горбатенко С. К.**, канд. вет. наук, доц. (Україна), **Долецький С. П.**, д-р вет. наук, доц. (Україна), **Жегунов Г. Ф.**, д-р біол. наук, проф. (Україна), **Задорожна В. І.**, д-р мед. наук, проф., член-кор. НААН (Україна), **Ільмаз Х.**, д-р вет. наук, проф. (Туреччина), **Імнадзе П.**, д-р мед. наук, проф. (Грузія), **Калашнік М. В.**, канд. вет. наук (Україна), **Коваленко Л. В.**, канд. біол. наук, ст. наук. співроб. (Україна), **Корнейков О. М.**, канд. вет. наук (Україна), **Коцюмбас І. Я.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Кузьмак Я.**, д-р вет. наук, проф. (Польща), **Лиманська О. Ю.**, д-р біол. наук, ст. наук. співроб. (Україна), **Мазуркевич А. І.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Мандигра М. С.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Мінухін В. В.**, д-р мед. наук, проф. (Україна), **Музика Д. В.**, д-р вет. наук, ст. наук. співроб. (Україна), **Немчук К.**, д-р вет. наук, проф. (Польща), **Оробченко О. Л.**, д-р вет. наук, ст. наук. співроб. (Україна), **Палій А. П.**, д-р вет. наук, проф. (Україна), **Поляк М. П.**, д-р вет. наук, проф. (Польща), **Потконьяк А.**, д-р вет. наук, доц. (Сербія), **Ріхт Ю.**, д-р вет. наук, проф. (США), **Романько М. Є.**, д-р біол. наук, ст. наук. співроб. (Україна), **Сметанка К.**, д-р вет. наук, проф. (Польща), **Солодянкін О. С.**, канд. біол. наук (Україна), **Співак М. Я.**, д-р біол. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Стегній М. Ю.**, канд. біол. наук, доц. (Україна), **Стибель В. В.**, д-р вет. наук, проф. (Україна), **Ушкалов В. О.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Фещенко Ю. І.**, д-р мед. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Філатов С. В.**, канд. вет. наук (Україна), **Фотіна Т. І.**, д-р вет. наук, проф. (Україна), **Цвіліховський М. І.**, д-р вет. наук, проф., акад. НААН (Україна), **Чорний М. В.**, д-р вет. наук, проф. (Україна)

Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина» входить до категорії «Б» «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та доктора філософії» у галузях ветеринарних (спеціальності 211 — Ветеринарна медицина, 212 — Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза) і біологічних (спеціальність 91 — біологія) наук (наказ Міністерства освіти і науки України № 886 від 02.07.2020 р.).

Повні тексти статей розміщені на сайтах: видання (jvm.kharkov.ua), Національної бібліотеки України ім. В. І. Вернадського (nbuv.gov.ua/j-tit/vetmed) та індексуються у Google Scholar.

Затверджено до друку Вченою радою Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (протокол № 11 від 27.09.2023 р.).

Адреса редакційної колегії:

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023, Україна
тел. +38 (057) 707-20-53; тел./факс +38 (057) 704-10-90
E-mail: admin@vet.kharkov.ua, inform@vet.kharkov.ua

ISSN 0321-0502

NATIONAL ACADEMY OF AGRARIAN SCIENCES OF UKRAINE

**NATIONAL SCIENTIFIC CENTER
«INSTITUTE OF EXPERIMENTAL
AND CLINICAL VETERINARY MEDICINE»**

VETERINARY MEDICINE

**INTER-DEPARTMENTAL
SUBJECT
SCIENTIFIC
COLLECTION**

109

**KHARKIV
2023**

UDC 619:60/61:636/639:57(051.2)

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: **Stegniy B. T.**, Prof., Academician of NAAS (Ukraine)

Vice Editor-in-Chief: **Zavgorodniy A. I.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof.,
Cor.-member of NAAS (Ukraine)

Responsible Secretary: **Vovk D. V.** (Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

Bogach M. V., Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Ukraine), **Bolotin V. I.**, Cand. Sci. (Vet. Med.), Senior Researcher (Ukraine), **Busol V. O.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Chorny M. V.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Ukraine), **Doletskyi S. P.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Assoc. Prof. (Ukraine), **Feshchenko Yu. I.**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of NAMS (Ukraine), **Filatov S. V.**, Cand. Sci. (Vet. Med.) (Ukraine), **Fotina T. I.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Ukraine), **Gamkrelidze A.**, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Georgia), **Gladiv M. V.**, Dr. Sci. (Econ.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Golovko A. M.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Goraichuk I. V.**, Cand. Sci. (Biol.) (USA), **Gorbatenko S. K.**, Cand. Sci. (Vet. Med.), Assoc. Prof. (Ukraine), **Imnadze P.**, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Georgia), **Kalashnik M. V.**, Cand. Sci. (Vet. Med.) (Ukraine), **Korneikov O. M.**, Cand. Sci. (Vet. Med.) (Ukraine), **Kotsiumbas I. Ya.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Kovalenko L. V.**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher (Ukraine), **Kuźmak J.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Poland), **Lymanska O. Yu.**, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher (Ukraine), **Mandygra M. S.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Mazurkevych A. Yo.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Minukhin V. V.**, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Ukraine), **Muzyka D. V.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Senior Researcher (Ukraine), **Niemczuk K.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Poland), **Orobchenko O. L.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Senior Researcher (Ukraine), **Paliy A. P.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Ukraine), **Polak M. P.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Poland), **Potkonjak A.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Assoc. Prof. (Serbia), **Richt J.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (USA), **Romanko M. Ye.**, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher (Ukraine), **Śmietanka K.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Poland), **Solodiankin O. S.**, Cand. Sci. (Biol.) (Ukraine), **Spivak M. Ya.**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of NAS (Ukraine), **Stegniy M. Yu.**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof. (Ukraine), **Stybel V. V.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Ukraine), **Tsvilikhovsky M. I.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Ushkalov V. O.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Vilcek S.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Slovakia), **Vlizo V. V.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof., Academician of NAAS (Ukraine), **Vovk S. I.**, Cand. Sci. (Vet. Med.) (Ukraine), **Wölfel R.**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Colonel (MC) (Germany), **Yilmaz H.**, Dr. Sci. (Vet. Med.), Prof. (Turkey), **Zadorozhna V. I.**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Cor.-member of NAMS (Ukraine), **Zhegunov G. F.**, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Ukraine)

Inter-departmental subject scientific collection 'Veterinary Medicine' included in the category 'B' of the 'List of scientific professional editions of Ukraine, which can be published results of dissertations for degrees of Doctor of Sciences, Candidate of Sciences, and Doctor of Philosophy' in the fields of veterinary (specialities 211 — Veterinary Medicine, 212 — Veterinary Hygiene, Sanitation and Expertise) and biological (speciality 091 — Biology) sciences (Order of the Ministry of Education and Science of Ukraine No. 886 from 02.07.2020).

The full text of articles posted on websites of: the edition (jvm.kharkov.ua), the Vernadsky National Library of Ukraine (nbuv.gov.ua/j-tit/vetmed), and indexed in Google Scholar.

Publication authorized by the Scientific Council of the National Scientific Center 'Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine' (protocol No. 11 from 27.09.2023).

Editorial Board Address:

NSC 'Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine'
83, Pushkinska St., Kharkiv, 61023, Ukraine
tel. +38 (057) 707-20-53; tel./fax +38 (057) 704-10-90
E-mail: admin@vet.kharkov.ua, inform@vet.kharkov.ua

ISSN 0321-0502

© NSC 'Institute of Experimental
and Clinical Veterinary Medicine', 2023

1. ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ ТА БІОЗАХИСТУ. ЕМЕРДЖЕНТНІ ІНФЕКЦІЇ

УДК 619:616.98-036.22:578.832.1А:598.2(477)

DOI 10.36016/VM-2023-109-1

ЦИРКУЛЯЦІЯ НЕТИПОВИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ГРИПУ ПІДТИПУ Н13 СЕРЕД ДИКИХ ВОДОПЛАВНИХ ПТАХІВ

Ткаченко С. В., Стегній Б. Т., Рула О. М., Музика Д. В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: semen270181@gmail.com

Екологія, епідеміологія та еволюція вірусів грипу птиці А серед диких птахів до цього часу погано вивчені через надзвичайну складність, спричинену численними видами-господарями вірусу, які важко вивчати протягом річного циклу розвитку господарів і можливе їх інфікування декількома підтипами вірусу. Ключовою складовою є розуміння генетичних зв'язків окремих підтипів вірусів грипу птиці, що дає змогу відслідкувати походження нових ізолятів або зміну причин їхньої патогенності. Метою наших досліджень стало вивчення циркуляції вірусів грипу деяких підтипів у нетипових хазяїв, проведення досліджень їхньої генетичної структури та пошук споріднених вірусів для визначення можливого походження українських ізолятів. За результатами досліджень виділено ізолят вірусу грипу птиці з підтипом гемаглютиніну Н13 від нетипових хазяїв для цього підтипу — представників ряду *Anseriformes* (галагаз, *Tadorna tadorna*). У результаті проведення філогенетичного аналізу за фрагментами ділянок генів гемаглютиніну та нейрамінідази доведено їхню подібність до ізолятів, виділених від мартинів звичайних на території Нідерландів відповідно на 97,8 і 98,24 % і далі за зменшенням ступеня гомології.

Ключові слова: вірусосоєність, гемаглютинін, нейрамінідаза

На сьогодні існує чотири варіанти вірусу грипу: типи А, В, С і D. Віруси грипу (ВГ) типу А є причиною всіх відомих великих епідемій і пандемій, хоча деякі легкі епідемії вірусу грипу типу В також були описані [1–4]. ВГ типу А поділяють на підтипи відповідно до їхніх двох поверхневих глікопротеїнів: гемаглютиніну (Н) та нейрамінідази (N) [5, 6]. Щодо глікопротеїну Н, виділено 18 функціональних антигенних підтипів (від Н1 до Н18). Для N наразі нараховується 12 функціональних антигенних підтипів [7–9]. Більшість з можливих комбінацій (144 варіанти реасортації) вірусів грипу з підтипами Н (за винятком Н17 та Н18, які циркулюють серед рукокрилих) і нейрамінідази N1–N10 (окрім N11 і N12, які також ізольовані тільки від рукокрилих — відповідно ізоляти Н17N11 і Н18N12), виділено саме від птахів [5, 10]. Також ВГ типу А має здатність інфікувати широкий спектр видів, включаючи багатьох тварин і людей [5].

На сьогоднішній день лише віруси грипу трьох підтипів за гемаглютиніном пристосувалися до того, щоб спричиняти пандемії у людей: Н1 (Н1N1) у 1918 році та останнім часом у 2009 році, Н2 (Н2N2) — у 1957 році та Н3 (Н3N2) — у 1968 році [11]. Інші підтипи (наприклад, Н5N1, Н6N1, Н7N2, Н7N7 і Н9N2) спричиняли епізоотії серед домашньої птиці в деяких регіонах світу [12].

Загалом багато вчених зосереджуються на високопатогенному вірусі Н5N1 і деяких інших, але менше уваги приділяють іншим пташиним ВГ (наприклад, Н13), які зазвичай ізолюють від багатьох видів мартинів та інших берегових птахів ряду *Charadriiformes* [13]. Вірус підтипу Н13 (Н13N6) уперше був виділений у 1977 році саме від мартинів у Сполучених Штатах [14] і згодом виявлявся переважно у мартинів і берегових птахів як вірус з низькою патогенністю [15].

Мета роботи полягала у вивченні циркуляції вірусу грипу підтипу Н13 у нехарактерних хазяїв. Також досліджували походження та генетичні зв'язки ВГП підтипу Н13, якій був виділений під час проведення епізоотичного моніторингу на території Генічеського, Новотроїцького та Чаплинського районів Херсонської області у 2016 році від галагаза (*Tadorna tadorna*) — представника ряду *Anseriformes*.

Матеріали і методи досліджень. *Збір матеріалу.* Збір проб фекалій проводили в місцях скупчення дикої птиці. Зразки фекалій поміщали до кріопробірки з транспортним середовищем з додаванням 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну, які, у свою чергу — до кріобіологічного посуду з рідким азотом ($t = 196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Усі зразки з біологічним матеріалом (кріопробірки) мали відповідне маркування, де було зазначено: вид птиці, місце відбору, чергове число проби, дата відбору та назва зразка (фекалії).

Вірусологічні дослідження отриманих проб з метою ізоляції гемаглютинуючих вірусів проводили згідно з вимогами Всесвітньої організації здоров'я тварин (ВОЗТ) на курячих ембріонах 9–10-добової інкубації.

Овоскопування інфікованих ембріонів проводили двічі на добу. Час загибелі кожного ембріона реєстрували у відповідному протоколі.

Ідентифікацію проводили згідно з рекомендаціями ВОЗТ за допомогою реакції затримки гемаглютинації з використанням референтних до вірусів грипу підтипів H1–H16 і пташиних авуловірусів (aAVV) 1–4-го та 6–9-го серотипів сироваток (виробництва Veterinary Laboratories Agency (м. Вейбридж, Велика Британія), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (м. Венеція, Італія) та ННЦ «ІЕКВМ» (м. Харків, Україна).

Секвенування. Проводили секвенування та філогенетичний аналіз фрагментів генів H та NA. Секвенування проводили за допомогою комерційного набору «ABI Prism Terminator Kit» (Applied Biosystems, США) з використанням генетичного аналізатора ABI-3000 DNA (ABI Prism, США). Отриману генетичну послідовність конструювали і аналізували за допомогою програмного пакету DNASTar LaserGene (DNASTar Inc., США).

Вирівнювання генів H та N досліджуваних ізолятів разом із 100 гомологічними послідовностями, опублікованими в базі даних GenBank, проводили за допомогою відкритого програмного забезпечення MAFFT. Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей здійснювали за допомогою програми Mega 11 методом Neighbor Joining за бутстреп-підтримки 1000. Вивчення відсотку спорідненості проводили також за допомогою програми Mega 11.

Результати досліджень. Під час проведення дослідження вірусологічного матеріалу від галагазів виявлено наявність гемаглютинуючого ізоляту, який за проведення серологічної ідентифікації затримував специфічну аглютинацію з референтною сироваткою до ВГП підтипу H13. Результати нуклеотидного секвенування дозволили встановити 6-й підтип нейрамінідази. Таким чином, вірусосойство серед галагазів щодо ВГП H13 у листопаді 2016 року на території досліджуваних регіонів Херсонської області становило 0,53 %.

У результаті проведення філогенетичного аналізу за фрагментом гена H встановлено, що український ізолят H13N6 є найбільше подібним до ізолятів H13N6, виділених в Нідерландах від мартинів звичайних (*Larus ridibundus*). Так, спорідненість з ними коливалася від 97,8 % (ізолят A/black-headed gull/Netherlands/5/2014), 97,75 % (5 ізолятів від мартинів звичайних, виділених також в 2014 році) і далі за зниженням гомології (ще 83 ізоляти). Щодо інших представників ряду Charadriiformes, український ізолят мав подібність на 96,71 % з грузинським ізолятом від мартина жовтоногого (*Larus cachinnans*), на 96,7 % — до фрагмента гена вірусу грипу H13N8, ізольованого в США на території штату Масачусетс від мартина делаверського (*Larus delawarensis*) та на 96,42 % — до фрагмента гена від мартина мартина беренгійського (*Larus glaucescens*), виділеного на Алясці. Щодо ВГП H13, виділених від птахів іншого ряду (а таких виявилось лише 2 ізоляти зі 100), на 95,78 % встановлено подібність фрагмента гена H до качинового ізоляту, виділеного на території Китаю в 2017 році та на 95,55 % — до ізоляту, виділеного від крижня на території Нідерландів ще у 2006 році (рис. 1).

Наступним етапом наших досліджень було встановлення спорідненості українського ізоляту з іншими за фрагментом гена N (рис. 2). Так, виявлено, що зазначений фрагмент гена ізоляту A/галагаз/Україна/КТ/9-2-11/2016 на 98,24 % тотожний з геном двох нідерландських ізолятів того самого підтипу від мартинів звичайних, виділених у 2012 році. Також спостерігається спорідненість з ізолятом від мартина жовтоногого, виділеного на території Грузії — 98,23 %. Необхідно зауважити, що зі 100 ізолятів, які мають спорідненість за фрагментом гена N від 89,15 до 98,24 %, 5 вірусів виділено не від представників ряду Charadriiformes: 2 — від качок на території Сибіру, по 1 ізоляту — від качок з території Аляски (США) та префектури Хоккайдо (Японія), 1 — від крижня на території Китаю.

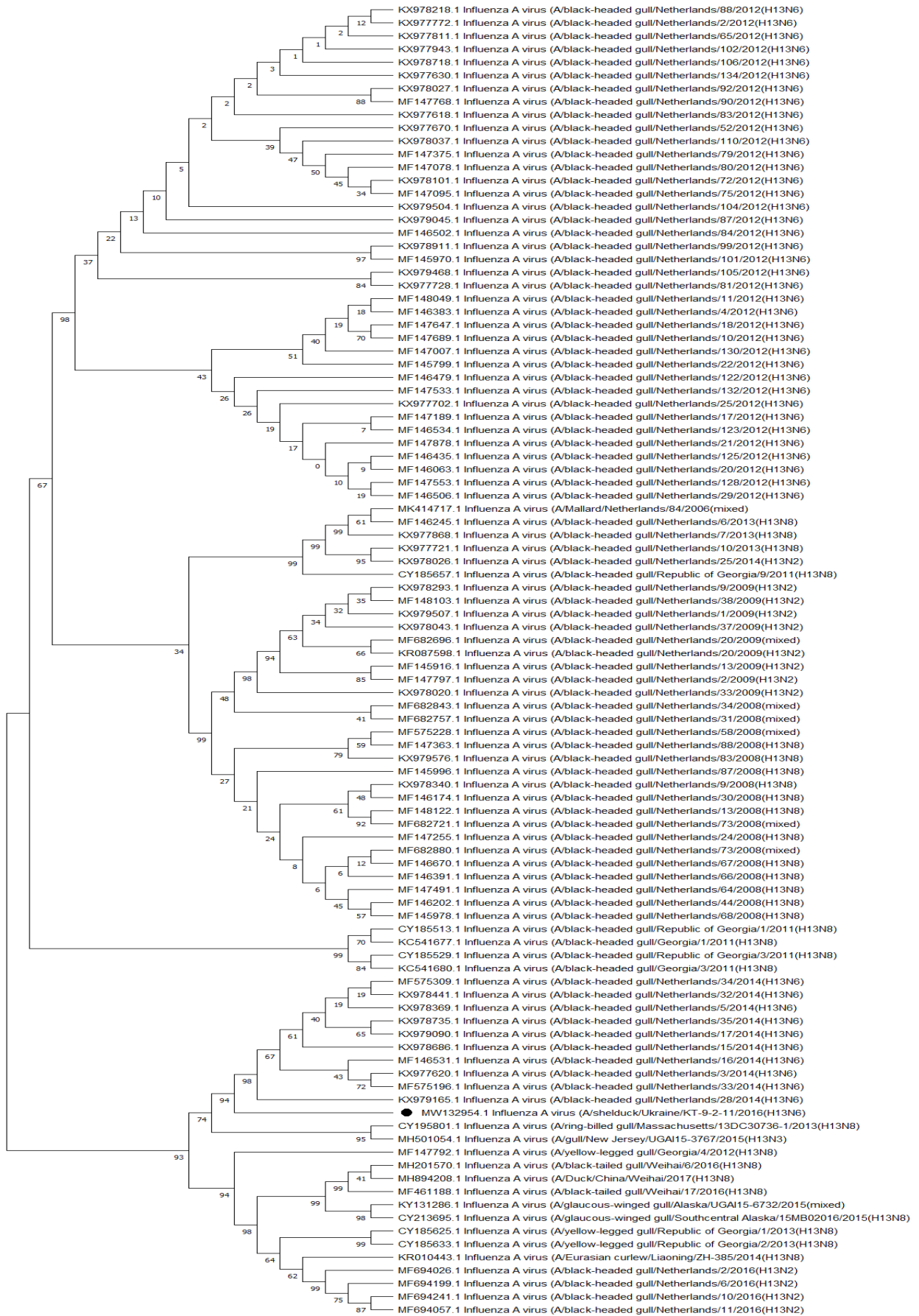


Рис. 1. Філогенетичні зв'язки ВГП A/shelduck/Ukraine/KT/9-2-11/2016 за фрагментом гена гемаглютиніну.



Рис. 2. Філогенетичні зв'язки ВГП A/shelduck/Ukraine/KT/9-2-11/2016 за фрагментом гена нейрамінідази.

Обговорення. У цій статті наведено результати вивчення вірусоносійства ВГП підтипу H13 серед нетипових представників — водоплавних птахів ряду *Anseriformes*. Нам вдалося ізолювати ВГП від галагазів (*Tadorna tadorna*) під час проведення епізоотичного моніторингу на території Генічеського, Новотроїцького та Чаплинського районів Херсонської області у 2016 році.

Вивчення генетичної спорідненості ізолюваного вірусу за фрагментом гена N показало, що український ізолят має нідерландське походження або здобув більшість своїх генів за реасортації нідерландських ізолятів. Найвища генетична спорідненість на рівні 97,8 % виявилася з вірусом A/black-headed gull/Netherlands/5/14, виділеним у 2014 році. Далі за зниженням генетичної спорідненості виявилось ще 83 ізоляти від мартинів звичайних, які мають також нідерландське походження. Що стосується ізолятів ВГП H13, що були виділені від інших представників ряду *Charadriiformes*, фрагмент гена N українського ізоляту мав подібність на 96,71 % до фрагмента гена грузинського ізоляту від мартина жовтоногого (*Larus cachinnans*), на 96,7 % — до фрагменту гена N вірусу грипу H13N8, ізолюваного в США на території штату Масачусетс від мартина делаверського (*Larus delawarensis*) та на 96,42 % — до фрагмента гена N мартина беренгійського (*Larus glaucescens*), виділеного на Алясці (США). Що стосується ізолятів від птахів інших рядів (це лише 2 ізоляти зі 100), подібність за фрагментом гена N український ізолят на рівні 95,78 % виявив з ізолятом A/Duck/China/Weihai/2017 (H13N8), виділеним на території Китаю в 2017 році від качки. Також гомологія за цим фрагментом гена на рівні 95,55 % виявлено з ізолятом A/Mallard/Netherlands/84/2006 (mixed), виділеним від крижня на території Нідерландів ще у 2006 році.

Вивчення генетичної спорідненості ізолюваного вірусу за фрагментом гена N також довело подібність українського ізоляту до нідерландських ізолятів: тотожність на рівні 98,24 % виявлено з двома ізолятами A/black-headed gull/Netherlands/70/2012 (H13N6) та A/black-headed gull/Netherlands/88/2012 (H13N6). Також спорідненість на рівні 98,23 % виявлено з грузинським ізолятом від мартина жовтоногого A/yellow-legged gull/Republic of Georgia/1/2011 (H13N6)). Зазначаємо, що зі 100 ізолятів з найбільшою спорідненістю за фрагментом гена N лише 5 виділено не від представників ряду *Charadriiformes*: 2 — від качок на території Сибіру ще в 1998 році (A/duck/Siberia/272PF/1998 (H13N6) та A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) гомологія на рівні 93,74 та 93,73 % відповідно), по 1 ізоляту — від качок з території Аляски (США) (A/duck/Interior Alaska/11PG00703/2011 (mixed)) з гомологією до фрагмента гена N українського ізоляту на рівні 91,06 %) та префектури Хоккайдо (Японія) (A/duck/Hokkaido/W189/2006 (H13N6) з гомологією до фрагмента гена N українського ізоляту на рівні 92,54 %) та 1 — від крижня, виділеного на території Китаю (A/mallard/Dalian/DZ-137/2013 (H13N6)) з гомологією до фрагмента гена українського ізоляту на рівні 91,10 %.

Висновки. Таким чином, за отриманими результатами проведених досліджень можна припустити, що український ізолят має нідерландське походження або здобув більшість своїх генів за реасортації саме нідерландських ізолятів. Отримані дані щодо вивчення спорідненості до інших ізолятів ВГП H13 за фрагментами генів N та N ще раз підтверджує той факт, що представники ряду *Charadriiformes* є основним резервуаром для цього підтипу ВГП, а ізоляція вірусу від птахів, що належать до інших рядів, є майже унікальним випадком. Ізоляція ВГП H13 від нетипових хазяїв доводить потенційну можливість цього вірусу долати бар'єр та інфікувати представників, для яких цей підтип не є характерним.

Список літератури

1. Frank A. L. et al. Influenza B virus infections in the community and the family. The epidemics of 1976–1977 and 1979–1980 in Houston, Texas. *American Journal of Epidemiology*. 1983. Vol. 118, No. 3. P. 313–325. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113638>.
2. Gao G. F., Sun Y. It is not just AIV: From avian to swine-origin influenza virus. *Science China. Life Sciences*. 2010. Vol. 53. P. 151–153. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0017-4>.
3. Guan Y. et al. The emergence of pandemic influenza viruses. *Protein Cell*. 2010. Vol. 1, No. 1. P. 9–13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0008-z>.
4. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009. Vol. 459. P. 931–939. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08157>.
5. Webster R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 1992. Vol. 56, P. 9152–179. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>.
6. WHO. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*. 1980. Vol. 58. P. 585–591. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2395936/>.

7. Gamblin S. J., Skehel J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285. P. 28403–28409. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.129809>.
8. Tong S. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 10. P. 4269–4274. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1116200109>.
9. Russell R. J. et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*. 2006. Vol. 443, No. 7. P. 107 45–49. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05114>.
10. Olsen B. et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 2006. Vol. 312, No. 5772. P. 384–388. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1122438>.
11. Medina R. A., García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews. Microbiology*. 2011. Vol. 9. P. 590–603. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2613>.
12. Brown I. H. Summary of Avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006–2009. *Avian Diseases*. 2010. Vol. 54. P. 187–193. DOI: <https://doi.org/10.1637/8949-053109-reg.1>.
13. Velarde R. et al. Avian influenza virus H13 circulating in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) in southern Ontario, Canada. *Avian Diseases*. 2010. Vol. 54. P. 411–419. DOI: <https://doi.org/10.1637/8808-040109-Reg.1>.
14. Hinshaw V. S. et al. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. *Journal of Virology*. 1982. Vol. 42. P. 865–872. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.42.3.865-872.1982>.
15. Höfle U. et al. Tissue tropism and pathology of natural influenza virus infection in black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*). *Avian Pathology*. 2012. Vol. 41. P. 547–553. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.744447>.

CIRCULATION OF ABNORMAL ISOLATES OF H13 SUBTYPE INFLUENZA VIRUS AMONG WILD WATER BIRDS

Tkachenko S. V., Stegnyy B. T., Rula O. M., Muzyka D. V.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

*The ecology, epidemiology and evolution of avian influenza A viruses in wild birds is still poorly understood due to the extreme complexity caused by the multiple host species of the virus, which are difficult to study during the annual cycle of host development and possible infection by several virus subtypes. A key component is understanding the genetic relationships of individual avian influenza subtypes, which makes it possible to track the origin of new isolates or changes in the causes of their pathogenicity. The purpose of our research was to study the circulation of avian influenza subtypes atypical for wild waterfowl, conduct research into their genetic structure, and search for related viruses to determine the origin of Ukrainian isolates. According to the results of the research, an isolate of avian influenza A with hemagglutinin H13 subtype was isolated from atypical hosts for this species — representatives of the order Anseriformes (the common shelduck, *Tadorna tadorna*). When conducting a phylogenetic analysis of the regions of the hemagglutinin and neuraminidase genes, their similarity to the isolates isolated from common martins in the Netherlands was proven to be 97.8% and 98.24%, respectively, and further down the degree of homology.*

Keywords: virus carrying, hemagglutinin, neuraminidase

2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 619:616.98:578.828:578.2'21:636.22/.28

DOI [10.36016/VM-2023-109-2](https://doi.org/10.36016/VM-2023-109-2)

БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ОСНОВНИХ ГЕНІВ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ (*GAG, ENV, POL*)

Рудова Н. Г., Солодянкін О. С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: rudovanatawa@ukr.net

У статті представлено результати біоінформатичного аналізу послідовностей основних генів вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (*gag, env, pol*). Отримано оновлені дані щодо філогенетичних зв'язків збудника. Встановлено існування щонайменше двох генетичних груп BIV, які мають спільне походження від єдиного пращура. Крім того, відзначено складність проведення повноцінного та всебічного аналізу послідовностей для повного розуміння еволюції та філогенетичних зв'язків вірусу. Визначено, що відсутність єдиного методологічного підходу щодо секвенування BIV у різних наукових спільнотах світу ускладнює аналізування та інтерпретацію отриманих даних. Запропоновано застосування технологій повногеномного секвенування для вирішення цього питання

Ключові слова: філогенетичні зв'язки, *Lentivirus*, *Retroviridae*

Вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (Bovine immunodeficiency virus, BIV), що належить до роду *Lentivirus* сімейства *Retroviridae*, спричиняє прогресуюче та стійке інфікування великої рогатої худоби [1]. Геном вірусу складається з двох копій одноланцюгової позитивної РНК, яка може інтегруватися в клітинну ДНК. За генетичною та антигенною структурою BIV споріднений з вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) та вірусом імунодефіциту мавп, тому його використовують як тваринну модель для вивчення інших ретровірусів [2]. BIV уперше був виділений у 1969 році від тільної молочної корови з ознаками виснаження, персистуючого лімфоцитозу, лімфаденопатії та ураженням центральної нервової системи за відсутності інфікування вірусом лейкозу ВРХ [3]. Вірус імунодефіциту ВРХ розповсюджений в усьому світі, а серопозитивну молочну та м'ясну худобу реєструють в багатьох країнах, включаючи США, Канаду, Іран, Німеччину, Францію, Швейцарію, Австралію, Велику Британію, Японію, Італію, Корею, Мексику, Індію та Бразилію [4].

У тварин, інфікованих BIV, не було виявлено ознак важкого прояву хвороби. Але, ураховуючи подібність цього вірусу до інших патогенних лентівірусів, є припущення, що BIV також здатен спричиняти клінічний прояв в організмі великої рогатої худоби, однак це не відбувається через високу швидкість обертів виробничих тварин та пов'язаний з цим короткий термін життя тварини. Тому, цілком можливо, що BIV-інфекція може бути пов'язана зі зниженням надою молока, втратою ваги в інфікованих тварин і сприяти вторинним інфекціям в їхньому організмі [5].

Геномна мінливість є важливою особливістю РНК-вірусів, зокрема і вірусу імунодефіциту ВРХ, який навіть в межах одного вірусного ізоляту демонструє значні геномні варіації [6].

В структурі BIV виявлено три основні рамки зчитування (ORF), що кодують гени *gag, env i pol* [1, 4, 7].

Для молекулярно-генетичних досліджень найбільш придатними та інформативними є гени *env i pol* [8]. Ген *env*, який зазнає найбільшого селективного тиску у геномі ретровірусів, використовують для досліджень молекулярної епідеміології збудника. Ген *pol*, який є більш консервативним, використовують для створення філогенетичних дерев і встановлення еволюційних зв'язків ізолятів [4].

У доступній нам літературі є публікації щодо філогенетичного аналізу тих чи інших генів, проведеного науковцями з метою встановлення філогенетичних зв'язків збудника, що виділений в їхніх країнах. Ці дані демонструють більш ніж 98–99 % нуклеотидної гомології зі штамом R-29, що є референтним [8–11].

Мета досліджень. Провести біоінформатичний аналіз наявних у міжнародній базі даних GenBank нуклеотидних послідовностей основних генів BIV (*gag*, *env*, *pol*) та отримати оновлені дані щодо філогенетичних зв'язків збудника.

Матеріали та методи. Для формування баз даних нуклеотидних послідовностей основних генів вірусу імунодефіциту ВРХ проводили відповідний інформаційний пошук у міжнародній базі даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Отримані послідовності розподіляли до відповідних підбаз з метою подальшого проведення філогенетичного аналізу.

Множинне вирівнювання обраних послідовностей проводили за допомогою програми BioEdit v. 7.0.0, модулю ClustaW [12].

Біоінформатичний аналіз отриманих послідовностей проводили з використанням алгоритму BLAST-online інтернет-ресурсу GenBank [13]. Для проведення філогенетичного аналізу використовували програму MEGA 11 [14]. Філогенетичний аналіз секвенованих послідовностей основних генів BIV та побудову дендрограм проводили за методом найближчих сусідів (Neighbour joining, bootstrap 1000, модель попарних дистанцій). Аналіз філогенетичного дерева здійснювали шляхом візуальної оцінки його топології та попарних відстаней між компонентами вибірки.

Результати досліджень. На основі інформації, представленої у міжнародній базі даних GenBank, було сформовано базу даних повних геномів та частково секвенованих послідовностей основних генів *gag*, *env* і *pol* ізолятів вірусу імунодефіциту ВРХ, виявленого у різних географічних регіонах світу. Послідовності були розподілені на окремі підбази, кожна з яких містила інформацію тільки про гени *gag*, *env* і *pol*. Усі послідовності були отримані у форматах FASTA (*.fasta) або GenBank (*.gb).

Сформована база даних містила 52 послідовності геномних РНК BIV довжиною від 170 до 8 482 пар нуклеотидів (п. н.). З них: 2 повногеномні послідовності вірусу довжиною 8 482 п. н., 8 послідовностей гена *gag* довжиною від 171 до 393 п. н., 16 послідовностей гена *env* довжиною від 170 до 1 857 п. н., 22 послідовності гена *pol* довжиною від 176 до 451 п. н.

Після множинного вирівнювання послідовностей кожного з генів проводили пошук консервативних регіонів і варіабельних ділянок з метою їх аналізування.

Результати множинного вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів *gag* та *env* демонструють відсутність єдиного методологічного підходу щодо секвенування цих генів, що унеможлиблює їх аналізування за допомогою стандартних біоінформатичних пакетів.

Множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *pol* демонструвало відносну однорідність вибірки, що дозволило нам сформувати матрицю для аналізу в програмному пакеті MEGA 11. За результатами множинного вирівнювання було встановлено, що максимальне перекриття вирівняних ділянок становило 176 п. н.

Після множинного вирівнювання отриманих послідовностей були побудовані філогенетичні дерева за алгоритмом найближчого сусіда для кожного з генів BIV.

Аналіз філодендрограми, побудованої для гена *gag* (рис. 1), свідчить про те, що існує щонайменше дві генетичні гілки BIV, які походять від спільного пращура та у певний час відокремились одна від одної.

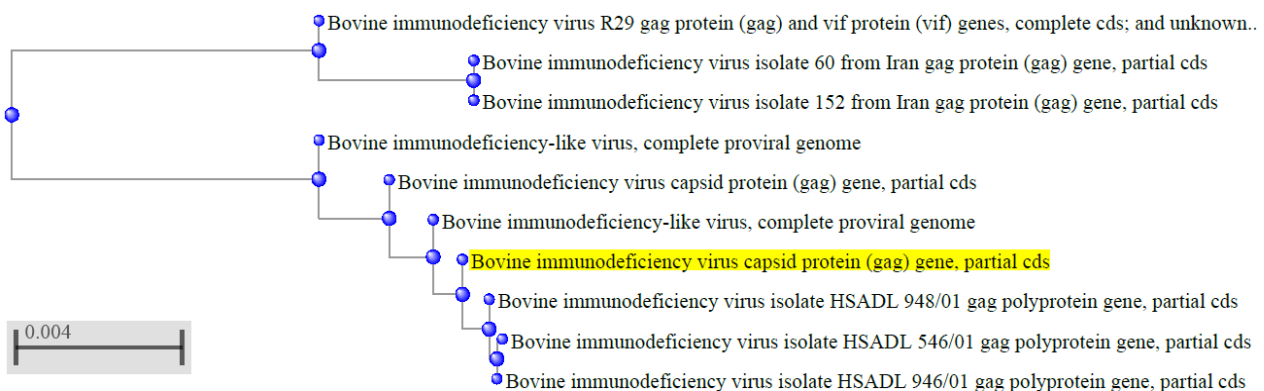


Рис. 1. Філогенетичний аналіз ізолятів BIV на основі послідовностей гена *gag*.

За результатами філогенетичного аналізу гена *env* також встановлено існування двох генетичних гілок BIV (рис. 2).

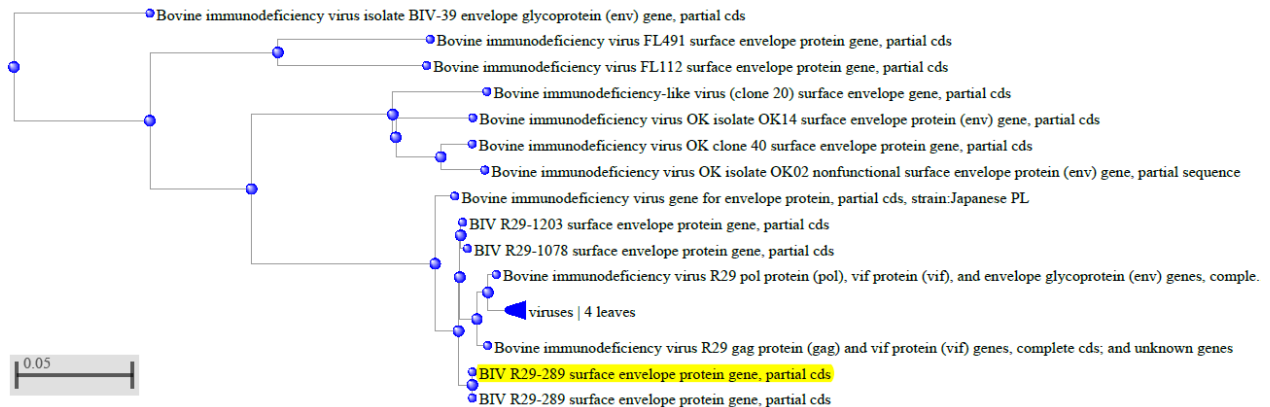


Рис. 2. Філогенетичний аналіз ізолятів BIV на основі послідовностей гена *env*.

Існування двох геногруп було також підтверджено під час побудови дендрограми для гена *pol* (рис. 3).

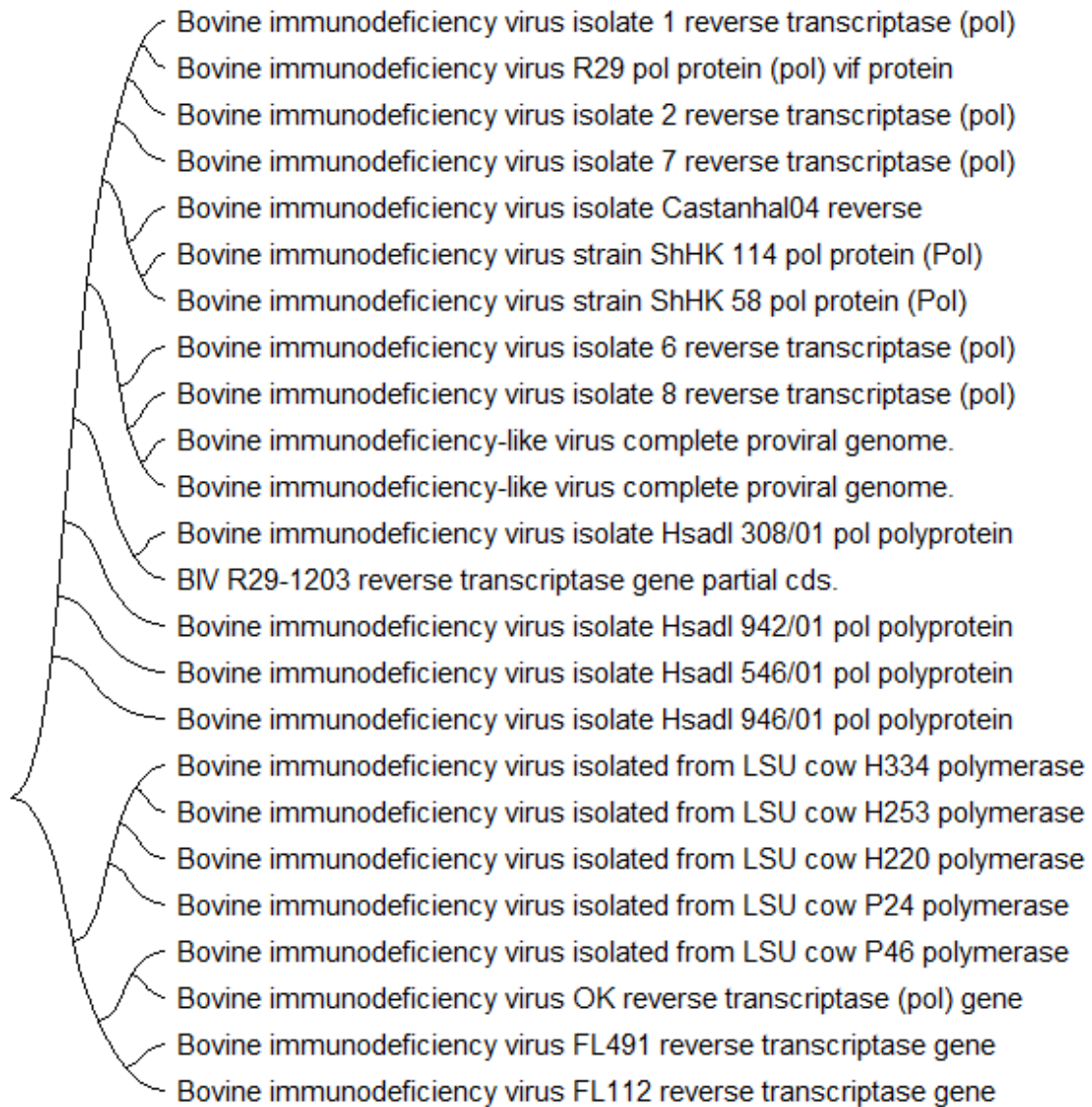


Рис. 3. Філогенетичний аналіз ізолятів BIV на основі послідовностей гена *pol*.

Таким чином, біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів *gag*, *env* і *pol* BIV демонструє існування щонайменше двох генетичних груп BIV і вказує на їхнє спільне походження від єдиного пращура. Ці дані узгоджуються з даними, отриманими іншою науковою групою дослідників, які у своїх дослідженнях використали ген *pol* [4].

Однак, мала вибірка доступних для біоінформатичного аналізу послідовностей, що опубліковані в міжнародній базі даних GenBank, та відсутність єдиного методологічного підходу щодо секвенування цих генів не дозволяє провести повноцінний і всебічний аналіз та оцінити потенційний ризик впливу цього вірусного агента. Крім того, еволюційна мінливість цього РНК-вірусу, його генетична й антигенна спорідненість з вірусом імунодефіциту людини робить його потенційно небезпечним у концепті Єдиного здоров'я. Що, враховуючи негативний досвід людства щодо інших РНК-вірусів (пташиний грип, COVID-19, ВІЛ та ін.), вимагає більш детального вивчення та ретельного аналізування усіх можливих ризиків, пов'язаних з цим.

Висновки. 1. Біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів *gag*, *env* і *pol* BIV демонструє існування щонайменше двох генетичних груп вірусу та вказує на їхнє спільне походження від єдиного пращура.

2. Молекулярно-генетичний аналіз BIV значно ускладнений відсутністю єдиного методологічного підходу щодо секвенування цього збудника у різних лабораторіях світу.

3. Вирішенням цього питання може стати застосування технологій повногеномного секвенування, що дасть більш чітке та конкретизоване розуміння філогенетичних зв'язків збудника.

Перспективи використання отриманих результатів. Отримані результати можуть стати підґрунтям для проведення більш детального вивчення циркуляції BIV в Україні, а результати біоінформатичного аналізу взято за основу для проведення філогенетичного аналізу українських ізолятів після їх секвенування.

Список літератури

1. Gonda M. A. et al. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature*. 1987. Vol. 330, No. 6146. P. 388–391. DOI: <https://doi.org/10.1038/330388a0>.
2. Bouillant A. M., Archambault D. Le virus de l'immunodéficience bovine: brève revue. *Annales de Recherches Veterinaires*. 1990. Vol. 21, No. 4. P. 239–250.
3. Van der Maaten M. J., Boothe A. D., Seger C. L. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1972. Vol. 49, No. 6. P. 1649–1657. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/49.6.1649>.
4. Keshavarz H., Mohammadi A., Morovati S. Evidence of bovine immunodeficiency virus: a molecular survey in water buffalo populations of Iran. *Veterinary Medicine and Science*. 2022. Vol. 8, No. 5. P. 2167–2172. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.872>.
5. Meas S. et al. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2000. Vol. 62, No. 3. P. 329–331. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.62.329>.
6. Esmailnejad A., Najafi H., Torfi Y. Molecular and serological evaluation of bovine leukemia virus in water buffaloes of southern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2020. Vol. 14, No. 1. P. 37–44. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijvm.2019.283696.1004998>.
7. Battles J. K. et al. Immunological characterization of the gag gene products of bovine immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 1992. Vol. 66, No. 12. P. 6868–6877. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.66.12.6868-6877.1992>.
8. Rodrigues A. P. S. et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus (BIV) in bovines from the state of Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2019. Vol. 71, No. 2. P. 711–714. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10495>.
9. González-Fernández V. D. et al. First evidence of bovine immunodeficiency virus infection in Mexican cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2020. Vol. 67. P. 1768–1775. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13530>.
10. Albernaz T. T. et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 2015. Vol. 47, No. 8. P. 1625–1628. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0884-6>.
11. Cooper C. R. et al. Natural selection of the *pol* gene of bovine immunodeficiency virus. *Virology*. 1999. Vol. 255, No. 2. P. 294–301. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9572>.
12. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22, No. 22. P. 4673–4680. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
13. Altschul S. F. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990. Vol. 215, No. 3. P. 403–410. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).
14. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. Vol. 38, No. 7. P. 3022–3027. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

**BIOINFORMATICS ANALYSIS OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY
VIRUS MAIN GENES (GAG, ENV, POL) SEQUENCES**

Rudova N. G., Solodiantkin O. S.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The sequences bioinformatic analysis results of the of the bovine immunodeficiency virus main genes (gag, env, pol), and updated data on the phylogenetic relationships of the pathogen are presented in the article. The existence of at least two genetic groups of BIV, which have a common origin from a common ancestor, has been established. In addition, the complexity of conducting a full-fledged and comprehensive sequence analysis for a complete understanding of the evolution and virus phylogenetic relationships was noted. It was determined that the lack of a single methodological approach to BIV sequencing in different world scientific communities complicates the analysis and interpretation of the obtained data. The application of whole-genome sequencing technologies is proposed to solve this issue

Keywords: *phylogenetic relationships, Lentivirus, Retroviridae*

УДК 619:616.98-036.22-07:579.873.21:636.22/28

DOI [10.36016/VM-2023-109-3](https://doi.org/10.36016/VM-2023-109-3)

ПРОБЛЕМИ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Завгородній А. І., Білушко В. В., Позмогова С. А., Калашник М. В., Бусол В. О.

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: bw.pochta@gmail.com*

*Представлені результати комплексних досліджень у скотарських господарствах України щодо визначення епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби. Доведено, що застосування запропонованого комплексу методів досліджень дозволяє з'ясувати причини неспецифічних алергічних реакцій на туберкулін у тварин з мінімальними економічними збитками для сільгосппідприємств. При цьому встановлено, що параалергічні реакції на туберкулін у великої рогатої худоби зумовлюють такі види мікобактерій, як *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum*, а псевдоалергічні — нокардії та актиноміцети. Прояв у тварин неспецифічних реакцій не є підставою вважати гурти тварин неблагополучними з туберкульозу, проте слід приділяти особливу увагу контролю благополуччя щодо цього захворювання*

Ключові слова: *параалергія, атипові мікобактерії, нокардії, актиноміцети*

Одним із особливо небезпечних інфекційних захворювань людей і тварин у світі є туберкульоз, за якого й дотепер не розроблено високоефективних засобів лікування та вакцинних препаратів, а також уніфікованого методу діагностики [1]. Тому в основу заходів профілактики та оздоровлення гуртів великої рогатої худоби щодо туберкульозу і на сьогодні залишається своєчасна та ефективна діагностика цього захворювання із застосуванням різних методичних прийомів і методів досліджень. Для контролю благополуччя стад великої рогатої худоби (ВРХ) щодо туберкульозу у багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, проводять щорічні моніторингові дослідження поголів'я із застосуванням алергічного методу з використанням туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців. За результатами проведених досліджень визначають стан гуртів ВРХ щодо туберкульозної інфекції. Ефективність проведених заходів профілактики та боротьби з туберкульозом залежить від своєчасного виявлення й видалення зі стада інфікованих і хворих тварин, які є джерелом збудника інфекції, а також від якості проведених ветеринарно-санітарних заходів.

Ряд дослідників повідомляють, що при діагностичному забої у реагуючих на туберкулін тварин на секції в органах і тканинах характерні для туберкульозу ураження були відсутні. При культуральному дослідженні біоматеріалу, відібраного від цих тварин збудника туберкульозу не виділяли [2, 3]. При цьому, господарствам були нанесені економічні збитки від необґрунтованого забою продуктивних тварин і недоотримання продукції, втрати племінної цінності тварин, проведення додаткових діагностичних та ветеринарно-санітарних заходів.

Відомо, що внутрішньошкірні реакції на туберкулін для ссавців у ВРХ можуть обумовлювати не тільки збудники туберкульозу (*M. bovis*, *M. tuberculosis*), а й окремі види атипичних мікобактерій.

Крім цього, псевдоалергічні реакції на туберкулін відмічали у тварин, інфікованих нокардіями, корінебактеріями, родококами та при деяких гельмінтозних захворюваннях, а також при згодовуванні грубих кормів, уражених мікроміцетами [4, 5]. Тому діагностика туберкульозу ВРХ лише алергічним методом не може бути ідеальним тестом для встановлення первинного діагнозу на туберкульоз. Для підтвердження або спростування діагнозу на туберкульоз необхідно застосовувати комплекс діагностичних тестів, спрямованих на встановлення остаточного діагнозу, а також визначення природи внутрішньошкірних реакцій на туберкулін.

Тому диференціація специфічних від паралергічних і псевдоалергічних реакцій у ВРХ і на сьогодні є актуальною проблемою для тваринницьких господарств, як за кордоном, так і у нашій країні. Так недооцінка неспецифічних реакцій у тварин в благополучних господарствах може призвести до економічних збитків, пов'язаних із забоем продуктивних тварин, а переоцінка — до поширення туберкульозної інфекції у стаді.

Разом з цим, при ретроспективному аналізі епізоотичної ситуації щодо туберкульозу у господарствах України встановлено, що при алергічному дослідженні у 2020–2021 роках, 1 782 300 та 1 234 860 голів великої рогатої худоби у благополучних щодо туберкульозу господарствах в 24 областях, було виділено 990–1 132 голови, що реагували на внутрішньошкірне введення туберкуліну у 112 та 84 господарствах відповідно. Із числа реагуючих тварин реакції на туберкулін відмічали у 927–592 корів. При діагностичному забої (623–420 голів) характерні для туберкульозу ураження у бронхіальних лімфатичних вузлах були встановлені тільки в одній тварині. Проведеними культуральними дослідженнями проб біоматеріалу (522–420 проб) від забитих тварин були виділені 34 культури мікобактерій, із них 1 культура — *M. bovis* і 33 культури атипичних мікобактерій з 18 господарств, а в 139 господарствах отримано негативний результат. Результати аналізу епізоотичної ситуації щодо туберкульозу в гуртах ВРХ свідчать про наявність спорадичного випадку захворювання ВРХ, зумовленого збудником туберкульозу виду *M. bovis* та сенсibiliзацію тварин до туберкуліну атипичними мікобактеріями у 18 господарствах. У практичних умовах при виявленні у стаді до 10 реагуючих тварин, їх забивають, а якщо виявляють більше 10 позитивно реагуючих на туберкулін — діагностичному забою підлягають 5 голів і за результатами патологоанатомічного дослідження визначають епізоотичний стан гурту щодо туберкульозу. Відомо, що туберкульоз належить до повільних інфекцій. При цьому в організмі інфікованих тварин інфекційний туберкульозний процес може мати тривалий час латентну форму перебігу, що досить складно діагностувати. Крім цього, в організмі однієї тварини можуть циркулювати як збудник туберкульозу у R-, S-, L-формах, так і персистувати атипичні мікобактерії, що заважає встановити природу алергічних реакцій і визначити епізоотичний статус щодо туберкульозу у такому господарстві. Проте й дотепер залишається актуальною проблема неспецифічних реакцій на туберкулін у благополучних господарствах та їх диференціація від специфічних.

Метою роботи було вивчити природу реакцій на туберкулін у ВРХ в благополучних господарствах і визначити епізоотичний статус щодо туберкульозу.

Матеріал і методи. Для реалізації поставленої мети були відібрані 2 господарства, у яких протягом 2–5 років щорічно відмічали у ВРХ підвищену гіперчутливість сповільненого типу до туберкуліну для ссавців. Для визначення причин реакцій на туберкулін у ВРХ нами застосовано комплекс діагностичних досліджень на туберкульоз, який включає епізоотологічний, клінічний, алергічний, патологоанатомічний, мікроскопічний, культуральний і біологічний методи досліджень проб біологічного матеріалу, відібраного від забитих з діагностичною метою тварин. Дослідження проб із об'єктів утримання тварин (ґрунт, гній, зіскриби з годівниць, напувалки, стійла, підлога) проводили мікроскопічним і культуральним методами. Біологічні дослідження щодо виділення ізолятів культур мікобактерій проводили в дослідах на здорових морських свинках живою вагою 300–350 г, які до початку досліду не реагували на внутрішньошкірне введення туберкуліну для ссавців та алерген з атипичних мікобактерій.

Алергічні дослідження лабораторних тварин після інокуляції культур мікобактерій проводили триразово з інтервалом 30 днів за допомогою туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців та алергену з атипичних мікобактерій (ААМ). Облік інтенсивності реакцій проводили

через 24 години після введення алергенів. Позитивною реакцією вважали гіперемію шкіри на місці введення алергенів та утворення папули діаметром 5 мм і більше.

Результати досліджень. Визначення епізоотичної ситуації щодо туберкульозу в цих господарствах проводили шляхом аналізу проведених моніторингових досліджень фахівцями ветеринарної служби районних управлінь ветмедицини. При цьому встановлено, що у господарстві № 1 при планових алергічних дослідженнях виділяли позитивно реагуючу на туберкулін велику рогату худобу з 2007 року. За період з 2007 по 2019 роки серед досліджуваного щорічно поголів'я у 1 600–1 800 голів було виділено 524 тварини, які реагували на внутрішньошкірне введення туберкуліну, із них — 368 корів. Кількість позитивно реагуючих тварин при проведенні щорічних досліджень у квітні та листопаді суттєво не відрізнялася. Серед молодняка реагуючих тварин не виявляли, а серед нетелів відмічали поодинокі позитивні випадки. При цьому, слід зазначити, що при патологоанатомічному розтині 102 голів ВРХ, в органах і тканинах характерних для туберкульозу уражень у жодному випадку не було виявлено. У 2020 році кількість реагуючих тварин зменшилась і складала від 20 до 28 голів за рік.

У другому господарстві протягом 5 років спостерігали позитивні реакції у ВРХ на внутрішньошкірне введення туберкуліну. За цей період було виділено 159 голів, які реагували на туберкулін і 60 голів були здані на забій. Захворювання тварин на туберкульоз не було встановлено, а причини реакцій на туберкулін не були з'ясовані. Тварин, що раніше реагували на туберкулін (50 голів) і залишились у господарстві, в зимовий період утримували в окремому приміщенні, а в літній період у літньому таборі.

Враховуючи вищенаведені дані, для з'ясування природи реакцій у ВРХ у цих господарствах нами було застосовано комплексний метод досліджень із використанням симультанної алергічної проби, патологоанатомічного та бактеріологічного методів дослідження.

Результати комплексних досліджень ВРХ на туберкульоз наведені у табл. 1.

Таблиця 1 — Результати досліджень ВРХ на туберкульоз у господарствах

№ господарства	Досліджено тварин, голів	Кількість досліджень	Досліджено методом						
			Алергічним			Патологоанатомічним		Бактеріологічним	
			Усього	З перевагою на			Досліджено, голів	Результат	Ізольовано культури
ППД	ААМ	Рівнозначно							
1	677	3	22	3	17	2	5	негативний	<i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i>
2	1220	2	58	10	46	2	12		<i>M. nonchromogenicum</i> , актиноміцети, нокардії

Наведені у таблиці дані свідчать про те, що за триразового дослідження з інтервалом 45 діб 677 голів ВРХ у першому господарстві було виділено 22 тварини, які реагували у симультанній пробі. З них реакції туберкулін (ППД) для ссавців були більш інтенсивно виражені у 3 голів, у 17 голів інтенсивність реакцій була більшою на ААМ, а у 2 голів спостерігали однаково інтенсивність реакцій на обидва алергени. У господарстві № 2 із числа досліджених тварин (1 220 голів) при обліку реакцій на мікобактеріальні алергени при першому дослідженні у симультанній пробі було виділено 36 голів, при другому — 22 тварини, які реагували на туберкулін та ААМ. Із числа реагуючих 58 голів потовщення складки шкіри у місці введення туберкуліну були більш виражені у 10 голів, на ААМ — у 46 голів, а однаково реагували на обидва алергени 2 голови. У ізольованих 90 голів, що раніше реагували на туберкулін, реакції збереглися лише у 9 % тварин при першому дослідженні, а при другому дослідженні отримано негативний результат. Серед дослідженого молодняка, телиць парувального віку та нетелів, гіперчутливість сповільненого типу на туберкулін була відсутня. У тварин, що реагували з більшою інтенсивністю на туберкулін (господарство № 1 — 3 гол., № 2 — 10 гол.) та з однаковою інтенсивністю на туберкулін і ААМ (по 2 гол. відповідно) при патологоанатомічному розтині (5 і 12 гол. відповідно) в органах і лімфатичних вузлах властивих для туберкульозу уражень не було виявлено. При бактеріологічному дослідженні проб біоматеріалу від забитих з

діагностичною метою тварин із господарства № 1 були виділені культури атипичних мікобактерій видів *M. phlei*, *M. smegmatis*, у господарстві № 2 ізольовані атипичні мікобактерії виду *M. nonchromogenicum*, а також ноккардії та актиноміцети. Ізольовані культури атипичних мікобактерій при внутрішньом'язевому введенні морським свинкам у дозі 1,0 мг бактеріальної маси у 1,0 см³ стерильного ізотонічного розчину зумовлювали внутрішньошкірні реакції на туберкулін для ссавців та алерген із атипичних мікобактерій протягом 30–60 діб. У евтаназованих лабораторних тварин через 90 діб на розтині в органах і тканинах характерних для туберкульозу уражень не було виявлено. Отримані дані свідчать про те, що виділені культури атипичних мікобактерій в організмі ВРХ і лабораторних тварин не викликали захворювання на туберкульоз, а лише зумовлювали алергічні реакції на мікобактеріальні алергени. Разом з цим, у дослідних господарствах із годівниць, напувалок, проб ґрунту та кормів також були виділені убіквітарні атипичні мікобактерії четвертої групи за класифікацією Раньона. Після цього у приміщеннях, де утримується ВРХ проведено механічну очистку та технологічну дезінфекцію водним розчином препарату «ДЗПТ-2». Крім цього, проведено санацію вигульних майданчиків і територій ферм хлорним вапном, а у приміщеннях — санітарні дні. При дослідженні поголів'я тварин у 2022 році, після виконання рекомендованих профілактичних заходів, позитивно реагуючих особин не було виявлено.

Висновки. 1. Короткочасну сенсibilізацію до туберкуліну ВРХ у дослідних господарствах обумовлювали атипичні мікобактерії видів *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum*, а також ноккардії та актиноміцети.

2. Запропонований комплексний метод дозволяє протягом 3–4 місяців визначити природу реакцій на туберкулін у ВРХ і запобігти економічним збиткам внаслідок невинновданого забою тварин.

3. Гурти ВРХ, де реакції на туберкулін зумовлені атипичними мікобактеріями слід вважати благополучними щодо захворювання на туберкульоз, а сенсibilізованих до туберкуліну тварин не вважати джерелом цієї інфекції.

Список літератури

1. Albertini M. et al. Réactivité tuberculique non spécifique par sensibilisation aux mycobactéries non tuberculeuses (MNT) chez des enfants non vaccinés par le BCG. Intérêt diagnostique de la comparaison des tests intradermiques à la tuberculine et aux antigènes de MNT. *Revue des Maladies Respiratoires*. 1996. Vol. 13, No 3. P. 273–279.
2. Karlson A. G. Non-specific or cross sensitivity reactions to tuberculin in cattle. *Advances in Veterinary Science*. 1962. Vol. 7. P. 147–181.
3. Zavgorodnii A. I. et al. Etiological factors in triggering non-specific allergic reactions to tuberculin in cattle. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. Vol. 12, No 2. P. 228–233. DOI: <https://doi.org/10.15421/022131>.
4. Pujic P. et al. Chapter 40 — Nocardia and Actinomyces. *Molecular Medical Microbiology*. 2nd ed. London: Academic Press, 2015. P. 731–752. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00040-8>.
5. Mahendra P, Dave P. Nocardiosis: an emerging infectious actinomycetotic disease of humans and animals. *Journal of Microbiology & Microbial Technology*. 2016. Vol. 1, Issue 2. P. 4. DOI: <https://doi.org/10.13188/2474-4530.1000008>.

PROBLEMS IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS

Zavgorodnii A. I., Bilushko V. V., Pozmogova S. A., Kalashnyk M. V., Busol V. O.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

*The results of comprehensive researches in cattle-breeding farms of Ukraine to determine the epizootic situation of bovine tuberculosis are presented. It is proved that the application of the proposed complex of research methods allows to find out the causes of non-specific allergic reactions to tuberculin in animals with minimal economic losses for agricultural enterprises. It has been established that paralleric reactions to tuberculin in cattle are caused by such mycobacterial species as *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum*, and pseudoallergic reactions are caused by nocardia and actinomycetes. The presence of non-specific animal reactions is not a reason to consider animal groups unfavorable for tuberculosis. However, special monitoring for this disease is needed*

Keywords: *paraallergy, atypical mycobacteria, nocardia, actinomycetes*

ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ВІДКРИТИХ РАМОК ЗЧИТУВАННЯ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ Е СВИНІ ГЕНОТИПУ 3

Лиманська О. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: olgaliman@ukr.net

Метою роботи було визначення особливостей структурної організації трьох відкритих рамок зчитування ORF1–ORF3 вірусу гепатиту Е свині генотипу 3. Тиск відбору на гени оцінено через проведення тесту Таджими на нейтральність, який вбудовано в програму MEGA 6. Ентропію Шеннона використано для визначення різноманіття в кожній позиції відкритих рамок зчитування. Графіки ентропії для ORF1–ORF3, які представляють кількісну варіабельність для кожної амінокислотної (нуклеотидної) позиції вирівняних послідовностей 11 ізолятів ВГЕ-3 свині, розраховано за допомогою програми BioEdit. Для філогенетичного аналізу нуклеотидні відстані проаналізовано з використанням методу приєднання сусідів. Аналіз нуклеотидних, несинонімічних та синонімічних дистанцій виконано за допомогою MEGA 6. За допомогою тесту Таджими на нейтральність визначено параметри мутаційного аналізу відкритих рамок зчитування ORF1–ORF3 ВГЕ генотипу 3 свині. Аналіз ентропії Шеннона показав, що ORF3 характеризується найбільшим числом варіабельних амінокислотних залишків (21,7 %) порівняно з кодуєчими ділянками ORF1, ORF2. Аналіз несинонімічних дистанцій в ORF3 дозволив виявити порядок еволюційних подій в історії ізолятів ВГЕ-3 свині. В якості контролю використано штами астровірусів птахів, філогенетичні відношення між якими відповідають порядку еволюції їхніх хазяїв. Топологія дерева для ORF3 ВГЕ-3 свині на підставі несинонімічних дистанцій значно відрізняється від структури дерев, побудованих на основі нуклеотидних та синонімічних дистанцій. Позитивне значення коефіцієнта D тесту Таджими для ORF1, ORF2 ВГЕ-3 свині вказує на дію позитивного відбору на ці відкриті рамки зчитування, а негативне значення для ORF3 — на очищаючий відбір

Ключові слова: позитивний відбір, тест Таджими, негативний відбір, ентропія Шеннона

Вірус гепатиту Е (ВГЕ, HEV, hepatitis E virus) є причиною небезпечного захворювання печінки — гострого та хронічного гепатиту Е, а також асоційований з низкою позапечінкових розладів: неврологічними синдромами, панкреатитом, гематологічними проблемами, нирковими травмами [1]. Геномна одноланцюгова молекула РНК ВГЕ містить три відкриті рамки зчитування (open reading frame, ORF), які кодують неструктурний поліпротеїн (ORF1); основний протеїн капсиду вірусу, асоційований зі складанням віріона, взаємодією з організмом хазяїна та імуногенністю (ORF2); фосфопропротеїн, залучений до процесу виходу вірусу з інфікованої клітини (ORF3) [2, 3]. Серед відомих гепатотропних вірусів тільки генотипи 3 та 4 ВГЕ, для яких основним природним резервуаром є свині та дикі кабани, характеризуються зоонозним потенціалом [4–6].

Основою молекулярної еволюції вірусів, як і інших організмів, є зміни їх геномів та макромолекул віріонів. Мутаційні зміни в молекулах РНК та ДНК (нуклеотидні заміни, інсерції, делеції, рекомбінації) постійно відбуваються в геномі та можуть бути причиною зміни рівня резистентності до лікарських препаратів, патогенності тощо [7, 8]. На рівні нуклеотидних послідовностей основними факторами еволюції є природний відбір, направлений мутаційний тиск та дрейф (вплив на генетичний склад популяції випадкового процесу вимирання та розмноження ліній).

Природний відбір спрямований на елімінацію шкідливих (несприятливих) мутацій, тобто проявляється у вигляді негативного (або очищаючого) відбору, та накопичення і фіксацію корисних (сприятливих) мутацій поряд зі збереженням функціональної активності відповідного білка, а також на підтримку поліморфізму (позитивний відбір). Згідно з нейтральною теорією еволюції, генетичні мутації, які швидко накопичуються, є селективно нейтральними, не

впливають на функціонування білків та, отже, не підпадають під дію природного відбору і, таким чином, їхня фіксація в популяції відбувається шляхом випадкових процесів. При цьому теорія нейтральності не заперечує, але мінімізує роль природного відбору як джерела генетичної варіабельності [9]. Мутаційний тиск, механізм якого вивчений для низки вірусів та бактерій, обумовлений підвищеною частотою та наступною фіксацією заміни аденіну та тиміну на гуанін та цитозин (ГЦ-тиск) або навпаки (АТ-тиск), що призводить до зміни рівня ГЦ-вмісту в ряду поколінь [10–12].

Інсерції та делеції виникають у більшості випадків у некодуючому протеїн фрагменті гена. У білок-кодуючих послідовностях заміни нуклеотидів у третій позиції кодону є, як правило, синонімічними та не пов'язані з заміною амінокислоти на відміну від нуклеотидних заміни у першій та другій позиціях кодону, які є несинонімічними та асоційовані з заміщенням відповідної амінокислоти. Для визначення напрямку та сили відбору з застосуванням різних методів розраховують відношення числа несинонімічних заміни на кількість несинонімічних сайтів (dN) до числа синонімічних заміни на кількість синонімічних сайтів (dS) у білок-кодуючій послідовності. Про консервативність амінокислотної послідовності та, отже, дію очищаючого відбору свідчить значення $dN/dS < 1$. Навпаки, значення $dN/dS > 1$ означає, що відповідний протеїн знаходиться під дією позитивного відбору [13, 14]. Для ідентифікації схильних до мутацій позицій у послідовності протеїну розраховують ентропію Шеннона. Високий рівень ентропії Шеннона у певній позиції є індикатором підвищеної хаотичності та схильності до мутацій, у той час як низький рівень ентропії Шеннона означає підвищену стабільність та низький рівень безладності [15].

В даній роботі на основі філогенетичного аналізу визначено параметри трьох відкритих рамок читування ORF1–ORF3 в геномі ВГЕ-3 свині на макромолекулярному рівні та встановлено внутрішньовидові еволюційні відносини для 11 штамів ВГЕ-3.

Матеріали та методи. Ізоляти ВГЕ свині 3-го генотипу з повним геномом (таксономічний ідентифікатор (txid) 1678143), а також астровірусів курей (txid 336960, 336961) та індиків (txid 246343, 364370) 1-го і 2-го типів отримано через пошук в базі даних нуклеотидів Національного центру біотехнологічної інформації (США) NCBI. Параметри 11 штамів ВГЕ-3 та відомості щодо країн їхнього походження, дати отримання штамів наведено в табл. 1.

Таблиця 1 — Перелік штамів HEV-3, ізольованих з біологічного матеріалу свині, що проаналізовано в роботі

Штам	Номер у GenBank	Країна	Рік
swMN06-A1288	AB290312	Монголія	2006
JIO-swJ19-1	AB443623	Японія	2002
SWHEV75BO2012	KY766999	Італія	2012
CH_VW117	MG573193	Швейцарія	2017
HEV/13RS985-5	MG674164	Італія	2013
MXCDg3_B1_2016	MG833836	Мексика	2016
HEV_006_1	MN184579	Велика Британія	2013
HEVF46	MN450023	Таїланд	2015
HEVGB166	MN450031	Таїланд	2015
swX07-E1	EU360977	Швеція	2008
SAAS-JDY5	FJ527832	Китай	2008

Вирівнювання послідовностей ORF1–ORF3 проведено за допомогою програми Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (версія 6.06) [16].

Програму BioEdit (версія 7.2.5) [17] використано для маніпулювання з нуклеотидними та амінокислотними послідовностями, зокрема, для мутаційного аналізу протеїнів, що транскрибуються з ORF1–ORF3, для визначення амінокислотних заміни ВГЕ свині. Тиск відбору на гени оцінено через проведення тесту Таджими на нейтральність, який вбудовано в програму MEGA 6.

Трансляцію нуклеотидних послідовностей в амінокислотні послідовності з наступним аналізом кодонів проведено за допомогою програми BioEdit.

Ентропію Шеннона використано для визначення різноманіття в кожній позиції відкритих рамок зчитування. Графіки ентропії для ORF1–ORF3, які представляють кількісну варіабельність для кожної амінокислотної (нуклеотидної) позиції вирівняних послідовностей 11 штамів ВГЕ-3, побудовано за допомогою програми BioEdit.

Філогенетичний аналіз виконано декількома методами. Для усіх методів позиції, що містили пробіли, виключено з попарного порівняння послідовностей. Бутстреп-аналіз виконано для 100 реплікацій. Нуклеотидні відстані проаналізовано з використанням методу приєднання сусідів (neighbour-joining, NJ), який базується на двопараметровому методі Кімури оцінки відстані (p-дистанції). Для ORF1–ORF3 аналіз нуклеотидних, несинонімічних та синонімічних дистанцій виконано за допомогою MEGA 6. Додатково аналіз несинонімічних та синонімічних замін виконано за допомогою корекції Jukes-Cantor для методу Nei-Gojobori. Для оцінки достовірності дерева бутстреп-аналіз проведено з використанням 100 випадкових вибірок. Кластери зі значенням, що перевищує 90, вважаються достовірними.

Результати досліджень. Мутаційний процес — це такі випадкові зміни послідовності ДНК як заміни, делеції (випадіння), вставки, складні події. Швидкість мутацій визначають як ймовірність зміни на нуклеотид за покоління.

Під відбором розуміють диференційне розмноження генотипів (штамів патогена), а під пристосованістю — очікувану ефективність розмноження особини (штаму) з певним генотипом (геномом патогена).

Аналіз мутацій в відкритих рамках зчитування ORF1–ORF3. Нуклеотидні послідовності ORF1, ORF2, ORF3 отримано з повновимірних геномів 11 штамів ВГЕ-3 свині. Для аналізу еволюційних відношень між ізолятами ВГЕ-3 спочатку нуклеотидні послідовності ORF1–ORF3 було вирівняно. Несинонімічні (табл. 2) та синонімічні заміни ідентифіковано в трьох відкритих рамках зчитування ізолятів ВГЕ-3 свині. Такі зміни ведуть до зміни поверхневих властивостей ORF.

Визначення еволюційних відстаней (p-відстаней) для пар послідовностей відкритих рамок зчитування (число нуклеотидних або амінокислотних замін, що має місце між ними) дозволило виявити співвідношення синонімічних та несинонімічних замін для цих пар. P-відстань визначають як пропорцію (p) нуклеотидних сайтів, в яких послідовності, що порівнюють, відрізняються.

Зокрема, для пари ізолятів AB443623 (найраніше отриманий штам за відомостями з бази даних GenBank) та MG573193 (має найраніше еволюційно відгалужену гілку ORF3, як впливає з філогенетичного аналізу) визначено наступне. ORF3 ізоляту MG573193 характеризується більшим числом як несинонімічних, так і синонімічних замін порівняно з ORF3 ізоляту AB443623. Переважання несинонімічних замін вказує на ненейтральний характер еволюції протеїну. Більше число синонімічних замін є характерним для внутрішніх протеїнів.

Аналіз ентропії Шеннона для протеїнів ORF1–ORF3. Ентропія є мірою варіабельності всередині кожного сайту та має більш високе значення для варіабельних сайтів порівняно з менш варіабельними сайтами.

У випадку, якщо для всіх послідовностей в вирівнюванні в певній позиції існує тільки один нуклеотид, можна зробити висновок, що існує максимум інформації про зазначену позицію та в цьому випадку ентропія дорівнює нулю. І навпаки, якщо для всіх послідовностей в вирівнюванні в певній позиції наявними є чотири нуклеотиди з частотою 0,25, то інформація щодо цієї позиції в гомологічній послідовності зменшується до нуля, а ентропія набуває максимального значення.

За допомогою аналізу ентропії Шеннона 91, 23 та 25 амінокислотних варіабельних сайтів було ідентифіковано для протеїнів, що трансклюються з ORF1, ORF2 та ORF3 ВГЕ-3 відповідно (рис. 1). Варіабельність розраховано як ентропію для позиції кожного амінокислотного залишку. Кількість варіабельних сайтів для відкритих рамок зчитування становила: ORF1 — 9,2 % (157/1710), ORF2 — 8,0 % (53/662) та ORF3 — 21,7 % (25/115). Аналогічні відсоткові дані було раніше отримано автором для відкритих рамок зчитування ORF1–ORF3 ВГЕ-4 кабана та свині.

Аналіз ентропії показав, що серед відкритих рамок зчитування ВГЕ-3 свині ORF3 характеризується найбільшою варіабельністю, як і ORF-3 ВГЕ-4 свині та кабана (як показано автором раніше).

Таблиця 2 — Позиції кодонів з несинонімічними замінами в ORF3 ВГЕ-3 свині (амінокислотну послідовність ORF3 ізоляту АВ443623 використано як референсну)

Позиція кодона	Номер у GenBank	Заміна амінокислоти
5	EU360977, FJ527832, MG573193, MH184579	S (F)
6	MG573193 MG833836, MH450031	C (Y) C (F)
8	AB290312, EU360977, FJ527832 MG573193	S (L) S (V)
16	EU360977	L (I)
36	EU360977	A (V)
41	KY766999, MG833836	A (V)
43	AB290312	A (V)
64	MH184579	S (L)
75	EU360977, KY766999, MG674164, MH450023, MH450031	S (L)
78	EU360977, KY766999, MG674164, MH450023, MH450031	M (T)
79	AB290312	S (L)
80	EU360977, MH184579, MH450023, MH450031	F (Y)
81	AB290312	H (R)
90	MG573193	D (G)
91	AB290312, FJ527832, MG573193, MG833836, MH450023, MH450031	N (S)
92	AB290312	R (H)
93	AB290312	P (H)
94	MH450023	A (V)
96	AB290312, EU360977, KY766999, MG573193, MG674164, MH184579, MH450023, MH450031	L (S)
97	AB290312, EU360977, FJ527832, KY766999, MG573193, MG674164, MG833836, MH184579, MH450023, MH450031	V (A)
98	AB290312, EU360977, FJ527832, KY766999, MG573193, MG674164, MG833836, MH184579, MH450023, MH450031	Q (P)
101	EU360977, FJ527832	V (A)
109	EU360977	P (L)
110	MG573193	P (L)
112	MG573193, MH450031	V (A)

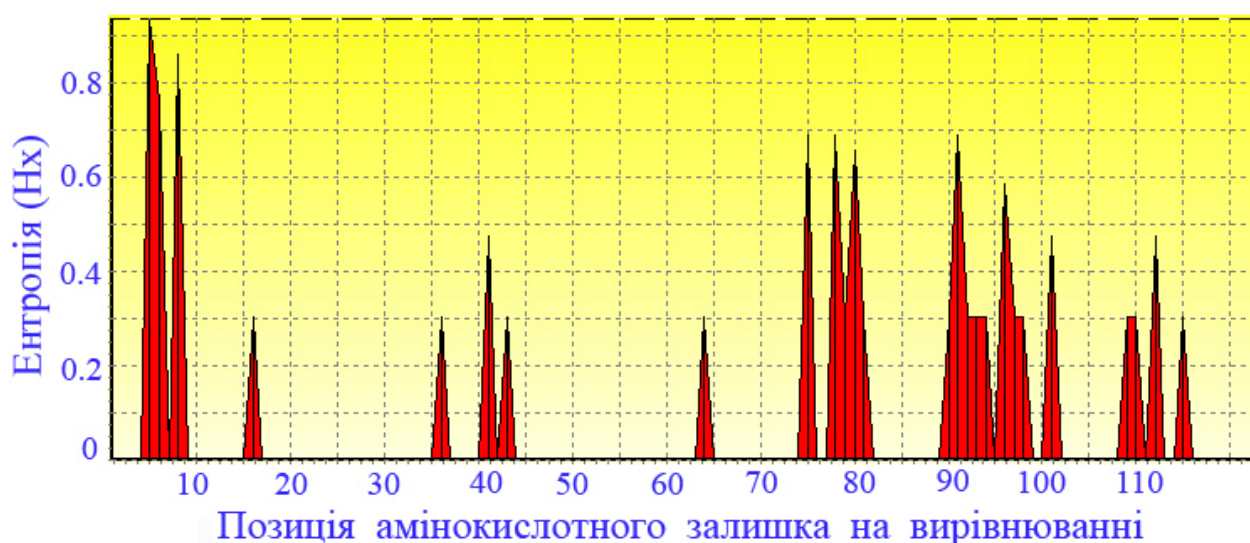


Рис. 1. Графік ентропії Шеннона для протеїну, який транслюється з ORF3 ВГЕ-3 свині, — залежність міри мінливості амінокислотних залишків в заданому положенні від їхньої позиції, — що отримано на підставі вирівнювання та наступної трансляції для 11 ізолятів.

Аналіз позитивного та негативного відбору на ORF1–ORF3. Для ідентифікації фрагментів ORF, які перебувають під дією відбору, проводили тест Таджими на нейтральність, в якому визначають, в тому числі, коефіцієнт D. Для послідовностей, які аналізують, D показує відповідність нуклеотидних заміни гіпотези нейтральності. Тест Таджими дозволяє визначити відхилення нуклеотидної різноманітності, що спостерігають, від моделі нейтральної еволюції.

Фрагменти ORF1 та ORF2 ВГЕ-3 перебувають під тиском позитивного відбору, на що вказує позитивне значення коефіцієнту D (табл. 3). На фрагмент ORF3 діє негативний (очищаючий) відбір, який зменшує варіабельність.

Таблиця 3 — Параметри мутаційного аналізу відкритих рамок зчитування ORF1–ORF3 ВГЕ генотипу 3 свині

	m	S	p_s	Θ	π	D
ORF1	11	1863	0,366372	0,125086	0,171975	1,822164
ORF2	11	583	0,295789	0,100987	0,135427	1,654770
ORF3	11	54	0,158358	0,054066	0,052359	-0,149395

Примітки: m — число послідовностей для аналізу, n — загальне число сайтів, S — число поліморфних сайтів в послідовностях, $p_s = S/n$, $\Theta = p_s/a_1$, π — нуклеотидна різноманітність, D — коефіцієнт теста Таджими (оцінка відповідності характеру нуклеотидних заміни гіпотези нейтральності).

При негативному відборі найприспосованіший генотип (штам патогена) є частим, він підтримує вихідний стан та перешкоджає змінам.

При позитивному відборі найприспосованіший генотип (штам патогена) є рідким. Позитивний відбір сприяє змінам. Після того, як позитивний відбір зробив свою справу і найбільш пристосований генотип (штам патогенна) став частим, відбір стає негативним за незмінності адаптивного ландшафту (який є графіком пристосованості від генотипу (штам патогена). Балансуючий відбір сприяє будь-якому рідкому генотипу, що є можливим тільки за зміни адаптивного ландшафту.

Відповідно до теорії нейтральності ймовірність того, що мутація буде селективно нейтральною (нешкідливою) тим більше, чим меншою мірою вона відбивається на структурі та функції молекули. Інакше кажучи, молекули, які підлягають відносно слабким функціональним обмеженням, еволюціонують швидше молекул, що характеризуються більшими обмеженнями [18].

Внутрішньовидовий філогенетичний аналіз ізолятів ВГЕ-3. Понад 30 років минуло після ізоляції першого штаму ВГЕ свині [19, 20].

Для вивчення еволюційних сил, що діють у внутрішньовидовій популяції ВГЕ-3 свині, окремо проаналізовано нуклеотидні, синонімічні та несинонімічні дистанції для трьох рамок зчитування.

Топологія дерева, отриманого як результат філогенетичного аналізу ORF1 (рис. 2А) та ORF2 (рис. 2Б) на підставі несинонімічних дистанцій, не втрачається, а зберігається та є подібною до структури дерев ORF1–ORF3 ВГЕ-3, отриманих на підставі нуклеотидних, синонімічних дистанцій (результати не наведено).

Топологія дерева для ORF3 на підставі несинонімічних дистанцій (рис. 2В) значно відрізняється від структури зазначених вище дерев.

Аналіз несинонімічних дистанцій в ORF3 дозволив виявити порядок еволюційних подій в історії ізолятів ВГЕ-3 свині. В якості контролю використано астровіруси птахів, філогенетичні відношення між якими відповідають порядку еволюції їхніх хазяїв. Природним хазяїном вірусу нефриту птахів є кури, для яких встановлено, зокрема, філогенетичні відносини з індиками [21].

З рис. 2А та 2Б випливає, що найстарішими ORF3 є відкриті рамки зчитування ізолятів MG573193, FJ527823, AB443623.

Несинонімічні заміни, оскільки вони змінюють амінокислоту, перебувають під впливом сильного позитивного чи негативного тиску. Навпаки, синонімічні заміни, які зберігають амінокислоту, перебувають під слабким тиском відбору або тиск відбору відсутній.

Структура філогенетичного дерева для ORF1 та ORF2 для ізолятів ВГЕ-3, яку отримали при аналізі несинонімічних дистанцій (рис. 2), відрізняється порядком гілок від такої, отриманої при аналізі синонімічних дистанцій (результати не показано).

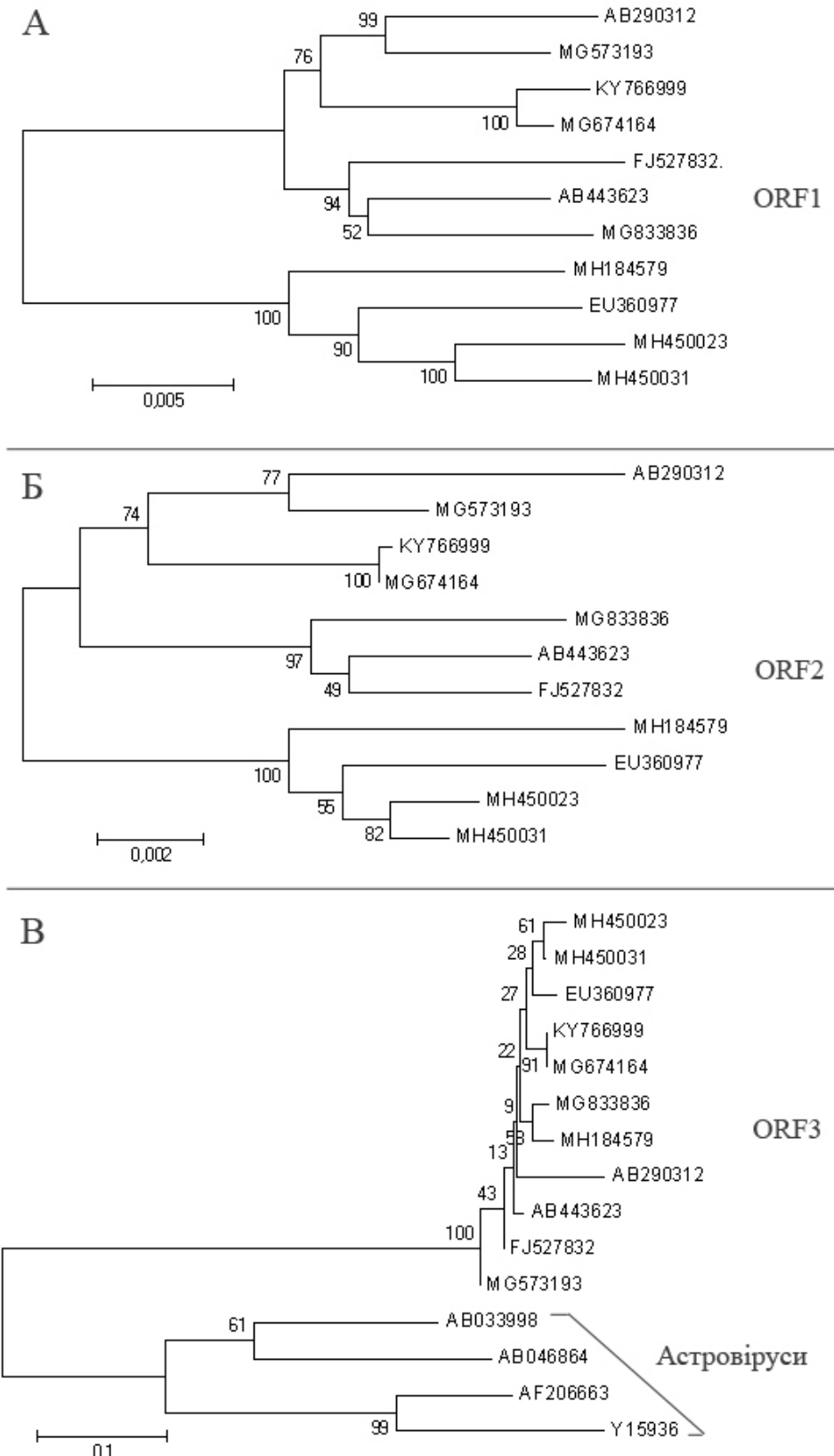


Рис. 2. Філогенетичні відношення між 11 ізолятами ВГЕ-3 свині на основі несинонімічних дистанцій в ORF1 (А), ORF2 (Б), ORF3 (В). Наведено значення бутстреп-аналізу (100 випадкових вибірок) для оцінки достовірності дерева, а також номери ізолятів в GenBank. Дерева побудовано з використанням р-дистанцій та методу приєднання сусідів. АВ033998 — вірус нефриту птахів типу 1, АВ046864 — вірус нефриту птахів типу 2, АF206663 — астровірус індика типу 1, Y15936 — астровірус індика типу 2.

Висновки. 1. У роботі визначено особливості структурної організації трьох відкритих рамок зчитування ORF1–ORF3 вірусу гепатиту Е свині генотипу 3.

2. Позитивне значення коефіцієнта D тесту Таджими для ORF1, ORF2 ВГЕ-3 вказує на дію позитивного відбору на ці відкриті рамки зчитування, а негативне значення для ORF3 вказує на очищаючий відбір, що зменшує її варіабельність.

3. ORF3 характеризується найбільшим числом варіабельних амінокислотних залишків (21,7 %) порівняно з кодуєчими ділянками ORF1, ORF2.

4. Топологія дерева для ORF3 на підставі несинонімічних дистанцій значно відрізняється від структури дерев, побудованих на основі нуклеотидних та синонімічних дистанцій. За допомогою аналізу несинонімічних дистанцій виявлено порядок еволюційних подій в історії ізолятів ВГЕ-3 свині.

Перспективи використання отриманих результатів. Молекулярне моделювання вторинної та третинної структури протеїнів з урахуванням визначеного порядку еволюційних подій в історії ізолятів ВГЕ-3 свині на основі несинонімічних дистанцій в відкритих рамках зчитування ORF1–ORF3 дозволить дослідити вплив тиску відбору на поверхневі властивості та конформацію протеїнів.

Фінансування. Роботу виконано за фінансової підтримки гранта 34.02.01.01Ф Національної академії аграрних наук України.

Список літератури

1. Kamar N. et al. Hepatitis E virus infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014. Vol. 27, No 1. P. 116–138. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00057-13>.
2. Lhomme S. et al. Clinical manifestations, pathogenesis and treatment of Hepatitis E virus infections. *Journal of Clinical Medicine*. 2020. Vol. 9, No 2. P. 331–355. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9020331>.
3. He B. et al. Functional epitopes on hepatitis E virions and recombinant capsids are highly conformation dependent. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2020. Vol. 16, No 7. P. 1554–1564. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1703454>.
4. Doceul V. et al. Zoonotic hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses*. 2016. Vol. 8, No 10. P. 270. DOI: <https://doi.org/10.3390/v8100270>.
5. Hoan N. X. et al. High hepatitis E virus (HEV) positivity among domestic pigs and risk of HEV infection of individuals occupationally exposed to pigs and pork meat in Hanoi, Vietnam. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019. Vol. 6, No 9. P. ofz306. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz306>.
6. Kenney S. P. The current host range of hepatitis E viruses. *Viruses*. 2019. Vol. 11, No 5. P. 452. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11050452>.
7. Goto A. et al. Understanding the genetics of viral drug resistance by integrating clinical data and mining of the scientific literature. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, No 1. P. 14476–14486. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17746-3>.
8. Stern A. et al. The evolutionary pathway to virulence of an RNA virus. *Cell*. 2017. Vol. 169, No 1. P. 35–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.013>.
9. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Japanese Journal of Genetics*. 1991. Vol. 66, No 4. P. 367–386. DOI: <https://doi.org/10.1266/jjg.66.367>.
10. Sueoka N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988. Vol. 85. P. 2653–2657. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2653>.
11. Blazej P. et al. Optimization of mutation pressure in relation to properties of protein-coding sequences in bacterial genomes. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, No 6. P. e0130411. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130411>.
12. Nasrullah I. et al. Genomic analysis of codon usage shows influence of mutation pressure, natural selection, and host features on Marburg virus evolution. *BMC Evolutionary Biology*. 2015. Vol. 15. P. 174. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0456-4>.
13. Dasmeh P. et al. The influence of selection for protein stability on dN/dS estimation. *Genome Biology and Evolution*. 2014. Vol. 6, No 10. P. 2956–2967. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evu223>.
14. Aziz R. et al. Incorporation of transition to transversion ratio and nonsense mutations, improves the estimation of the number of synonymous and non-synonymous sites in codons. *DNA Research*. 2022. Vol. 29, No 4. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/dnares/dsac023>.
15. Valdar W. S. J. Scoring residue conservation. *Proteins*. 2002. Vol. 48. P. 227–241. DOI: <https://doi.org/10.1002/prot.10146>.
16. Tamura K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. Vol. 30, No 12. P. 2725–2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
17. Hall T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
18. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. *Cambridge: Cambridge University Press*, 1983. 367 p. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511623486>.
19. Reyes G. R. et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1990. Vol. 247, No 4948. P. 1335–1339. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2107574>.

20. Кордюм В. А. Эволюция вирусов — попытка нелинейного прогноза. *Биополимеры и клетина*. 2001. Т. 17, № 6. С. 467–486. DOI: <https://doi.org/10.7124/bc.0005D6>.
21. Lukashov V., Goudsmit J. Evolutionary relationships among Astroviridae. *Journal of General Virology*. 2002. Vol. 83. P. 1397–1405. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-6-1397>.

CHARACTERIZATION OF SWINE HEPATITIS E VIRUS GENOTYPE 3 OPEN READING FRAMES

Lymanska O. Yu.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

The goal of this study was a determination of structural organization features of swine hepatitis E virus genotype 3 open reading frames. Gene selective pressure for genes was estimated using the Tajima's neutrality test as implemented in MEGA 6. Shannon entropy was used for diversity detection at each position of open reading frames. Shannon entropy plots representing quantitative diversity at each amino acid (nucleotide) position of 11 swine HEV-3 isolates aligned sequences were calculated by software BioEdit. For phylogenetic analysis, nucleotide distances were analyzed using the neighbour-joining algorithm. Analysis of nucleotide, non-synonymous and synonymous distances was performed using MEGA6. Parameters of mutational analysis for swine hepatitis E virus genotype 3 open reading frames ORF1 – ORF3 were determined using Tajima's neutrality test. Shannon entropy technique revealed that ORF3 is characterized by the most number of diverse amino acid residues (21,7 %) comparing with ORF1, ORF2 coding regions. Analysis of non-synonymous distances in ORF3 allowed to determine an order of evolutionary events in the history of swine HEV-3 isolates. Avian astroviruses strains were used as control because phylogenetic relationships among them correspond to the evolution history of their host species. Tree topology for swine HEV-3 ORF3 based on non-synonymous distances differs from tree structures based on nucleotide and synonymous distances. Positive values of *D* Tajima's factor for ORF1, ORF2 of swine HEV-3 show on operating positive selection onto these coding regions. Negative value of *D* Tajima's factor for ORF3 coding region indicates onto purifying selection

Keywords: positive selection, Tajima's neutrality test, negative selection, Shannon entropy

УДК 619:616.98:578.828:578.2'21:636.22/.28

DOI 10.36016/VM-2023-109-5

СТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ ПРОТЕЇНІВ ВІДКРИТИХ РАМОК ЗЧИТУВАННЯ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Балак О. К.

Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

Лиманська О. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: olgaliman@ukr.net

Метою роботи було визначення особливостей структурної організації протеїнів ORF2 та ORF3 відкритих рамок зчитування вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ). За допомогою програми ATGgr, яка дозволяє ефективно передбачення кодонів ініціації трансляції з точністю до нуклеотида, визначено ORFs для двох ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом. Для передбачення, аналізу вторинної структури та функції протеїнів використовували програму Rhyre2. Для пошуку фрагментів протеїнів в неупорядкованому, або нативно-розгорнутому, стані використовували програму PONDR-FIT. Аналіз амінокислотного складу протеїнів ORF2 та ORF3 ізолятів ВІ ВРХ щодо наявності неполярних, полярних, ароматичних, гідрофобних амінокислотних залишків проведено за допомогою програми PSIPRED. Моделі просторової структури протеїнів отримано за допомогою сервера I-TASSER. Для протеїну ORF3 передбачено 14 % α -спіралей, 17 % β -тяжів, 43 % неупорядкованої структури. Для поліпротеїну Gag, який транскрибується з відкритої рамки зчитування ORF2, визначено 37 % α -спіралей, 0 % β -тяжів, 41 % неупорядкованої структури. Розподіл заряджених амінокислотних залишків характеризує поверхневі властивості протеїнів. Для протеїну ORF2 їхня кількість сягає 23,9 %. Кількість Arg становить 5,2 %, Lys — 8,0 %, Glu — 7,3 %, Asp — 3,4 %. Загальна кількість заряджених амінокислотних залишків ORF3 становить 23,3 %. Кількість Arg становить 12,6 %, Lys —

4,9 %, Glu — 1,9 %, Asp — 3,9 %. З п'яти ORFs для двох ізолятів ВІ ВРХ тільки дві ORFs збігаються за довжиною нуклеотидів (та, отже, відповідних протеїнів). Протеїн ORF3 відноситься до внутрішньо неупорядкованих протеїнів, які не можуть бути стабільно складеними в унікальній тривимірній структурі за фізіологічних умов, а поліпротеїн Gag, який транскрибується з ORF2, — до класу повністю структурованих протеїнів. Вторинна структура обох протеїнів демонструє наявність α спіралей

Ключові слова: поліпротеїн Gag, Lentivirus, Retroviridae

Вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ, bovine immunodeficiency virus, BIV), один з представників родини лентівірусів, вперше був виділений у 1969 році від 8-річної корови з персистентним лімфоцитозом, який супроводжувався виснаженням, слабкістю та ураженням центральної нервової системи [1].

Патогенність ВІ ВРХ досі не підтверджено, і це питання залишається дискусійним. Проте зменшення ваги тварини, зниження молочної продуктивності, гіперплазія лімфатичних вузлів, параліч нижніх кінцівок були асоційовані саме з вірусом імунодефіциту ВРХ [2]. ВІ ВРХ може бути причиною імунних розладів та, як наслідок, опортуністичних бактеріальних інфекцій [3]. Застосування серологічних та молекулярно-генетичних методів дозволило виявити ВІВ-інфікованих тварин у багатьох країнах світу, причому рівень інфікованості коливався від 1,4 до 33 % [4–7]. ВІ ВРХ інфікує, в основному, моноцити, макрофаги та лімфоцити, але також був виявлений і в спермі експериментально інфікованих биків [8].

Повний геном ВІ ВРХ в перший [9] і в останній раз (номер L04974 в GenBank, 2006 р.) було секвеновано у США. Таким чином, з 2007 року по теперішній час не було секвеновано жодного повного геному ізоляту ВІ ВРХ, беручи до уваги щорічне зростання інформації в GenBank щодо повних геномів патогенів тварин.

Геном ВІ ВРХ, який належить до роду лентівірусів сімейства Retroviridae, представлений двома копіями одноланцюгової молекули РНК. Для ізоляту НХВ3 (номер NC_001413 в GenBank, який є ідентичним до M32690) довжина РНК становить 8 482 нуклеотиди (н.). Провірусна ДНК ВІ ВРХ довжиною 8 388 п. н. (ізолят R-29, номер L04974 в GenBank) містить гени *gag*, *pol*, *env*, фланковані довгими кінцевими повторами, а також, як вважають, п'ять коротких відкритих рамок зчитування (ORF), які розташовані у центральному регіоні між генами *pol*, *env*, перекриваються з відповідними ORFs та кодуєть неструктурні регуляторні гени [9]. Генетична та антигенна подібність ВІ ВРХ до вірусів хвороби Джембрана та імунодефіциту людини дозволяє розглядати даний вірус як модель для дослідження патогенезу та оцінки ефективності методів лікування та контролю патогенних лентівірусів [4].

Амінокислотна послідовність детермінує вторинну структуру протеїну, яка, в свою чергу, впливає на формування третинної (просторової) структури. Основними елементами вторинної структури протеїнів є α -спіралі, збагачені аланіном, лейцином, лізином, глутаміном, глутаміновою кислотою, метіоніном, аргініном, та β -тяжи, збагачені валіном, треоніном, фенілаланіном, тирозином [10]. Інформація стосовно вторинної структури протеїнів має важливе практичне значення, враховуючи, наприклад, що вторинна структура вакцинних антигенів — фрагментів повновимірних протеїнів — повинна бути комплементарною до такої у повновимірних молекулах певного збудника.

Первинна структура протеїну визначає також його внутрішню неупорядкованість. Встановлено, що до числа амінокислот, які сприяють неупорядкованості, належать, зокрема гліцин, серін, пролін. Частка неупорядкованих фрагментів в молекулі протеїну, які відіграють певну роль в регуляторних процесах, може бути різною — від послідовності довжиною від декількох амінокислот до повної неупорядкованості [11–13]. Вторинна структура ВІ ВРХ, яка характеризувалася наявністю чотирьох спіральних фрагментів, була прогнозована для протеїну, що утворювався внаслідок антисенсової транскрипції, підтвердженої для представників сімейства Retroviridae [14, 15].

Упакування молекули геномної РНК ретровірусів та її внутрішньомолекулярні взаємодії з протеїнами віріону є необхідними для інфекційності, але до теперішнього часу залишаються недостатньо визначеними конформації протеїнів ВІ ВРХ.

В даній роботі проаналізовано амінокислотний склад протеїнів відкритих рамок зчитування ORF2 та ORF3 двох ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом щодо наявності гідрофобних, полярних,

неполярних, ароматичних амінокислотних залишків, побудовано моделі вторинної та тривимірної структур, а також проаналізовано взаємозв'язок між амінокислотою послідовністю та просторовою структурою протеїнів.

Матеріал і методи. Нуклеотидні послідовності ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом (таксономічний ідентифікатор (txid) 11657), вірусу гепатиту Е (ВГЕ) генотипу 3 свині та кабана (txid 1678143) отримано через пошук в базі даних GenBank Національного центру біотехнологічної інформації (США).

Програму BioEdit (версія 7.2.5) [16] використано для маніпулювання з нуклеотидними та амінокислотними послідовностями.

За допомогою програми ATGpr (<http://www.atgpr.dbcls.jp>), яка дозволяє ефективно передбачення кодонів ініціації трансляції в послідовностях кДНК та з точністю до нуклеотида визначати відкриті рамки зчитування (ORFs), для двох ізолятів вірусу імунодефіциту ВРХ з повним геномом (NC_001413, L04974) визначено по п'ять ORFs (табл. 1).

Таблиця 1 — Визначені відкриті рамки зчитування (ORFs) для двох ізолятів вірусу імунодефіциту ВРХ з повним геномом. Підкреслено поліпротеїн Gag (довжиною 476 амінокислотних залишків (а. з.), який трансклюється з ORF2, та протеїн (довжиною 103 а. з.), який трансклюється з ORF3.

Ізолят ВІ ВРХ (номер в GenBank)	Положення на геномі	Розмір протеїну, а. з.	Імовірність існування
NC_001413	5415-8126	904	0,34
	316-1743	<u>476</u>	0,33
	5228-5536	<u>103</u>	0,27
	6063-8126	688	0,24
	3816-4739	308	0,21
L04974	5792-8034	761	0,35
	5413-5700	96	0,32
	314-1741	<u>476</u>	0,31
	5226-5531	<u>102</u>	0,27
	1579-4104	842	0,20

Аналіз амінокислотного складу ORF2–ORF3 ізолятів ВІ ВРХ щодо наявності неполярних, полярних, ароматичних, гідрофобних амінокислотних залишків проведено за допомогою програми PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).

Третинну структуру, що передбачено, протеїнів ORF2 та ORF3 побудовано за допомогою сервера I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement, <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) за стандартних параметрів [17].

Для пошуку ослаблених ділянок в протеїнах побудовано графіки внутрішнього безладу для протеїнів ORF3 та ORF2 довжиною 103 та 476 а. з. за допомогою програми PONDR-FIT (<http://original.disprot.org/pondr-fit.php>), яка дозволяє передбачати нативно-розгорнуті ділянки поліпептидного ланцюга. В цій програмі для складання передбачення використовуються набори протеїнів з бази протеїнових структур PDB, в яких методами рентгенівського розсіювання, ЯМР, кругового дихроїзму визначено неструктуровані ділянки протеїнів. Також окремо оцінюється вплив близького розташування N- та C-кінців поліпептидного ланцюга.

Для передбачення, аналізу вторинної структури та функції протеїнів використовували програму Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) [18].

Результати досліджень. Як контроль точності визначення відкритих рамок зчитування використано ВГЕ генотипу 3 свині та кабана. Кількість та позиції теоретично визначених нами ORFs та відомих з літератури експериментально визначених ORFs збігаються, що свідчить про надійність програми ATGpr, яку застосували.

Для двох відкритих рамок зчитування, які збігаються для двох ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом (NC_001413, L04974), довжиною 103 а. з. (рис. 1) та 476 а. з., проведено біоінформатичний аналіз амінокислотного складу щодо наявності гідрофобних, полярних, неполярних, ароматичних а. з. (табл. 2).

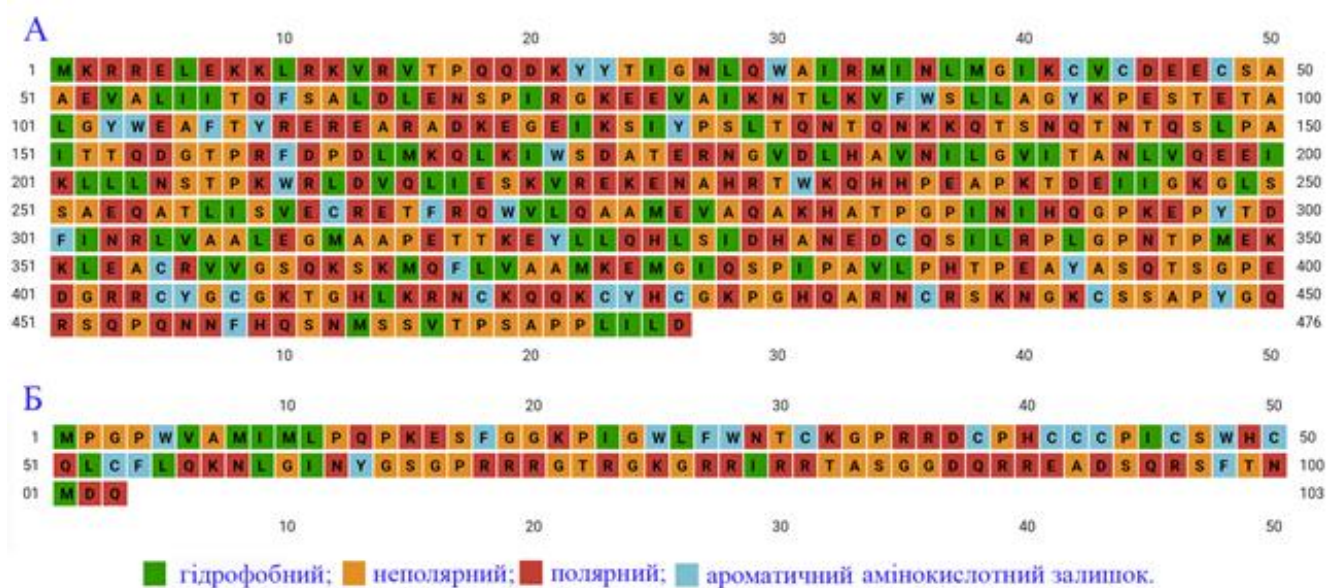


Рис. 1. Аналіз амінокислотного складу протеїнів ORF2 протеїну Gag (А) та ORF3 (Б) ізоляту NC_001413 ВІ ВРХ за допомогою програми PSIPRED. Представлено неполярні, полярні, ароматичні, гідрофобні амінокислотні залишки. R — Arg, K — Lys, E — Glu, D — Asp, C — Cys.

Таблиця 2 — Характеристика первинної структури протеїнів, що транслюються з відкритих рамок зчитування ORF3 та ORF2, довжиною 103/102 та 476 а.з. ізолятів вірусу імунодефіциту ВРХ з повним геномом

Відкрита рамка зчитування/протеїн	Амінокислотні залишки			
	полярні, %	неполярні, %	гідрофобні, %	ароматичні, %
ORF3 NC_001413, 103 а. з.	34,95	33,98	14,56	16,51
ORF3 L04974, 102 а. з.	36,89	31,07	15,53	16,51
ORF2 NC_001413, 476 а. з.	38,66	32,35	20,59	8,40
ORF2 L04974, 476 а.а.	38,66	32,14	20,80	8,40

Для чотирьох протеїнів, що транслюються з ORFs ізолятів ВІ ВРХ NC_001413 (довжиною 103 та 476 а. з.) (рис. 2) та L04974 (довжиною 102 та 476 а. з.), згенеровано та візуалізовано тривимірні структури. Протеїни довжиною 103 а. з. характеризуються значною еластичністю, в той час як протеїни довжиною 476 а. з. мають подібну до невизначеного клубка структуру.

На сервері I-TASSER структурні 3D-моделі створюються шляхом повторної зборки фрагментів, зібраних зі зв'язаних моделей, в яких біологічний сенс кінцевого протеїна впливає із збігання моделі структури з відомими протеїнами в функціональних базах даних.

Розподіл заряджених амінокислотних залишків характеризує поверхневі властивості протеїнів. Для протеїна ORF2 їхня кількість становить 23,9 %. Кількість Arg становить 5,2 %, Lys — 8,0 %, Glu — 7,3 %, Asp — 3,4 %.

Загальна кількість заряджених амінокислотних залишків ORF3 становить 23,3 %. Кількість Arg становить 12,6 %, Lys — 4,9 %, Glu — 1,9 %, Asp — 3,9 %.

З побудованих моделей третинної (рис. 2) та вторинної структури протеїнів, що транслюються з ORF3 ВІ ВРХ (рис. 3) та ORF2 (Gag) (рис. 4), визначено, що поліпротеїн Gag містить 14 α -спіралей, а протеїн ORF3 — 1 α -спіраль.

Протеїни капсиду лентівірусів складаються з N-термінальної області з семи α -спіралей та C-термінального домену, який утворено чотирма α -спіралями [19].

Найбільш вивченим лентівірусом є вірус імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), збудник СНІД. Ретровірусний поліпротеїн Gag, зокрема, бере участь в синтезі вірусних часток, які виходять з плазматичної мембрани інфікованих клітин [20]. В вірусній реплікації та інфекційності ВІЛ-1 задіяно такі домени поліпротеїну Gag як матрикс (p17), капсид (p24), нуклеокапсид (p7), p6, SP1, SP2 [21].

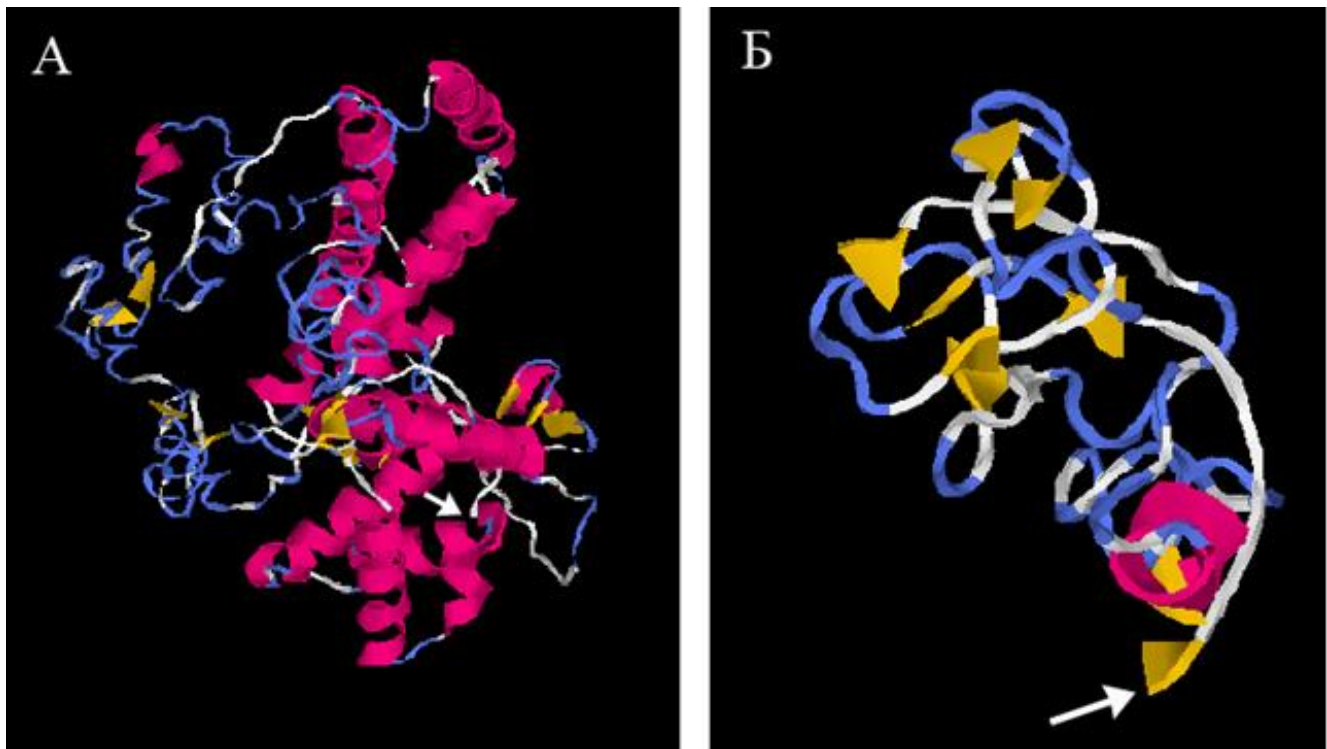


Рис. 2. Модель просторової структури поліпротеїну Gag, що транслюється з відкритої рамки зчитування ORF2 (довжиною 476 а. з.), (А) та протеїну ORF3 (довжиною 103 а. з.) (Б) ізоляту NC_001413 ВІ ВРХ. Аналіз проведено з використанням серверу I-TASSER. Стрілки вказують на N-кінці протеїнів, які є критичними для міжмолекулярної взаємодії.



Рис. 3. Вторинна структура протеїну відкритої рамки зчитування ORF3 довжиною 103 а. з. ізоляту ВІ ВРХ з повним геномом NC_001413, яку отримано за допомогою програми Phyre2.

Для протеїну, що транслюється з ORF3 ВІ ВРХ, за допомогою програми Phyre2 передбачено 14 % α -спіралей, 17 % β -тяжів, 43 % неупорядкованої структури (рис. 3). Для поліпротеїну Gag, який транслюється з відкритої рамки зчитування ORF2 ВІ ВРХ, визначено 37 % α -спіралей, 0 % β -тяжів, 41 % неупорядкованої структури (рис. 4).

Отримані результати показують, що протеїни ORF2 та ORF3 ВІ ВРХ є гетерогенними структурами та містять упорядковані ділянки з варіабельною конформаційною стабільністю і внутрішньо неупорядковані фрагменти, які не мають упорядковану структуру.

Додатково структуру протеїнів ORF3 та ORF2 ВІ ВРХ довжиною 103 та 476 а. з. охарактеризовано за допомогою профілів внутрішнього безладу (імовірність амінокислотного залишку перебувати в неупорядкованому, або нативно-розгорнутому, стані) (рис. 5).

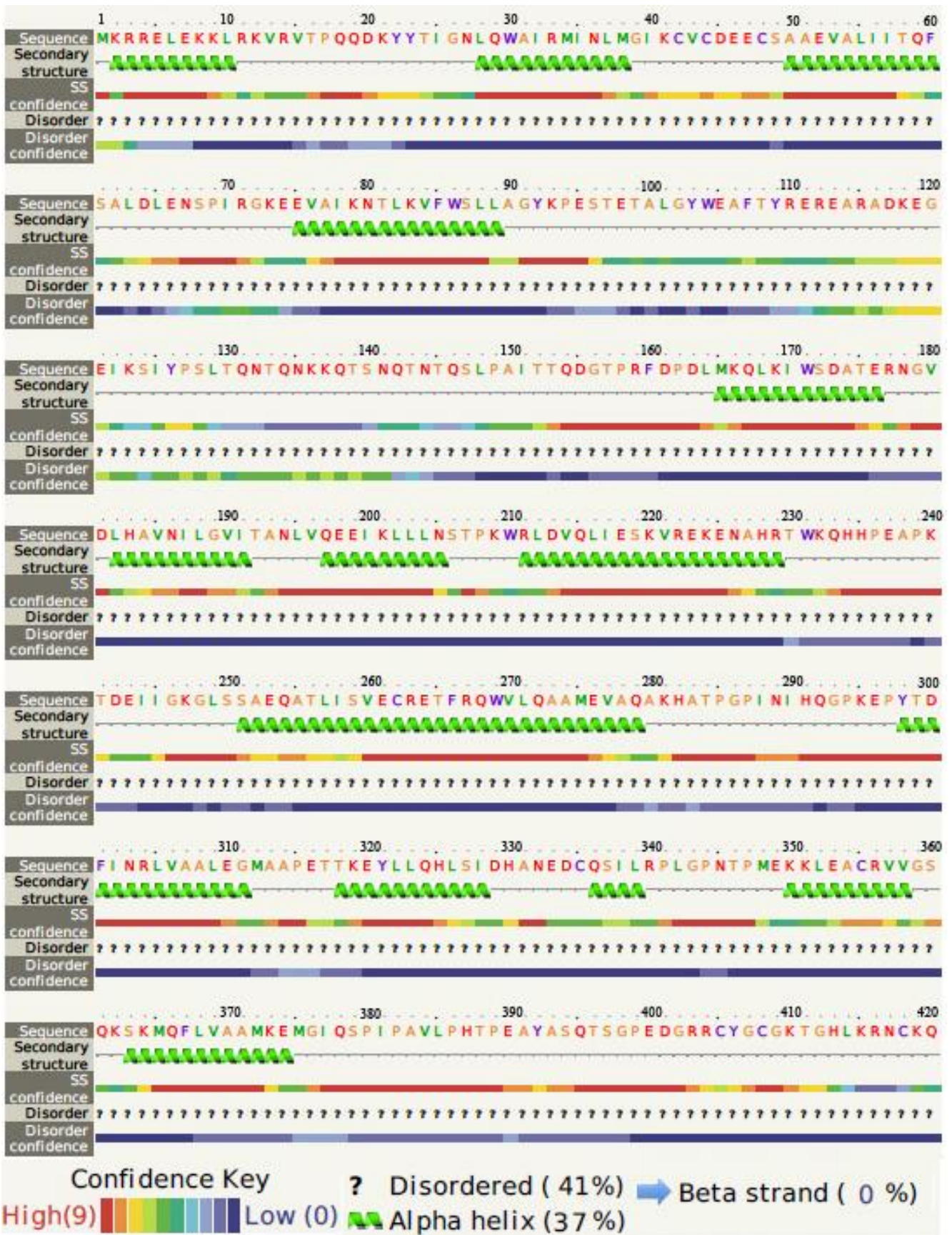


Рис. 4. Вторинна структура поліпротеїну Gag, який транслюється з відкритої рамки читування ORF2, довжиною 476 а. з. ізоляту ВІВРХ з повним геномом NC_001413, що отримано за допомогою програми Phyre2 (показано фрагмент 1–420 а. з.).

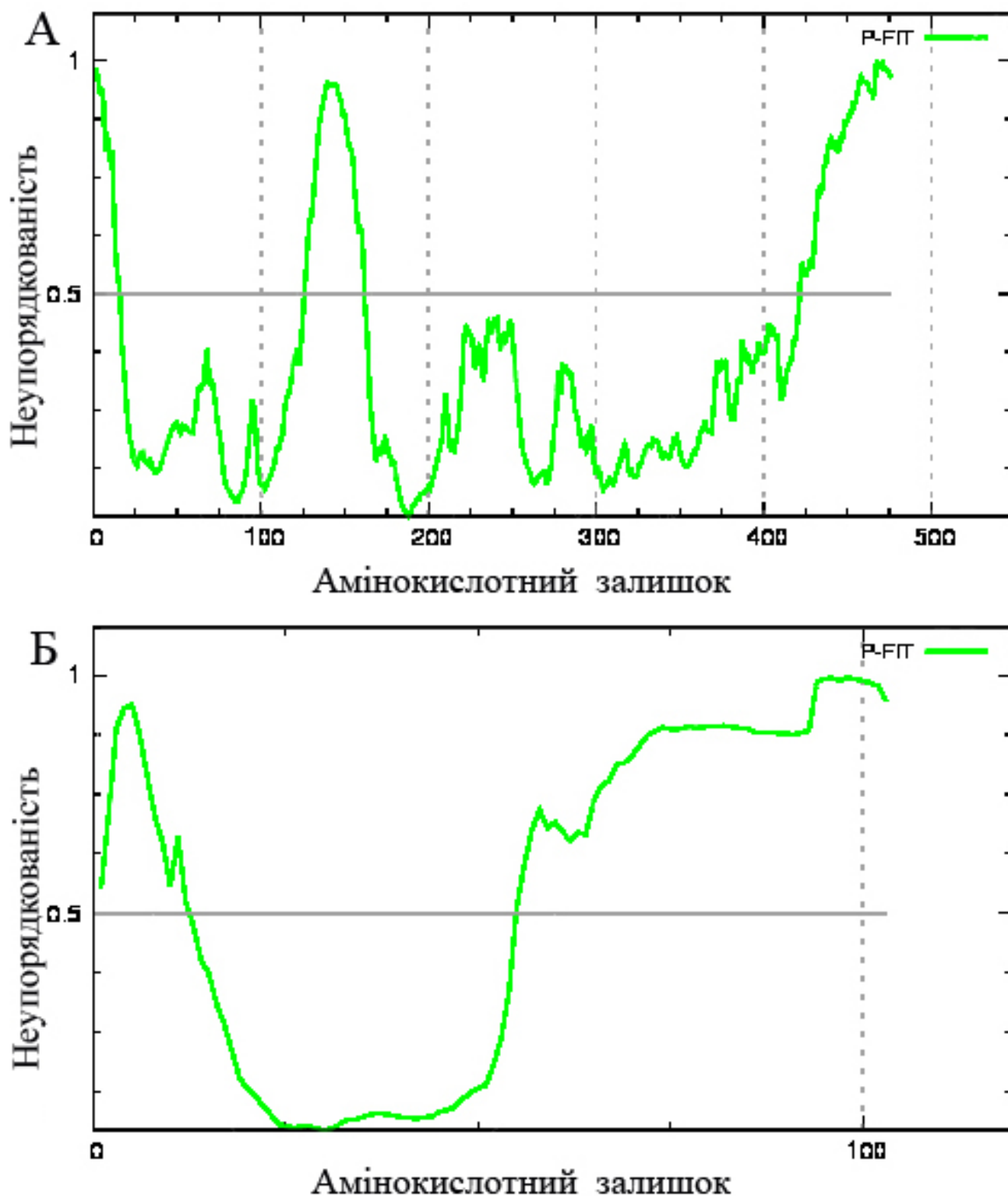


Рис. 5. Графік внутрішнього безладу для поліпротеїну Gag, який транслюється з ORF2 (довжиною 476 а. з.) (А) та протеїну ORF3 (довжиною 103 а. з.) (Б) ізоляту NC_001413 ВІ ВРХ. Імовірність безладу розраховано за допомогою програми DisProt (версія програми PONDR-FIT), в якій графіки представляють профілі внутрішнього безладу. Значення порогу 0,5 відрізняє упорядковану та неупорядковану області вздовж поліпептидного ланцюга (обмежено пунктирними лініями). Області понад пороговим значенням вважаються неупорядкованими.

Висновки. 1. В роботі визначено особливості структурної організації протеїнів двох відкритих рамок зчитування ORF2 (поліпротеїну Gag) та ORF3 вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ).

2. Аналізуючи отримані дані, можна зробити наступні висновки. Протеїн ORF3 відноситься до внутрішньо неупорядкованих протеїнів, які не можуть бути стабільно складеними в унікальній тривимірній структурі за фізіологічних умов. Поліпротеїн Gag, який транскрибується з ORF2, відноситься до класу повністю структурованих протеїнів. Вторинна структура обох протеїнів демонструє наявність α -спіралі: 14 % α -спіралей для ORF3 та 37 % α -спіралей для поліпротеїну Gag.

3. Для оцінки точності передбачення стабільних та неупорядкованих частин поліпептидного ланцюга протеїнів результати роботи програми PONDR-FIT уявляється доцільним порівняти з результатами аналогічних програм.

4. З визначених п'яти ORFs для двох ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом (NC_001413 та L04974) тільки дві ORFs збігаються за довжиною нуклеотидів (та, отже, відповідних протеїнів), що підіймає низку запитань щодо наведених в базі даних GenBank відомостей секвенсів зазначених ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом.

Перспективи використання отриманих результатів. Відкрита рамка зчитування фактору інфекційності віріону Vif (virion infectivity factor) є консервативною для більшості лентівірусів. Молекули Vif приймають участь у реплікації вірусу за допомогою інактивування антивірусних факторів хазяїна, зокрема, цитидин деамінази АРОВЕС3 [22].

За однакової кількості Vif ВІ ВРХ, Vif ВІЛ, Vif вірус імунодефіциту мавпи (SIV, BIM) при індивідуальній коекспресії з ВІЛ-1 синтез інфекційних віріонів ВІЛ-1 в присутності Vif ВІ ВРХ зменшувався приблизно у 8 разів.

Беручи до уваги, що Vif ВІ ВРХ є потенційним інгібітором реплікації ВІЛ-1, отримані результати може бути використано для молекулярного докінгу комплексу поліпротеїну Gag з Vif ВІ ВРХ, тобто для передбачення найвигіднішої конформації такого комплексу.

Фінансування. Роботу виконано за фінансової підтримки гранту 34.02.01.01Ф Національної академії аграрних наук України.

Список літератури

1. Malmquist W. A., Van der Maaten M. J., Boothe A. D. Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Research*. 1969. Vol. 29, No 1. P. 188–200. URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/29/1/188/477078/Isolation-Immuno-diffusion-Immunofluorescence-and>.
2. Passos-Castilho A. M., Marchand C., Archambault D. B23/nucleophosmin interacts with bovine immunodeficiency virus Rev protein and facilitates viral replication. *Virology*. 2018. Vol. 515. P. 158–164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.021>.
3. Zhang S. et al. Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1997. Vol. 4. P. 232–235. DOI: <https://doi.org/10.1128/cdli.4.2.232-235.1997>.
4. Bhatia S., Patil S., Sood R. Bovine immunodeficiency virus: a lentiviral infection. *Indian Journal of Virology*. 2013. Vol. 24, No 3. P. 332–341. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0165-9>.
5. Rodrigues A. P. S. et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus (BIV) in bovines from the state of Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 2019. Vol. 71, No 2. P. 711–714. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10495>.
6. Gonzalez-Fernandez V. D. et al. First evidence of bovine immunodeficiency virus infection in Mexican cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2020. Vol. 67, No 5. P. 1768–1775. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13530>.
7. Keshavarz H., Mohammadi A., Morovati S. Evidence of bovine immunodeficiency virus: a molecular survey in water buffalo populations of Iran. *Veterinary Medicine and Science*. 2022. Vol. 8. P. 2167–2172. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.872>.
8. Gradil C. M. et al. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls. *Veterinary Medicine*. 1999. Vol. 70. P. 21–31. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00130-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00130-3).
9. Garvey K. J. et al. Nucleotide sequences and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology*. 1990. Vol. 175, No 2. P. 391–409. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90424-p](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90424-p).
10. Chou P. Y., Fasman G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 1978. Vol. 47. P. 45–48. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470122921.ch2>.
11. Tompa P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002. Vol. 27, No 10. P. 527–533. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02169-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02169-2).

12. Uversky V. Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins. *FEBS Journal*. 2015. Vol. 282, No 7. P. 1182–1189. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.13202>.
13. Brocca S. et al. Liquid-liquid phase separation by intrinsically disordered protein regions of viruses: roles in viral life cycle and control of virus-host interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, No 23. P. 9045–9075. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21239045>.
14. Liu B. et al. Evidence for the antisense transcription in the proviral R29-127 strain of bovine immunodeficiency virus. *Sinica*. 2015. Vol. 30, No 3. P. 224–227. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3559-6>.
15. Rasmussen M. H. et al. Antisense transcription in gammaretroviruses as a mechanism of insertional activation of host genes. *Journal of Virology*. 2010. Vol. 84, No 8. P. 3780–3788. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02088-09>.
16. Hall T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
17. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43, No W1. P. W174–W181. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>.
18. Kelley L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015. Vol. 10, No 6. P. 846–858. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
19. Ovejero C. A., González S. A., Affranchino J. L. The conserved Tyr176/Leu177 motif in the α -helix 9 of the feline immunodeficiency virus capsid protein is critical for Gag particle assembly. *Viruses*. 2019. Vol. 11, No 9. P. 816. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11090816>.
20. Garbitt-Hirst R., Kenney S. P., Parent L. J. Genetic evidence for a connection between Rous sarcoma virus Gag nuclear trafficking and genomic RNA packaging. *Journal of Virology*. 2009. Vol. 83, No 13. P. 6790–6797. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00101-09>.
21. Marie V., Gordon M. L. The HIV-1 Gag protein displays extensive functional and structural roles in virus replication and infectivity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, No 14. P. 7569. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23147569>.
22. Zheng W. et al. Conserved interaction of lentiviral vif molecules with HIV-1 Gag and differential effects of species-specific vif on virus production. *Journal of Virology*. 2017. Vol. 91, No 7. P. e00064-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00064-17>.

STRUCTURAL ANALYSIS OF OPEN READING FRAMES OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS PROTEINS

Balak O. K.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Lymanska O. Yu.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

The goal of this study was determining the structural organization peculiarities of the ORF2 and ORF3 proteins of the bovine immunodeficiency virus (BIV). Five ORFs were determined for two BIV isolates with complete genome using the ATGpr software, which permits effective prediction of translation initiation codons with nucleotide accuracy. Phyre2 software was used to predict, analyze the secondary structure and function of proteins. PONDR-FIT software was used to search for protein fragments in a disordered or natively unfolded state. Analysis of the amino acid composition of ORF2 and ORF3 proteins of BIV isolates regarding the presence of nonpolar, polar, aromatic, and hydrophobic amino acid residues was carried out using PSIPRED software. Models of the 3D-structure of proteins were obtained by I-TASSER server. 14% of α -helices, 17% of β -strands and 43% of disordered structure are predicted for the ORF3 protein. 37% of α -helices, 0% of β -strands, and 41% of disordered structure were determined for Gag polyprotein, which is translated from ORF2. The distribution of charged amino acid residues characterizes the surface properties of proteins. Their number reaches 23.9% for ORF2 protein. The amount of Arg is 5.2%, Lys — 8.0%, Glu — 7.3%, Asp — 3.4%. The total number of charged amino acid residues of ORF3 is 23.3%. The number of Arg is 12.6%, Lys — 4.9%, Glu — 1.9%, Asp — 3.9%. Only two ORFs of five ones coincide in nucleotide length (and, therefore, in length of corresponding proteins) for the two BIV isolates. The ORF3 protein belongs to the intrinsically disordered proteins that cannot be stably folded into a unique three-dimensional structure under physiological conditions, and the Gag polyprotein, which is translated from ORF2, belongs to the class of fully structured proteins. The secondary structure of both proteins shows the presence of α -helices

Keywords: polyprotein Gag, Lentivirus, Retroviridae

ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ГЕНІВ ТА ПРОТЕЇНІВ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Балак О. К.

Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

Лиманська О. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: olgaliman@ukr.net

Метою роботи було визначення дії природного відбору на вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ) через ідентифікацію поліморфізмів шляхом порівняння низки генів, відкритих рамок зчитування та протеїнів і аналіз впливу несинонімічних замін в протеїні Vif ізолятів ВІ ВРХ на конформаційні параметри Vif. Тиск відбору на гени оцінено за допомогою тесту Таджими, а також визначення співвідношення коефіцієнтів несинонімічних замін (K_a) до синонімічних (K_s) K_a/K_s . Коефіцієнти K_a та K_s , їхнє співвідношення (K_a/K_s) розраховано на основі вирівнювань амінокислотних та нуклеотидних послідовностей гена vif ізолятів ВІ ВРХ. Відношення частот несинонімічних (dN) до синонімічних (dS) замін на нуклеотидний сайт dN/dS для оцінки впливу відбору на ген vif розраховували з використанням методу SLAC на сервері Datamonkey. Кількість водневих зв'язків, α -спіралей, β -шарів, β -поворотів для третинних структур протеїнів визначено за допомогою сервера I-TASSER. Ідентифіковано гени, відкриті рамки зчитування (ORF) та регуляторну область U3 геному ВІ ВРХ, які перебувають під дією відбору. Гени gag, pol, s, vif, відкриті рамки зчитування ORF W та ORF Y перебувають під тиском негативного (очищуючого) відбору. На ген env та регуляторну область U3 діє позитивний відбір. Аналіз ентропії Шеннона (піків, які є специфічними до позицій амінокислотних залишків), що інтерпретують як поліморфізми, дозволив виявити 16, 8 та 4 несинонімічних замін для протеїнів Pol, Gag, Vif ВІ ВРХ відповідно. Через аналіз впливу чотирьох несинонімічних замін в протеїні Vif на конформаційні параметри Vif двох ізолятів ВІ ВРХ визначено істотні зміни числа водневих зв'язків, α -спіралей, β -шарів, β -поворотів. Показано різнонаправлений вплив відбору на гени ВІ ВРХ

Ключові слова: позитивний відбір, молекулярна еволюція, амінокислотна заміна, одноступінчастий поліморфізм

Вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ, bovine immunodeficiency virus, BIV) — лентівірус сімейства Retroviridae — вперше був ізольований у 1969 році, і з цього часу серопозитивних тварин виявляли у багатьох країнах світу. Вірус є причиною прогресуючих та персистентних інфекцій ВРХ, втрати ваги та зниження надоїв молока, виникнення вторинних інфекцій. Аналіз гематологічного профілю BIV-інфікованих тварин свідчить про лімфаденопатію, лімфоцитоз, дисфункцію нейтрофілів та моноцитів. Антигенно та генетично ВІ ВРХ є близьким до вірусів імунодефіциту людини та мавпи та, отже, може бути моделлю при вивченні інших ретровірусів [1].

Одним з основних факторів еволюції вірусів є природний відбір, який підтримує молекулярну адаптацію, тобто виникнення, накопичення та поширення корисних для реплікації та трансмісії мікроорганізмів мутацій (позитивний відбір), або направлений на елімінацію несприятливих генетичних змін (негативний, або очищуючий, відбір) [2].

Найчастішою молекулярно-генетичною подією в ході молекулярної еволюції є нуклеотидні заміни: синонімічні заміни (нейтральні мутації), які змінюють первинну структуру гена, але не підпадають під дію відбору на рівні білків, та несинонімічні заміни, результатом яких є зміни на всіх рівнях організації білка. Зміна первинної структури білка може впливати на конформаційні параметри молекули (наприклад, кількість α -спіралей та β -шарів), упакування просторової структури, функціональні та фізико-хімічні властивості білка.

Для дослідження молекулярної еволюції генів та відхилення від моделі нейтральної еволюції [3] розроблено низку статистичних методів [4], призначених як для порівняння коротких

послідовностей (наприклад, тест Таджими [5]), так і для аналізу великих масивів даних у масштабі геномів (наприклад, метод оцінювання відносного часу дивергенції — RelTime (relative time) метод [6]).

Для вивчення механізму еволюції білків важливим є питання дії відбору на ті чи інші заміни амінокислот, які можуть бути консервативними або радикальними залежно від їх впливу на фізико-хімічні властивості амінокислоти (зокрема, заряд, полярність). Радикальна заміна веде до значної зміни структури та функції протеїну. Цей термін є вельми відносним, оскільки існує велика кількість визначень радикальних замін, які суперечать одне одному.

Для визначення тиску відбору застосовують співвідношення швидкостей радикальних та консервативних амінокислотних замін [7, 8], яке є прямо пропорційним співвідношенню частот несинонімічних (dN_a) та синонімічних (dN_s) нуклеотидних замін, що до теперішнього часу широко використовують для визначення типу відбору при вивченні еволюції генів, кодуєючих білки [9].

Стимування багатьох інфекційних захворювань ускладнено виключною здатністю патогенів адаптуватися шляхом еволюційних змін [10]. Так, розвиток резистентності до противірусних препаратів вірусу імунodefіциту людини є прикладом паралельної еволюції [11]. Великий розмір популяцій та висока швидкість мутування багатьох патогенів, в тому числі, ретровірусів, дозволяє їм ефективно уникати тиску імунної системи [12].

GenBank містить інформацію щодо 3 ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом (нуклеотидні послідовності двох з яких (NC_001413 та M32690) є ідентичними), відомості щодо яких надано до цієї бази даних з 1990 по 2006 рік. Відсутність нових повногеномних сиквенсів ізолятів ВІ ВРХ спонукали автора порівняти існуючі біомолекули ізолятів цього вірусу та спробувати відповісти на запитання, чому за останні понад 15 років в GenBank не депоновано жоден ізолят ВІ ВРХ з повним геномом.

В даній роботі визначено дію природного відбору на ВІ ВРХ через ідентифікацію мутацій шляхом порівняння послідовностей низки генів, відкритих рамок зчитування та протеїнів та проведено порівняльний аналіз впливу несинонімічних замін в протеїні Vif ізолятів ВІ ВРХ на конформаційні параметри цієї молекули.

Матеріали і методи. Нуклеотидні послідовності ізолятів ВІ ВРХ з повним геномом (таксономічний ідентифікатор (txid) 11657) отримано з бази даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Вирівнювання послідовностей ВІ ВРХ проведено за допомогою програми Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (версія 6.06) [13]. Програму BioEdit (версія 7.2.5) [14] використано для маніпулювання з нуклеотидними та амінокислотними послідовностями, мутаційного аналізу протеїнів, побудови графіків ентропії Шеннона. Тиск відбору на гени оцінено через проведення тесту Таджими на нейтральність, який вбудовано в програму MEGA 6.

Коефіцієнти несинонімічних замін (K_a) та синонімічних замін (K_s), їхнє співвідношення (K_a/K_s) розраховано на основі вирівнювань амінокислотних та нуклеотидних послідовностей гена *vif* ізолятів ВІ ВРХ. Для цього спочатку обчислено загальне число несинонімічних відмінностей для пари послідовностей, що порівнюють, - реальних N_a (реальн.) та теоретично можливих N_a (теор.) несинонімічних замін на даному фрагменті. K_a дорівнює співвідношенню N_a (реальн.)/ N_a (теор.). Таким же чином визначено K_s .

Крім того, додатково для порівняння гомологічних послідовностей гена ізолятів ВІ ВРХ розраховували відношення частот несинонімічних (dN) до синонімічних (dS) замін на нуклеотидний сайт dN/dS . $dN/dS > 1$ вказує на позитивний відбір, $dN/dS \approx 1$ — немає відбору, тобто нейтральна еволюція, $dN/dS < 1$ — очищуючий відбір. Оцінку впливу відбору на ген *vif/vif* проводили з використанням методу SLAC (single likelihood ancestor counting) на сервері Datamonkey (www.datamonkey.org) [15].

Нуклеотидні послідовності генів та відкритих рамок зчитування ВІ ВРХ (ORF, послідовностей нуклеотидів, які не мають стоп-кодону після стартового кодону (сайту ініціації трансляції) та потенційно можуть кодувати протеїни) отримано з повновимірних геномів 4 ізолятів ВІ ВРХ.

Кількість водневих зв'язків, α -спіралей, β -шарів, β -поворотів для третинних структур протеїнів визначено за допомогою сервера I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement, <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) за стандартних параметрів [16].

Результати роботи. Проведеним пошуком по базі даних GenBank визначено наступна кількість повногеномних сиквенсів для лентівірусів за період з 01.01.2006 р. по 28.09.2023 р.: вірус артриту-енцефаліту кіз — 65, вірус інфекційної анемії коней — 32, вірус вісна-маєді — 4, вірус хвороби Джембрана — 0, ВІ ВРХ — 0.

За час 01.01.1990 р. по 31.12.2006 р. до GenBank депоновано 2 варіанти одного і того ж ізоляту ВІ ВРХ (НХВ3) з повним геномом, нуклеотидні послідовності яких збігаються, за різними номерами (NC_001413 та M32690). Програми для біоінформатичного аналізу, наприклад, SLAC на сервері Datamonkey, враховують тільки один з зазначених вище варіантів ВІ ВРХ.

За допомогою аналізу ентропії Шеннона ідентифіковано 4, 8 та 16 амінокислотних варіабельних сайтів для протеїнів Vif, Gag та Pol ВІ ВРХ відповідно (рис. 1).

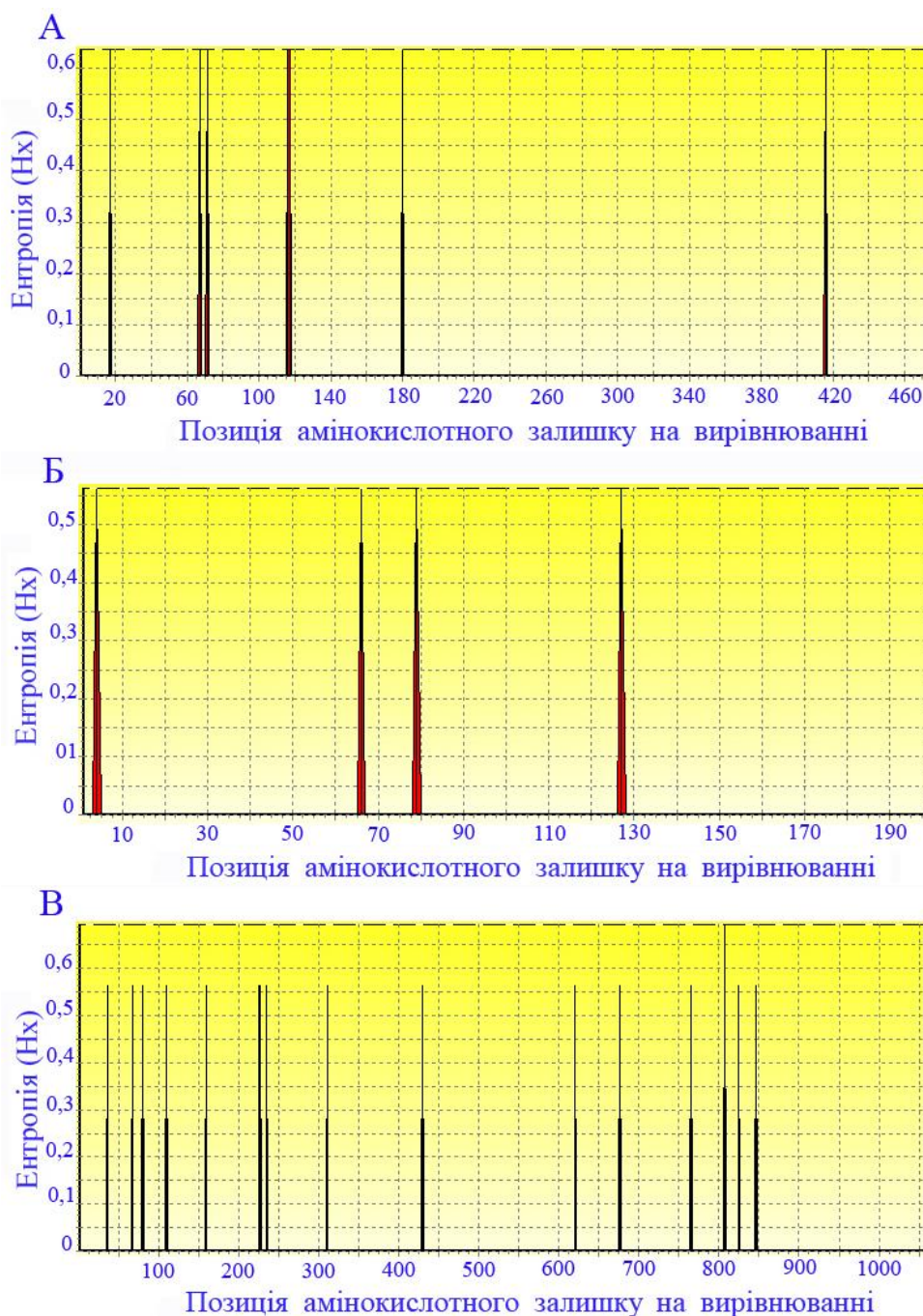


Рис. 1. Графік ентропії Шеннона для протеїнів, які кодують гени ВІ ВРХ *gag* (А), *vif* (Б) та *pol* (В). Міру мінливості кожного сайту амінокислотної послідовності отримано на підставі множинного вирівнювання нуклеотидних послідовностей та наступної трансляції для 4 ізолятів ВІ ВРХ.

Варіабельність розраховано як ентропію для позиції кожного амінокислотного залишка (а.з.). Відносна кількість варіабельних сайтів для протеїнів Pol, Gag, Env, Vif ВІ ВРХ та протеїнів, що транскрибуються з відкритих рамок зчитування, становила: Pol — 1.5 % (16/1056), Gag — 1.6 % (8/476), Vif — 2.0 % (4/198), Env — 2.6 % (24/904), ORF Y — 2.5 % (2/80), ORF W — 3.6 % (2/55).

Аналіз ентропії Шеннона, а саме, піків, які є специфічними до позицій а.з., що інтерпретують як поліморфізми, показав, що в протеомі ВІ ВРХ найменшою варіабельністю характеризується протеїн Pol, а найбільшою — протеїн ORF W.

Найбільш вивченим ретровірусом є вірус імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), для якого встановлено, що протеїн Vif (virus infectivity factor) протидіє ферментам родини АРОВЕС. Ці ензими призводять до мутацій геному ВІЛ через дезамінування нуклеотидів. Протеїн Vif блокує включення АРОВЕС3F та АРОВЕС3G при синтезі віріону. Внаслідок цього процесу утворюються гіпермутовані та нежиттєздатні вірусні геноми [17].

Одним з методів виявлення дії відбору на рівні послідовностей є визначення співвідношення коефіцієнту несинонімічних заміни (K_a) до такого синонімічних заміни (K_s).

Значення $K_a/K_s < 1$ свідчить про дію переважно очищувачого відбору, при якому значимі мутації є шкідливими. $K_a/K_s > 1$ вказує на дію позитивного відбору.

На основі вирівнювань амінокислотних та нуклеотидних послідовностей гена *vif* ізолятів ВІ ВРХ та їхніх графіків ентропії Шеннона визначено кількість несинонімічних (ведуть до заміни амінокислоти) та синонімічних (не ведуть до заміни амінокислоти) заміни та розраховано співвідношення K_a/K_s . Для протеїну Vif ізоляту L04972 порівняно з ізолятом NC_001413 виявлено дві несинонімічні заміни а.з. (N_a (реальн.) дорівнює 2), одна з яких (Т (Р), позиція 4 табл. 1) відповідає заміні неполярного а.з. (Т) на інший також неполярний а.з. (Р), а друга (Т (І), позиція 66 табл. 1) — заміні неполярного а.з. (Т) на гідрофобний а.з. (І).

Полярність а.з. та гідрофобні взаємодії відіграють важливу роль при формуванні третинної структури протеїну. Неполярні а.з. формують ядро протеїнової глобули, що уникає контактів з молекулами води. Зазначені дві заміни двох неполярних а.з. на неполярний та гідрофобний а.з. ведуть до суттєвого зменшення числа водневих зв'язків молекули Vif ізоляту L04972 порівняно з таким ізоляту NC_001413 (табл. 2).

Число теоретично можливих несинонімічних заміни N_a (теор.) становило 12, K_a — 0,17. Число синонімічних заміни N_s (реальн.) становило 3, N_s (теор.) — 7, K_s — 0,43. Відношення K_a/K_s становило 0,39, що свідчить про дію очищувачого відбору (рис. 2) на протеїн Vif ізоляту L04972.

Відбір не діє на синонімічні заміни, і патоген (в даному випадку ВІ ВРХ) з синонімічною заміною неможливо відрізнити від патогена з відсутньою синонімічною заміною без аналізу його геному. Вони відбуваються тільки через випадкові причини, і такий процес називається генетичним дрейфом.

Якщо несинонімічні заміни відбуваються рідше порівняно з синонімічними, як у випадку Vif ізоляту L04972, імовірність закріпитися для несинонімічної заміни нижче, ніж у синонімічної. Іншими словами, серед несинонімічних мутацій існують шкідливі, і негативний відбір елімінує такі мутації.

Для протеїну Vif ізоляту L04974 порівняно з ізолятом NC_001413 виявлено також дві несинонімічні заміни а.з. (Е (К), позиція 79 та Т (А) позиція 127 табл. 1), які відповідають заміні неполярних а.з. (Е та Т) на інші також неполярні а.з. (К та А). Зазначені дві заміни двох неполярних а.з. на два неполярні а.з. ведуть до істотних змін конформаційних параметрів молекули Vif ізоляту L04974 (табл. 2), а саме, до збільшення числа водневих зв'язків, α -спіралей, β -поворотів.

Число теоретично можливих несинонімічних заміни N_a (теор.) становило 10, K_a — 0,20. Синонімічні заміни не виявлено, що вказує на відсутність генетичного дрейфа. Отже, відношення $K_a/K_s > 1$ (як і відношення $dN/dS > 1$), що свідчить про дію позитивного відбору (рис. 2) на протеїн Vif ізоляту L04974.

Якщо несинонімічні заміни відбуваються частіше, ніж синонімічні, як у випадку Vif ізоляту L04974, то це означає, що серед несинонімічних мутацій зустрічаються корисні з підвищеною імовірністю закріплення, і, отже, діє позитивний відбір. У найпростішому випадку позитивний відбір збільшує частоту ізолятів (алелей), які мають перевагу в частині пристосованості порівняно з іншою частиною популяції. Позитивний відбір збільшує генетичну різноманітність популяції, а негативний відбір видаляє шкідливі ізоляти (алелі).

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

Таблиця 1 — Позиції амінокислотних залишків (а.з.) протеїнів Gag, Vif, Pol BI ВРХ з несинонімічними замінами. Амінокислотні послідовності протеїнів ізоляту NC_001413 використано як референтні

Протеїн	Позиція, а.з.	Номер ізоляту BI ВРХ у GenBank	Заміна амінокислоти
Gag	17	L04974, L04972	P (L) - Pro (Leu)
	67	L04974, L04972	N (D) - Asn (Asp)
	71	L04974, L04972	R (K) - Arg (Lys)
	116	L04974, L04972	A (T) - Ala (Thr)
	117	L04974, L04972	D (E) - Asp (Glu)
	180	L04974, L04972	V (I) - Val (Ile)
	416	L04974	R (K) - Arg (Lys)
	454	L04972	P (S) - Pro (Ser)
Vif	4	L04972	T (P) - Thr (Pro)
	66	L04972	T (I) — Thr (Ile)
	79	L04974	E (K) - Glu (Lys)
	127	L04974	T (A) - Thr (Ala)
Pol	35	L04972	T (I) - Thr (Ile)
	66	L04974	V (M) - Val (Met)
	79	L04974	T (I) - Thr (Ile)
	109	L04974	G (E) - Gly (Glu)
	158	L04972	V (I) - Val (Ile)
	225	L04974	G (E) - Gly (Glu)
	226	L04972	R (K) - Arg (Lys)
	234	L04974	P (K) Pro (Lys)
	310	L04972	V (I) - Val (Ile)
	429	L04974	Y (H) — Tyr (His)
	620	L04974	E (K) - Glu (Lys)
	676	L04972	V (I) - Val (Ile)
	765	L04974	H (Q) — His (Gln)
	807	L04974, L04972	K (R) - Lys (Arg)
	825	L04972	T (A) - Thr (Ala)
846	L04974	W (-) - Trp (-)	

Таблиця 2 — Параметри тривимірних структур протеїну Vif для ізолятів NC_001413, L04972 та L04974 BI ВРХ.

Кількість	Ізолят BI ВРХ		
	NC_001413	L04974	L04972
водневих зв'язків	115	124	101
α-спіралей	7	10	8
β-шарів	6	4	4
β-поворотів	23	28	27

Третинну структуру протеїну Vif (розташування елементів вторинної структури в просторі один по відношенню до іншого) ізолятів BI ВРХ охарактеризовано через кількість водневих зв'язків, α-спіралей (регулярних спіралей, що утворюються через міжпептидні водневі зв'язки в межах одного поліпептидного ланцюга), β-шарів (мають слабо зігнуту конфігурацію поліпептидного ланцюга та формуються через міжпептидні водневі зв'язки в межах окремих ділянок одного поліпептидного ланцюга або суміжних поліпептидних ланцюгів), β-поворотів (структур, що представляють собою повернуту на 180° петлю) (табл. 2).

До факторів, що впливають на утворення α-спіралей, віднесено, зокрема, (i) схильність амінокислот утворювати α-спіраль, (ii) взаємодія між R-групами на відстані 3-х або 4-х а.з., (iii) близьке розташування а.з. з R-групами великого розміру (Asn, Trp, Cys), (iv) наявність залишків Gly, Pro.

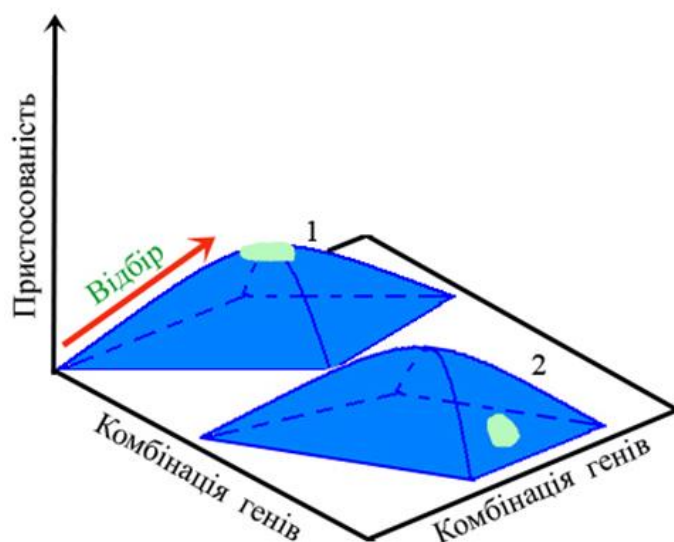


Рис. 2. Графік функції пристосованості від комбінації генів (адаптивний ландшафт). 1 — негативний (очищуючий) відбір, при якому найпристосованіший ізолят ВІ ВРХ є частим. 2 — позитивний відбір, при якому найпристосованіший ізолят ВІ ВРХ є рідкісним. Відбір завжди штовхає популяцію до вершини.

Для пошуку слідів позитивного відбору, що діяв в минулому [18], або відбувається за теперішнього часу [19, 20], застосовано низку різних методів, проте всі вони не є досконалими та мають певні недоліки.

Один з них, тест Таджими, для визначення форми природного відбору використовує середні значення відмінностей між послідовностями та кількість варіабельних сайтів (табл. 3). Негативні значення коефіцієнту D тесту Таджими свідчать про дію очищуючого відбору та зниження варіабельності, а $D > 0$ — про дію позитивного (балансуючого) відбору [21, 22].

Таблиця 3 — Параметри мутаційного аналізу (тесту Таджими) для генів, відкритих рамок зчитування ВІ ВРХ. Виділено значення коефіцієнту тесту Таджими для дії позитивного (балансуючого) відбору ($D > 0$).

Ген/протеїн ВІ ВРХ	m	S	p_s	Θ	π	D
<i>env</i>	4	92	0.013145	0.007170	0.007096	-0.107352
<i>pol</i>	4	42	0.016006	0.008731	0.008892	<u>0.192369</u>
<i>gag</i>	4	31	0.009776	0.005332	0.005151	-0.352193
ген s*	4	5	0.014205	0.007748	0.007576	-0.212492
<i>vif</i>	4	8	0.025890	0.014122	0.012945	-0.824072
<i>vif</i>	4	7	0.011725	0.006396	0.005863	-0.817336
ORF W	4	3	0.018182	0.009917	0.009091	-0.754451
ORF Y	4	3	0.012346	0.006734	0.006173	-0.754451
U3 область	4	4	0.008114	0.004426	0.004733	<u>0.650102</u>

Примітки: *ген s — ген, що кодує гіпотетичний протеїн S, m — число послідовностей для аналізу, S — число поліморфних сайтів в послідовностях, $p_s = S/n$ (n — загальне число сайтів), $\Theta = p_s/a_1$ — мутаційний параметр, π — нуклеотидна різноманітність, D — коефіцієнт тесту Таджими (оцінка відповідності характеру нуклеотидних замінів гіпотезі нейтральності).

Ретровірусні геноми фланковано довгими кінцевими повторами (LTR), які розділено на три області: U3, R та U5. Для регуляторної області U3 ізолятів L04972 та L04974 виявлено по 3 одонуклеотидних поліморфізми (ОНП) та дві делеції порівняно з ізолятом NC_001413. Для U3 ізоляту L04972 виявлено дві транзиції і одну трансверсію, а для L04974 — дві трансверсії і одну транзицію. ОНП, що виникають в області U3, можуть вести до значних змін її функцій. Зокрема, для області U3 провірусної ДНК ВІЛ-1, яка містить промотор, енхансер для вірусної транскрипції, продемонстровано, що її G-багата послідовність приймає структуру G-квадруплексу. Варіабельність нуклеотидної послідовності серед різних видів вірусів для області U3 перевищує таку для генів, що кодують протеїни. Проте варіабельні послідовності області U3 зберігають здатність утворювати G-квадруплекси. Це вказує на ту обставину, що промоторна

область U3, важливим елементом якої є G-квадруплес, перебуває під сильним еволюційним тиском [23], що підтверджується отриманими даними щодо U3 ВІ ВРХ.

Висновки. Ідентифіковано гени, відкриті рамки зчитування (ORF) та регуляторну область U3 геному ВІ ВРХ, які перебувають під дією природного відбору. Гени *gag*, *pol*, *s*, *vif*, відкриті рамки зчитування ORF W та ORF Y перебувають під тиском негативного (очищуючого) відбору, на що вказують негативне значення коефіцієнту D тесту Таджими на нейтральність, співвідношення $K_a/K_s < 1$ та $dN/dS < 1$. На ген *env* та регуляторну область U3, для яких отримано $D > 0$, $K_a/K_s > 1$, діє позитивний відбір.

Проведено порівняльний аналіз впливу несинонімічних замінів в протеїні Vif ізолятів ВІ ВРХ на конформаційні параметри молекули Vif. Виявлені чотири поліморфізми в геномах двох ізолятів ВІ ВРХ ведуть до істотних змін конформаційних параметрів молекул Vif, а саме, до зміни числа водневих зв'язків, α -спіралей, β -поворотів.

Відсутність в базі даних GenBank нових повногеномних сиквенсів ВІ ВРХ за період з 2007 р. до теперішнього часу, в той час, як за цей же період до GenBank депоновано, наприклад, 241 новий ізолят ретровірусу вірусу лейкозу ВРХ, 65 нових ізолятів лентівірусу вірусу артрити-енцефаліту кіз, ставить під сумнів природний характер виникнення ВІ ВРХ.

Перспективи використання отриманих результатів. Під позитивним відбором звичайно перебуває лише невелика частина гена, в той час як інша його частина перебуває під негативним відбором.

Отримані відомості щодо дії позитивного відбору на гени ВІ ВРХ є основою для вивчення еволюційної стабільності ВІ ВРХ за допомогою нових програм, а також для уточнення, на які саме сегменти гена *env* та регуляторної області U3 діє позитивний відбір.

Отримані результати щодо дії негативного відбору на гени ВІ ВРХ, що знайдено на підставі тесту Таджими, є основою для застосування критерію Макдональда–Крейтмана, який дозволяє визначити позитивний відбір в тих випадках, коли його неможливо виявити за допомогою визначення відношення частоти несинонімічних замінів dN до частоти синонімічних замінів dS (dN/dS).

Фінансування. Роботу виконано за фінансової підтримки гранту 34.02.01.01Ф Національної академії аграрних наук України.

Список літератури

1. Keshavarz H., Mohammadi A., Morovati S. Evidence of bovine immunodeficiency virus: a molecular survey in water buffalo populations of Iran. *Veterinary Medicine and Science*. 2022. Vol. 8, No 5. P. 2167–2172. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.872>.
2. Gutierrez B., Escalera-Zamudio M., Pybus O. G. Parallel molecular evolution and adaptation in viruses. *Current Opinion in Virology*. 2019. Vol. 34. P. 90–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.006>.
3. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Japanese Journal of Genetics*. 1991. Vol. 66, No 4. P. 367–386. DOI: <https://doi.org/10.1266/jjg.66.367>.
4. Kumar S., Hedges B. Advances in time estimation methods for molecular data. *Molecular Biology and Evolution*. 2016. Vol. 33, No 4. P. 863–869. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw026>.
5. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989. Vol. 123, No 3. P. 585–595. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>.
6. Tamura K. et al. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Vol. 109, No 47. P. 19333–19338. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1213199109>.
7. Hanada K., Shiu S.-H., Li W.-H. The nonsynonymous/synonymous substitution rate ratio versus the radical/conservative replacement rate ratio in the evolution of mammalian genes. *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, No 10. P. 2235–2241. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msm152>.
8. Wernegreen J. J. Reduced selective constraint in endosymbionts: elevation in radical amino acid replacements occurs genome-wide. *PLoS One*. 2011. Vol. 6, No 12. P. e28905. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028905>.
9. Sohal V. K. Comparative study: nonsynonymous and synonymous substitution of SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genome. *Genomics and Informatics*. 2021. Vol. 19, No 2. P. e15. DOI: <https://doi.org/10.5808/gi.20058>.
10. Palumbi S. R. Humans as a world's greatest evolutionary force. *Science*. 2001. Vol. 293, No 5536. P. 1786–1790. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>.
11. Wensing A. M. et al. 2017 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in Antiviral Medicine*. 2016. Vol. 24, No 4. P. 132–133. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5677049/>.
12. Maldarelli F. et al. HIV populations are large and accumulate high genetic diversity in a nonlinear fashion. *Journal of Virology*. 2013. Vol. 87, No 18. P. 10313–10323. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01225-12>.
13. Tamura K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. Vol. 30, No 12. P. 2725–2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

14. Hall T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
15. Kosakovsky Pond S. L., Frost S. D. W. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution*. 2005. Vol. 22, No 5. P. 1208–1222. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msi105>.
16. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43, No W1. P. W174–W181. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>.
17. Suspene R. et al. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Research*. 2006. Vol. 34, No 17. P. 4677–4684. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl555>.
18. Eyre-Walker A. The genomic rate of adaptive evolution. *Trends in Ecology and Evolution (Amsterdam)*. 2006. Vol. 21, No 10. P. 569–575. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.06.015>.
19. Grossman S. R. et al. A composite of multiple signals distinguishes causal variants in regions of positive selection. *Science*. 2010. Vol. 327, No 5967. P. 883–886. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1183863>.
20. Ben-Jemaa S. et al. Whole genome sequencing reveals signals of adaptive admixture in Creole cattle. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13, No 1. P. 12155. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38774-7>.
21. Jadhav A. et al. Genomic diversity and evolution of quasispecies in Newcastle disease virus infection. *Viruses*. 2020. Vol. 12, No 11. P. 1305–1323. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12111305>.
22. Furuse Y. Identifying potentially beneficial genetic mutations associated with monophyletic selective sweep and a proof-of-concept study with viral genetic data. *mSystems*. 2021. Vol. 6, No 1. P. e01151-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.01151-20>.
23. Piekna-Przybylska D. et al. U3 region in the HIV-1 genome adopts a G-quadruplex structure in its RNA and DNA sequence. *Biochemistry*. 2014. Vol. 53. P. 2581–2593. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi4016692>.

CHARACTERIZATION OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS GENES AND PROTEINS

Balak O. K.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Lymanska O. Yu.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

The goal of the study was determining the effect of natural selection on the bovine immunodeficiency virus (BIV) through the identification of polymorphisms by comparing a number of genes, open reading frames and proteins and analyzing the effect of nonsynonymous substitutions in the Vif protein of BIV isolates on the Vif conformational parameters. The selection pressure on the genes was estimated by Tajima test, as well as the determination of the ratio of nonsynonymous substitutions (K_a) to synonymous (K_s) K_a/K_s . K_a and K_s coefficients, their ratio (K_a/K_s) were calculated on the basis of alignments of amino acid and nucleotide sequences of the vif gene of BIV isolates. The nonsynonymous (dN) to synonymous (dS) substitution rate ratio per nucleotide site dN/dS was calculated to estimate the effect of selection on the vif gene by SLAC method on Datamonkey server. The number of hydrogen bonds, α -helices, β -sheets, β -turns for the protein tertiary structures of proteins was determined by I-TASSER server. Genes, open reading frames (ORFs) and the U3 regulatory region of BIV genome which are under the influence of selection have been identified. Gag, pol, s, vif genes, ORF W and ORF Y are under the negative (purifying) selection pressure. Env gene and the U3 regulatory region are under positive selection. Shannon entropy analysis (peaks that are specific to the positions of amino acid residues), interpreted as polymorphisms, revealed 16, 8, and 4 nonsynonymous substitutions for Pol, Gag, and Vif BIV proteins, respectively. Significant changes in the number of hydrogen bonds, α -helices, β -layers, β -turns were determined by the analysis of the effect of four nonsynonymous substitutions in the Vif protein on the conformational parameters of Vif of two BIV isolates. The multidirectional effect of selection on BIV genes is shown

Keywords: positive selection, molecular evolution, amino acid substitution, SNP

**НОЗОЛОГІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ІНФЕКЦІЙ З РЕСПІРАТОРНИМ СИНДРОМОМ
ТА З УРАЖЕННЯМ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ У КОТІВ У М. КРИВИЙ РІГ**

**Рубан В. О., Северин Р. В., Гонтарь А. М., Грінченко Д. В.,
Гарагуля Г. І., Баско С. О., Глущенко Я. В.**

*Державний біотехнологічний університет, Харків, Україна,
e-mail: raisa.severin2018@gmail.com*

Провідні лікарі міських ветеринарних клінік стверджують, що за останні роки почастишали випадки захворюваності котів на інфекційний ринотрахеїт в асоціації з інфекційними захворюваннями бактерійної етіології, такими як *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Haemophilus spp.* Відсутність уніфікованих і доступних методів лабораторної діагностики асоційованого ринотрахеїту котів призводить до ускладненого його перебігу та труднощів своєчасного лікування хворих тварин. Метою роботи було визначення показників розповсюдження респіраторних захворювань та хвороб, що супроводжуються ураженням лімфоїдних органів котів у м. Кривий Ріг. Матеріалом для роботи були результати досліджень породних та безпородних котів, хворих на інфекційні хвороби, в період з 2021 по 2022 роки. Дослідження проводилися в умовах чотирьох приватних ветеринарних клінік м. Кривий Ріг, одержані результати систематизовані на кафедрі епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету (м. Харків). Встановлено, що частка інфекційних респіраторних хвороб склала 19,3 %, а питома вага інфекцій з ураженням лімфоїдних органів склала 13,0 %. Виявлено, що інфекційний ринотрахеїт котів проявлявся в асоціації з каліцивірозом, хламідіозом, бордетеліозом, мікоплазмозом. При дослідженні вікової динаміки хворих на асоційований інфекційний ринотрахеїт котів встановлено, що найчастіше хворів молодняк у віці 10 тижнів (23,0 %) та у віці 12 тижнів (20,5 %). У переліку імунодефіцитів у котів реєструвалися такі захворювання, як панлейкопенія, вірусний імунодефіцит, інфекційний перитоніт, вірусна лейкемія. При дослідженні статевій сприйнятливості до імунодефіцитів встановлено, що більшим відсотком — 61,5 % — хворіли самки, ніж самці — 38,5 %.

Ключові слова: епізоотологічний моніторинг, інфекційний ринотрахеїт, імунодефіцити

У зв'язку з відсутністю ефективних засобів боротьби з багатьма інфекціями та великої кількості вірусних, вірус-бактерійних та інших асоціацій збудників, інфекційні хвороби тварин є нагальною проблемою. Іноді висловлюється зовсім неправильний погляд, що наразі на зміну бактерійним інфекціям прийшли вірусні. Звісно, вірусні захворювання домашніх тварин у міських умовах надзвичайно поширені, нерідко вони призводять до їх загибелі. Захворювання домашніх тварин можуть викликати такі відомі віруси як реовіруси, каліцивіруси, ретровіруси, парвовіруси, параміксовіруси, лейкозосаркоматозні віруси, коронавіруси, віруси герпесу, рабдовіруси, паповавіруси, аденовіруси. Проте, така теорія не відповідає дійсності, та найважливіше — знижує пильність до такого важливого питання, як профілактика інфекційних хвороб. Незважаючи на великі успіхи сучасної науки, що створила епізоотологічну теорію, яка пояснює суть епізоотичного процесу і розробила комплекс перевірених практиками заходів щодо запобігання поширенню інфекцій, все ж в багатьох випадках це не сприяє їхній ліквідації. Лікування дрібних домашніх тварин взагалі і котів, зокрема, при будь-якій з хвороб є досить важким і складним процесом, який не завжди призводить до позитивного результату, на жаль, відмічається значна летальність у хворих тварин. В доступній літературі існує мало статистичних даних щодо частоти захворювань різної етіології у котів. Більшість посібників та довідників вказують на частоту розвитку конкретного захворювання, а не групи патологій. В англійських виданнях майже половина інформації присвячена внутрішнім незаразним захворюванням, а ще половина — це інформація про інфекційну, акушерську та хірургічну патологію; іноді навіть хірургічна патологія взагалі не розглядається, або їй присвячують окремі

спеціалізовані видання. За результатами аналізу наукових публікацій в Україні визначено, що інфекційний ринотрахеїт, як одне із найпоширеніших вірусних захворювань котів, значно впливає на благополуччя тварин, особливо у регіонах, де традиційно відсутня культура вакцинації котів та тварини мають вільний вигул [6]. Серед невеликих популяцій котів захворюваність на герпесвірусну інфекцію сягає до 20 %. Майже всі тварини після первинного переохворювання залишаються потенційними вірусоносіями [1]. Захворювання супроводжується катаральним запаленням слизових оболонок, але клінічний перебіг може ускладнюватися за рахунок приєднання до патологічного процесу вторинної мікрофлори [5–7]. У зв'язку з таким неоднозначним відношенням авторів до різних видів патології котів, ми поставили завдання встановити характер поширення різних груп патологій у домашніх котів в містах. Завданням нашого дослідження було вивчення та аналіз статистичних даних щодо захворювань домашніх котів у м. Кривий Ріг за даними чотирьох приватних ветеринарних клінік.

Мета роботи. Визначення показників розповсюдження респіраторних захворювань та хвороб, що супроводжуються ураженням лімфоїдних органів, тканин, клітин домашніх котів у м. Кривий Ріг.

Матеріали і методи. Матеріалом для роботи були результати досліджень породних та безпородних котів, хворих на інфекційні хвороби, за період з 2021 по 2022 роки. Дослідження проводилися в умовах чотирьох приватних ветеринарних клінік м. Кривий Ріг, одержані результати систематизовані на кафедрі епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету (м. Харків).

Аналізували поширення інфекційних хвороб котів за даними журналів реєстрації та облікових карток хворих тварин. Діагноз встановлювали комплексно на підставі епізоотологічних, клінічних та патолого-анатомічних даних та результатів лабораторних досліджень.

Клінічно було обстежено 497 котів різного віку (від 2 тижнів до 12 років), порід та статі. При зборі анамнезу встановили умови утримання, годівлі, наявність контактів хворих тварин з іншими котами, проведення обробок від екто- та ендопаразитів, наявність щеплень проти інфекційних захворювань, аналізували динаміку прояву захворювань, тривалість хвороби. Зразки для лабораторної діагностики отримували шляхом ротоглоткового мазка і трансназальних змивів. Збудників каліцивірозу та ринотрахеїту котів виявляли у біологічному матеріалі від хворих тварин за допомогою комерційних тест-систем VetExpert та ImmunoComb® імунохроматографічним методом.

Для визначення титру антитіл у сироватці крові котів до вірусного ринотрахеїту (герпесвірусу) та каліцивірозу застосовували тестові набори Feline VacciCheck ImmunoComb®. Для виявлення збудника панлейкопенії котів використовували експрес-методи (CITO TEST FPV Ag). При вивченні інфекційного перитоніту було використано наступні методи: епізоотологічний, клінічний, цитологічний, гематологічний, біохімічний, імунологічний, ПЛР-діагностику та статистичний. Основними методами виявлення збудника бордетеліозу (*B. bronchiseptica*) та пастерельозу був бактеріологічний метод (посів на середовище Regan-Lowe — вугільно-кров'яний агар) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Результати досліджень. На початковому етапі досліджень проводили визначення питомої ваги інфекційних захворювань котів у порівнянні із незаразною патологією на підставі статистичних даних чотирьох приватних ветеринарних клінік м. Кривий Ріг. Співвідношення хвороб заразної та незаразної етіології за період 2021–2022 рр. представлені в табл. 1.

Аналізуючи дані співвідношень хвороб заразної та незаразної етіології за 2021–2022 рр. слід відзначити, що заразна патологія котів склала 48,0 %. До її складу ми віднесли респіраторні інфекції котів, вірусні захворювання, що супроводжуються ураженням лімфоїдних органів та дерматомікози.

Хвороби незаразної етіології склали 51,9 % і були представлені терапевтичними, хірургічними та акушерсько-гінекологічними проблемами. Найчастіше реєстрували такі хвороби незаразної етіології: з терапевтичних — отруєння різної етіології, панкреатити, гастрити, цистити, коліти, нефрити, гепатити; з акушерсько-гінекологічних — мастити, вагініти, ендометрити, мастопатії, маткові кровотечі; з хірургічних — абсцеси, екземи, новоутворення, рани різної етіології, переломи кісток та вивихи суглобів, тощо.

Таблиця 1 — Співвідношення хвороб заразної та незаразної етіології за 2021–2022 рр. у зоні діяльності ветеринарних клінік м. Кривий Ріг

Хвороби заразної та незаразної етіології	Захворювання	Загальна кількість випадків	% співвідношення захворювань	% заразних та незаразних захворювань
Заразні захворювання	Респіраторні інфекції	136	19,3	48,0
	вірусні захворювання, що супроводжуються ураженням лімфоїдних органів, тканин, клітин	92	13,0	
	Дерматомікози	110	15,6	
Незаразні захворювання	Терапевтичні Хірургічні Акушерсько-гінекологічні	365	51,9	51,9
Всього:		703	100	100

Серед респіраторних інфекцій реєструвалися як вірусні — інфекційний ринотрахеїт, каліцивіроз, так і бактерійні хвороби — бордетеліоз, пастеральоз, хламідіоз та мікоплазмоз. Випадки респіраторних захворювань у котів реєстрували нерівномірно протягом усього року, найчастіше у нещеплених, у деяких випадках також і серед імунізованих тварин. Захворювання частіше реєстрували в холодну пору року і періоди дощів (табл. 2).

Таблиця 2 — Сезонність прояву респіраторних захворювань котів у м. Кривий Ріг (2021–2022 рр.)

Респіраторні захворювання	Пора року				Всього
	зима	весна	літо	осінь	
Ринотрахеїт	22	15	4	11	51
Каліцивіроз	16	13	3	7	39
Бордетеліоз	8	5	2	6	21
Пастерельоз	4	3	1	2	10
Хламідіоз	1	4	1	3	9
Мікоплазмоз	2	2	-	1	6
Разом	53	42	11	30	136

Сприяли поширенню збудників, в першу чергу, неповноцінна годівля котів, скупчене утримання, перегрівання, переохолодження, підвищена вологість повітря, недотримання інших параметрів мікроклімату. Інфекційний респіраторний синдром у вигляді моноінфекцій було зареєстровано в кількості 27,5% в основному за рахунок інфекційного ринотрахеїту та каліцивірозу. Решта випадків — 72,5% — проявлялися як змішані та асоційовані інфекції (табл. 3).

Як виявилось, найчастіше реєструвався інфекційний ринотрахеїт в асоціації з різними інфекційними патогенами. У більшості випадків це були хламідії, бордетели, мікоплазми, пастерели. Отримані результати підтвердили наукові дані про те, що перераховані збудники характеризуються певним тропізмом до конкретних органів і тканин. Хламідії уражують переважно кон'юнктиву і, в окремих випадках, респіраторні та статеві органи. *Bordetella bronchiseptica* і *Mycoplasma* можуть бути самостійними етіологічними чинниками, а також виконувати роль збудників секундарних інфекцій. Крім того, у розвитку даних хвороб можуть відігравати певну роль й інші збудники: реовіруси, поксвіруси і коронавіруси котів, а також стафілококи, стрептококи, пастерели і колібактерії [2, 3, 7]. Перелік вірусних та бактерійних інфекцій, на які хворіють домашні коти, достатньо різноманітний [3, 7]. У 2022 році всього було обстежено 136 хворих котів із проявами типової респіраторної патології.

Таблиця 3 — Виявлення збудників інфекційних хвороб у пробах біоматеріалу від котів (n = 56) у м. Кривий Ріг (2021–2022 рр.)

Назва хвороби	Частка від кількості позитивних проб, %
Ринотрахеїт	13,5
Каліцивіроз	14,0
Разом	27,5
Ринотрахеїт + каліцивіроз	16,1
Ринотрахеїт, каліцивіроз + хламідіоз	21,4
Ринотрахеїт+бордетеліоз+мікоплазмоз	20,7
Каліцивіроз+хламідіоз	10,7
Ринотрахеїт+пастерельоз	3,6
Разом	72,5

Результати клінічного обстеження показали, що у хворих тварин проявлялися ерозивні ураження слизової оболонки ротової порожнини та язика, рясне слиновиділення, риніти, кон'юнктивіти, чхання, кашель, загальна слабкість, зниження та відсутність апетиту, підвищення температури тіла до 40–41 °С, зниження маси тіла. Найчастіше епізоотії спостерігалися при груповому утриманні тварин (розплідниках і притулках), а також після проведення масових фенілологічних заходів, таких як виставки. За результатами власних спостережень відмічено, що при ізольованому домашньому утриманні захворювання реєстрували відносно рідше. До захворювань були схильні коти різного віку та порід, але найбільш чутливими виявилися кошенята одно та двох місячного віку. При зборі анамнестичних даних з'ясовано, що найчастіше зараження відбувалося контактним і повітряно-крапельним шляхом, не виключався і трансмісивний шлях передачі збудника інфекції.

Інкубаційний період при інфекційних респіраторних хворобах котів був обумовлений особливостями конкретного збудника. Так, за герпесвірусної інфекції обстежених котів, він, зазвичай, становив 2–6 діб, за каліцивірусної інфекції — від 3 до 15 діб. У зв'язку з тим, що інфекційні респіраторні хвороби котів мали поліетіологічний і багатофакторний характер, клінічні форми і динаміка прояву захворювань відрізнялися великим різноманіттям. Наприклад, тривалість різних стадій хвороби (інкубаційної, продромальної, клінічної) залежала від виду та вірулентності конкретних збудників, а також від загальної резистентності та імунореактивності організму тварин.

Основним місцем проникнення збудників є епітелій слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, ротової порожнини та кон'юнктиви очей [4]. Тому при обстеженні хворих тварин, які поступали до клінік на прийом, були найбільш частими і неспецифічними клінічними ознаками кон'юнктивіти. За вказаний період інфекційні респіраторні хвороби котів в основному проявлялися гостро, підгостро, але не виключенням був і хронічний, а також прихований (латентний) перебіг. Найчастіше при герпесвірусній інфекції у кошенят у віці від одного тижня до 1,5 місяців спостерігали прояв надгострого перебігу. Захворювання починалося раптово, через сильний набряк слизової оболонки носоглотки і ротової порожнини кошенята не могли смоктати молоко у матері і гинули протягом доби.

Випадки захворювань на респіраторні інфекції реєстрували у тварин різних порід та вікових груп. Найчастіше випадки захворювання ринотрахеїтом, каліцивірозом, бордетеліозом котів реєстрували у кошенят віком від одного до п'яти місяців. У цій віковій групі тварин часто виявляли гостру форму інфекції. У віці від одного до п'яти років частіше спостерігається безсимптомне носійство. Особливо важко хворіли тварини старше шести років (рис. 1).

У науковій ветеринарній літературі зазначається, що інфекційними респіраторними захворюваннями зазвичай хворіють кошенята у віці з двох місяців та молоді тварини до року. Наш аналіз вікової сприйнятливості котів до герпесвірусної інфекції показав, що висока захворюваність реєструвалася у кошенят з 8-ми тижнів до 6-ти місяців, а також у тварин старше 6 років (рис. 1).

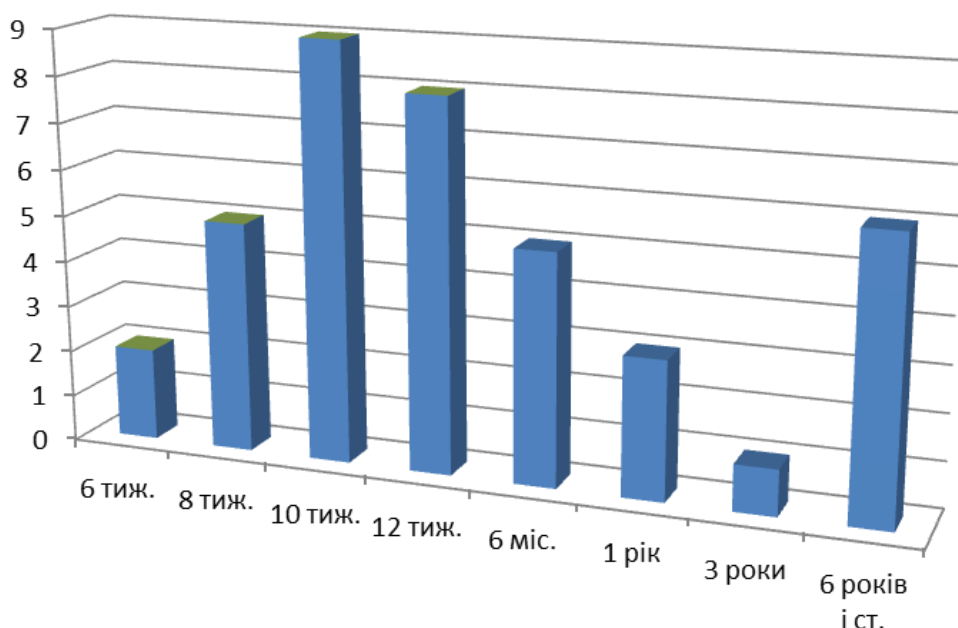


Рис.1. Вікова динаміка захворюваності котів на асоційований інфекційний ринотрахеїт за даними ПВК «Айболіт» м. Харкова.

Найбільше хворів молодняк у віці 10 тижнів (23,0 %) та у віці 12 тижнів (20,5 %), а також реєструвалися випадки захворювання серед 6-річних і старше котів (15,3 %). При проведенні статистичного аналізу поширення інших інфекцій у котів ми звернули увагу, що останнім часом фахівці приватних ветеринарних клінік реєстрували випадки захворювання, які супроводжувалися ураженням лімфоїдних органів, тканин, клітин. Як правило, це вірусні збудники, інфікування яких може призводити у котів до розвитку онкологічних захворювань (лімфосаркома і лейкемія, пухлина кісткового мозку, мультицентрична фібросаркома). За науковими даними, на фоні імунодефіциту виникають вторинні інфекції, клінічні ознаки яких локалізуються в ротовій порожнині (стоматит, гінгівіт), носовій порожнині, супроводжується ураженням очей. Наприклад, вірус імунодефіциту часто викликає гострий рецидивуючий або хронічний передній увеїт. Вірус інфекційного перитоніту за неексудативної форми викликає ураження очей (двосторонній гранульоматозний увеїт, гнійний кон'юнктивіт, ураження райдужної оболонки і сітківки) [5, 8]. За нашими спостереженнями, впродовж 2021–2022 рр. у 47,0 % випадків респіраторний синдром різної етіології у котів розвивався на фоні наявності у них імунодефіцитних станів. Тобто, у тварин із діагнозами на інфекційні імунодефіцити нашаровувалися респіраторні патології, викликані різними асоціаціями вірусних і бактерійних чинників. Серед клінічно обстежених 197 котів різного віку, порід і статі за період 2021–2022 рр. з них було виявлено 92 позитивних випадки захворювань, що супроводжувалися ураженням лімфоїдних органів, тканин, клітин. Встановлено, що у котів нозологічний профіль інфекційних хвороб, що супроводжуються імунодефіцитами, формувався із 4 нозоодиниць (табл.4).

Таблиця 4 — Розповсюдженість вірусних захворювань серед котів, що супроводжуються ураженням лімфоїдних органів у м. Кривий Ріг (2021–2022 рр.)

Вірусні інфекції	2021 рік		2022 рік	
	Захворіло (абс.)	%	Захворіло (абс.)	%
Панлейкопенія	24	50,0	22	50,0
Вірусний імунодефіцит	7	14,6	8	18,2
Інфекційний перитоніт	11	22,9	9	20,4
Вірусна лейкемія	6	12,5	5	11,4
Всього	48	100	44	100

Проаналізувавши ураженість інфекційними респіраторними захворюваннями та імунодефіцитами за 2021–2022 рр., було встановлено, що з більшим відсотком хворіли самки (61,5 %), ніж самці (38,5 %) (табл. 5).

Таблиця 5 — Статева сприйнятливість котів до асоційованих імунодефіцитів (2021–2022 рр.)

№ з/п	Стать	Уражених інфекційними захворюваннями	Відсоток ураженості, %
1	Самець	88	38,5
2	Самка	140	61,5
Всього:		228	100

Таким чином, встановлений нами нозологічний профіль інфекційних хвороб котів у м. Кривий Ріг свідчить про необхідність постійного моніторингу поширення з вивченням особливостей їх прояву. Такий моніторинг повинен бути постійною складовою системи заходів профілактики та ерадикації зазначених інфекційних хвороб котів і включати аналіз даних щодо народжуваності, летальності, міграції, вікової та статеві структури тварин в різних районах міста.

Висновки. 1. Досліджено нозологічний профіль інфекційних хвороб котів у м. Кривий Ріг.

2. Встановлено, що частка інфекційних респіраторних хвороб склала 19,3 %, а питома вага інфекцій з ураженням лімфоїдних органів склала 13,0 %.

3. Виявлено, що інфекційний ринотрахеїт котів проявлявся в асоціації з каліцивірозом, хламідіозом, бордетеліозом, мікоплазмозом.

4. При дослідженні вікової динаміки хворих на асоційований інфекційний ринотрахеїт котів встановлено, що найчастіше хворів молодняк у віці 10 тижнів (23,0 %) та у віці 12 тижнів (20,5 %).

5. У переліку імунодефіцитів у котів реєструвалися такі захворювання, як панлейкопенія, вірусний імунодефіцит, інфекційний перитоніт, вірусна лейкемія.

6. При дослідженні статеві сприйнятливості до імунодефіцитів встановлено, що більшим відсотком — 61, % — хворіли самки, ніж самці — 38,5 %.

Перспективи подальших досліджень: у зв'язку з широким спектром нозологічних одиниць інфекційних хвороб у котів необхідно розробляти системи профілактичних заходів на основі результатів епізоотичного моніторингу інфекційних хвороб.

Список літератури

1. Binns S. H. et al. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2000. Vol. 2, No 3. P 123–133. DOI: <https://doi.org/10.1053/jfms.2000.0084>.
2. Brice R. S. et al. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2009. Vol. 11(8), 633–644. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.12.005>.
3. Meyer A., Kershaw O., Klopfleisch R. Feline calicivirus-associated virulent systemic disease: Not necessarily a local epizootic problem. *Vet. Rec.* 2011. Vol. 168, No 22. P. 589. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.d160>.
4. Cao N. et al. Development and application of a triplex taqman quantitative real-time PCR assay for simultaneous detection of feline calicivirus, feline parvovirus, and feline herpesvirus 1. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022. Vol. 8. P. 792322. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.792322>.
5. Dmytryshyn O., Stefanyk V. Influence of some etiological factors on development of gynecological pathology and infertility of cats. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2019. Vol 21, No 94. P. 66–73. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9412>.
6. Gaskell R. et al. Feline herpesvirus. *Veterinary Research*. 2007. Vol. 38, No 2. P. 337–354. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2006063>.
7. Helps C. R. et al. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. *The Veterinary Record*, 2005. Vol. 156, No 21. P. 669–673. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.156.21.669>.
8. Monteiro J. T., Lepenies B. Myeloid C-type lectin receptors in viral recognition and antiviral immunity. *Viruses*, 2017. Vol. 9, No 3. P. 59. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9030059>.

**NOSOLOGICAL PROFILE OF INFECTIONS WITH RESPIRATORY SYNDROME
AND INFECTION OF LYMPHOID ORGANS IN CATS IN KRYVIY RIH**

**Ruban V. O., Severyn R. V., Gontar' A. M., Grinchenko D. V.,
Garagulya H. I., Basko S. O., Glushchenko Y. V.
State Biotechnological University, Kharkiv, Ukraine**

Leading doctors of city veterinary clinics claim that in recent years cases of infectious rhinotracheitis in cats have increased in association with infectious diseases of bacterial etiology, such as Escherichia coli, Shigella spp., Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, Staphylococcus aureus, Staphylococcus hyicus, Streptococcus spp., Klebsiella spp., Proteus spp., Pseudomonas aeruginosa, Campylobacter spp., Mycoplasma spp., Haemophilus spp. The lack of unified and available methods of laboratory diagnosis of associated cat rhinotracheitis leads to a complicated course and difficulties in timely treatment of sick animals. The aim of the work was to determine the prevalence of respiratory diseases and diseases accompanied by damage to the lymphoid organs of cats in the city of Kryvyi Rih. The material for the work was the results of studies of purebred and outbred cats suffering from infectious diseases in the period from 2021 to 2022. Research was conducted in four private veterinary clinics in Kryvyi Rih, the results were systematized at the Department of Epizootology and Microbiology of the State Biotechnology University (Kharkiv). It was established that the share of infectious respiratory diseases was 19.3%, and the specific weight of infections with damage to lymphoid organs was 13.0%. It was found that infectious rhinotracheitis of cats was manifested in association with calicivirus, chlamydia, bordetellosis, and mycoplasmosis. When studying the age dynamics of patients with associated infectious cat rhinotracheitis, it was established that the most frequently affected young animals were 10 weeks old (23.0%) and 12 weeks old (20.5%). In the list of immunodeficiencies in cats, such diseases as panleukopenia, viral immunodeficiency, infectious peritonitis, and viral leukemia were registered. In the study of sexual susceptibility to immunodeficiencies, it was established that a higher percentage — 61.5% — of females were ill than males — 38.5%

Keywords: epizootological monitoring, infectious rhinotracheitis, immunodeficiencies

3. ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 619:616.98-03:578.825.15:636.22/28(477)

DOI 10.36016/VM-2023-109-8

ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІЧНОГО ПРОЯВУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В УКРАЇНІ

*Корнєйков О. М., Олешко А. Ю., Перфілова С. І., Горбатенко С. К.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: korneykov@ukr.net*

За результатами обстеження поголів'я ВРХ господарств 13 областей України встановлено, що у 33,8 % з них виявлено циркуляцію серед тварин герпесвірусу 1-го типу (BHV-1), який є збудником IPT. Захворювання тварин у респіраторній формі IPT зареєстровано у 41,7 % господарств, у генітальній та у вигляді кератокон'юнктивітів — у 8,3 %, а з безсимптомним та полісимптомним перебігом — у 25,0 % та 16,7 % відповідно. Наявність значного відсотку господарств, де встановлено безсимптомний перебіг, обумовлено майже повсюдним використанням вакцинопрофілактики IPT. Особливе занепокоєння викликає використання в обстежених господарствах вакцин, що містять живі атенуйовані штами герпесвірусу 1 типу (66,7 % всіх випадків), що додатково ускладнює епізоотичну ситуацію

Ключові слова: герпесвірус 1 типу, вакцинопрофілактика, епізоотична ситуація

Незважаючи на успішну протиепізоотичну роботу в Україні та наявності значної кількості інструктивних положень, які регламентують заходи з контролю інфекційних захворювань тварин в господарствах, проблема пневмоентеритів ВРХ й досі стоїть гостро для тваринників нашої держави. Наслідком чого є неконтрольоване поширення герпес-, пести-, параміксо- та коронавірусів в стадах ВРХ.

За останні два десятиріччя отримано значні знання щодо етіології пневмоентеритів ВРХ, розроблено протиепізоотичні заходи, методи та засоби діагностики, профілактики та лікування [1–4], за рахунок чого відбулася деяка стабілізація епізоотичної ситуації щодо захворювань, не останню роль в якій відіграло використання вакцин проти пневмоентеритів закордонного виробництва. Однак, крім позитивного ефекту, вищезначене сприяло розвитку таких негативних наслідків як зміна мікробіологічного фону та поява нових епізоотичних штамів вірусів, які раніше не зустрічалися на території України [5].

Особливе значення в етіології вірусних пневмоентеритів має герпесвірус 1 типу ВРХ (BHV-1), який є збудником інфекційного ринотрахеїту. Вірус IPT займає особливе місце в інфекційній патології великої рогатої худоби, тому що він негативно впливає не тільки на респіраторну, але й на імунну, нервову та репродуктивну системи тварин [6, 7]. До того ж, цей вірус окрім значного негативного впливу на здоров'я тварин та їх продуктивність [1], значно впливає на можливості міжнародної торгівлі тваринами у всьому світі, значно їх обмежуючи [8].

Зважаючи на те, що широка циркуляція вірусу інфекційного ринотрахеїту серед великої рогатої худоби зумовлює періодичні рецидиви захворювання, впровадження в скотарстві засобів специфічної профілактики захворювання призвело як до значного покращення епізоотичної ситуації щодо IPT, так і до персистенції збудника в організмі інфікованих тварин та слабо вираженого клінічного прояву захворювання. Саме визначення особливостей клінічного прояву захворювання дозволить удосконалити первинну діагностику IPT та змінити підходи до специфічної профілактики хвороби в сучасних умовах.

Мета роботи. Вивчити особливості клінічного перебігу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби в господарствах окремих регіонів України.

Матеріали та методи. Дослідження проводили впродовж 2016–2022 рр. в 71 господарстві 13 областей України, а саме Харківській, Полтавській, Кіровоградській, Миколаївській, Дніпропетровській, Херсонській, Житомирській, Сумській, Одеській, Чернігівській, Рівненській, Черкаській та Запорізькій. Визначення серопревалентності до герпесвірусу 1 типу ВРХ

(збуднику інфекційного ринотрахеїту ВРХ), проводили за допомогою імуноферментного методу діагностики (ІФА), з використанням тест-системи «Infectious Bovine Rhinotracheitis Antibody Test Kit» (IDEXX, Франція). З метою визначення епізоотичної ситуації щодо вірусу ІРТ досліджували по 10–15 проб сироватки крові ВРХ з кожного господарства.

Встановлення попереднього діагнозу та визначення етіологічних факторів, що викликали захворювання проводили шляхом клініко-епізоотологічного обстеження господарств, оцінюючи клінічні ознаки захворювання, інтенсивність їх прояву у тварин всіх технологічних груп, а у випадках загибелі тварин, враховували патологічні зміни, що розвивались. З метою аналізу даних щодо існуючої в тому чи іншому господарстві системи профілактики пневмоентеритів, а також визначення засобів, що використовуються з цією метою, було проведено аналіз планів протиепізоотичних заходів в кожному випадку.

Для лабораторного підтвердження етіологічної складової захворювання ВРХ відбирали проби біологічного матеріалу (носоглоткові змиви, змиви (вміст) з прямої кишки, серозно-слизові витікання з носової порожнини та очей, а також змиви з піхви). Від вимушено вбитих, загиблих тварин та аборт-плодів відбирали проби патологічного матеріалу (шматочки паренхіматозних органів, трахеї, гортані, лімфатичні вузли, вміст кишечника). Виявлення антигенів вірусу ІРТ, а також диференціацію захворювання від вірусної діареї, парагрипу-3 та респіраторно-синцитіальної інфекції проводили шляхом дослідження проб клінічного та патологічного матеріалу за допомогою реакції імунофлюоресценції (РІФ), з використанням тест-систем виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» (м. Харків).

Результати досліджень. Проведеним клініко-епізоотологічним обстеженням господарств, в т. ч. аналізом планів протиепізоотичних заходів в кожному з них, встановлено, що у 83,4 % з них з метою профілактики і боротьби з інфекційним ринотрахеїтом ВРХ застосовували щеплення тварин з використанням комбінованих препаратів. Слід зазначити, що у більшості з обстежених господарств (61,1 %) реєстрували ознаки захворювання тварин на ІРТ з різним його проявом. Поглибленим аналізом встановлено, що симптоми захворювання спостерігали незалежно від того, використовували в господарстві вакцинопрофілактику чи ні. Різниця була лише у локалізації патологічних змін, перебігу захворювання (хронічний, гострий чи підгострий) та в рівні захворюваності тварин.

За результатами проведених серологічних досліджень за допомогою імуноферментного методу діагностики встановлено, що у більшості випадків досліджені тварини з господарств, де впроваджено специфічну профілактику, здебільшого мали високу напруженість імунної відповіді до збудника інфекційного ринотрахеїту ВРХ на рівні (89–100) %. В пробах, відібраних від тварин з господарств, де засоби специфічної профілактики впроваджені не були, спостерігалася "строкатість антитіл" з причини неоднорідності антитілогенезу в організмі тварин. Означені випадки були показником ймовірної циркуляції в стаді великої рогатої худоби епізоотичних штамів збудника ІРТ та, враховуючи клінічні ознаки захворювання, потребували поглибленого дослідження. За результатами комплексного обстеження поголів'я ВРХ 71 господарства скотарського напрямку Харківської, Полтавської, Кіровоградської, Миколаївської, Дніпропетровської, Херсонської, Житомирської, Сумської, Одеської, Чернігівської, Рівненської, Черкаської та Запорізької областей, яке передбачало клініко-епізоотологічне обстеження поголів'я, дослідження на наявність специфічних антитіл до вірусу (ІФА) та виявлення антигенів збудника (РІФ), встановлено, що у 33,8 % господарств виявлено циркуляцію серед тварин герпесвірусу 1-го типу (ВНВ-1), який є збудником ІРТ.

Аналізом проведених досліджень визначено різну локалізацію збудника в організмі тварин, а відповідно – різний клінічний прояв захворювання, що свідчило про виявлення різних форм перебігу інфекційного ринотрахеїту у тварин серед обстежених господарств (табл. 1).

Проведеним аналізом встановлено, що захворювання тварин у респіраторній формі ІРТ зареєстровано у 41,7 % господарств, у генітальній формі та у вигляді кератокон'юнктивітів — у 8,3 %, а з безсимптомним та полісимптомним перебігом — у 25,0 % та 16,7 % відповідно. Наявність значного відсотку господарств, де встановлено безсимптомний перебіг, обумовлено майже повсюдним використанням вакцинопрофілактики ІРТ. Слід зазначити, що особливе занепокоєння викликає використання в обстежених господарствах вакцин, що містять живі атенуйовані штами герпесвірусу 1 типу (66,7 % усіх випадків), що додатково ускладнює епізоотичну ситуацію.

Таблиця 1 — Клінічний прояв інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби в господарствах різних регіонів України

Області	Досліджено господарств	Кількість господарств, де ідентифіковано збудника	Клінічні форми перебігу IPT					
			безсимптомна	респіраторна	генітальна	кератокон'юнктивальна	нервово-енцефалітна	полісимптомна
Харківська	8	6	1	3	—	1	—	1
Полтавська	12	3	1	2	—	—	—	—
Кіровоградська	5	1	—	—	1	—	—	—
Миколаївська	4	1	—	1	—	—	—	—
Дніпропетровська	2	—	—	—	—	—	—	—
Херсонська	7	2	1	1	—	—	—	—
Житомирська	1	—	—	—	—	—	—	—
Сумська	8	3	1	1	—	1	—	—
Одеська	5	2	—	1	—	—	—	1
Чернігівська	11	5	1	1	1	—	—	2
Рівненська	1	—	—	—	—	—	—	—
Черкаська	7	1	1	—	—	—	—	—
Запорізька	—	—	—	—	—	—	—	—
Всього	71	24	6	10	2	2	—	4

Висновки. 1. Найбільш поширеною формою прояву інфекційного ринотрахеїту в господарствах 13 областей України є респіраторна та безсимптомна.

2. Не останню роль в прояві безсимптомної форми IPT в господарствах відіграє безконтрольне впровадження засобів специфічної профілактики, до складу яких входять живі атенуйовані штами герпесвірусу 1 типу.

Список літератури

- Headley S. A. et al. Molecular survey of infectious agents associated with bovine respiratory disease in a beef cattle feedlot in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2018. Vol. 30, No 2. P. 249–251. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638717739945>
- Maidana S. S. et al. A new molecular method for the rapid subtyping of bovine herpesvirus 1 field isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2020. Vol. 32, No 1. P. 112–117. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638719898692>.
- Barrett D. et al. Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus 1 (BHV 1), Leptospirosis and Neosporosis, and associated risk factors in 161 Irish beef herds. *BMC Veterinary Research*. 2018. Vol. 14, No 1. P. 8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1324-9>.
- Hostnik P. et al. Review of Infections With Bovine Herpesvirus 1 in Slovenia. *Frontiers in veterinary science*. 2021. Vol. 8. P. 676549. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.676549>.
- Корнейков О. М. та ін. Ефективність різних підходів профілактики та боротьби з інфекційними пневмоентеритами ВРХ. *Ветеринарна медицина: міжвідом. темат. наук. зб.* 2019. Вип. 105. С. 46–53. DOI: <https://doi.org/10.36016/VM-2019-105-9>.
- d'Offay J. M., Mock R. E., Fulton R. W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *American Journal of Veterinary Research*. 1993. Vol. 54, No 4. P. 534–539.
- Dagalp S. B. et al. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) strains from cattle with diverse clinical cases in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*. 2020. Vol. 52, No 2. P. 555–564. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02042-6>.
- Fernandes L. G. et al. Spatial analysis for bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus type 1 infections in the state of Paraíba, northeastern Brazil. *BMC Veterinary Research*. 2018. Vol. 14, No 1. P. 102. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1412-5>.

CHARACTERISTICS OF CLINICAL MANIFESTATION OF INFECTIOUS
BOVINE RHINOTRACHEITIS IN UKRAINE

Kornieikov O. M., Oleshko A. Yu., Perfilova S. I., Gorbatenko S. K.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

According to the results of the survey of cattle in 13 regions of Ukraine, it was found that 33.8% of them had circulating herpesvirus type 1 (BHV-1), which is the causative agent of infectious rhinotracheitis (IRT). The respiratory form of IRT was found in 41.7% of farms, genital and keratoconjunctivitis in 8.3%, and asymptomatic and polysymptomatic in 25.0% and 16.7%, respectively. A significant percentage of farms with asymptomatic cases is due to the almost total use of IRT vaccination. Of particular concern is the use of vaccines containing live attenuated strains of herpesvirus type 1 in the surveyed farms (66.7% of all cases), which further complicates the epizootic situation

Keywords: Herpesvirus type 1, vaccination prophylaxis, epizootic situation

УДК 619:616.98-076:579.869.1:577.2.08(477)

DOI 10.36016/VM-2023-109-9

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ІЗОЛЯТІВ *LISTERIA*
MONOCYTOGENES, ВИДІЛЕНИХ ВІД РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН В УКРАЇНІ

Полюшко Д. П., Стегній Б. Т., Марченко Н. В., Болотін В. І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: vbolotin@hotmail.de

Визначено ПЛР-профілі 12 архівних культур лістерій, що були виділені від різних видів тварин і зберігаються в колекції мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ». Встановлено, що 10 ізолятів налічують гени *prs*, *inlB*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB*, *hly*, *iap*, що характеризує їх як високівірулентних. Ізолят *L. monocytogenes* 61052 не містить ген *inlA*, а у *L. monocytogenes* Varja не виявлено гени *actA* та *hly*. За допомогою ПЛР встановлено також приналежність 11 досліджуваних культур до серотипів 4b, 4d, 4e, а також одного ізоляту до 1/2a. Отримані дані можуть бути використані для вдосконалення діагностики лістеріозів тварин в Україні за рахунок створення високоспецифічних антигенів

Ключові слова: лістеріоз, полімеразна ланцюгова реакція, фактори вірулентності

На цей час рід *Listeria* включає шість видів, з яких епізоотичне та епідеміологічне значення мають *L. monocytogenes* та *L. ivanovii*. Для людини основним джерелом збудника є продукти харчування, у тому числі молочні, сире м'ясо, риба, а також свіжі фрукти та овочі [8, 12]. Також лістерії виділяють від хворих тварин, контамінованого ґрунту, поверхневих вод і деяких рослин. Тварини є носіями збудника, які виділяють його з фекаліями, молоком та плацентою. Так, близько 20 % клінічно здорового поголів'я ВРХ виділяють *L. monocytogenes* з фекаліями, у т.ч. підтипи, що можуть викликати спорадичні, або ензоотичні спалахи лістеріозу, призводячи до втрат серед продуктивних тварин, масових абортів та ризиків зараження персоналу в господарствах [7, 18]. Збудник викликає значне занепокоєння, оскільки смертність може сягати від 50 % до 90 % залежно від клінічної форми захворювання, виду тварини, його резистентності, тощо. *L. monocytogenes* вважається стійким у зовнішньому середовищі патогеном, здатним витримувати низькі температури, високу концентрацію солей і широкий діапазон рН (до 9,0) [8,11].

На цей час у бактерій роду *Listeria* описано 15 соматичних (O) та 5 джгутикових (H) антигенів, за комбінацією яких *L. monocytogenes* розподіляють на 13 серотипів: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e і 7. Додатково серотип 4h був описаний Yin Y. та іншими як гіпервірулентний варіант, що є поєднанням декількох серотипів. Близько 90 % випадків лістеріозу у людини обумовлюють серотипи 1/2a, 1/2b, 4b, та 3a [13, 17, 30].

Основними факторами патогенності *L. monocytogenes* служать поверхневі інвазини (*InlA*, *InlB*, *InlC*, *InlJ*), лістеріолізін O (*hly*), бактеріальний поверхневий білок (*ActA*), специфічна фосфоліпаза C (*plcA* та *plcB*) та р60 – білок пов'язаний з інвазією, що кодується геном *iap*. Всі

перелічені фактори регулюються білком PrfA, окрім р60 [20, 29]. Таке розмаїття викликане високими адаптаційними можливостями збудника, його здатністю набувати стійкість через передачу генетичного матеріалу інших видів бактерій [9]. Завдяки своїм властивостям лістерії можуть забруднювати широкий спектр харчових продуктів, що вимагає постійного моніторингу [15].

Метою досліджень було охарактеризувати архівні штами та ізоляти *Listeria monocytogenes* за допомогою молекулярно-генетичних методів.

Матеріали та методи. Для дослідження були обрані 12 архівних штамів та польових ізолятів *L. monocytogenes* з колекції мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ», що були раніше типовані бактеріологічними методами (табл. 1).

Таблиця 1 — Перелік штамів *L. monocytogenes*, що використовували в дослідженні

№	Назва штаму, або ізоляту	Рік виділення	Джерело
1.	Тернопіль	1993	Вівця, патологічний матеріал
2.	dolph	2021	Фоцена звичайна, мозок
3.	Буринь	1993	Вівця, мозок
4.	Кріль 17	1995	Кріль, мозок
5.	Varja	2021	Собака, аборт плід
6.	61052	2022	ВРХ, внутрішні органи
7.	1	1998	?
8.	9/72	1996	?
9.	9/130	1999	?
10.	9/129	1999	?
11.	9/128	1999	?
12.	9/127	1999	?

Для відновлення з ліофільного стану і культивування лістерій використовували м'ясо-пептонний агар та середовище Мартена з додаванням 1 г глюкози на 100 мл середовища.

Екстракцію ДНК проводили за допомогою набору «Indispin Pathogen Kit» згідно з інструкцією виробника. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою комерційного набору для ПЛР «Thermo Scientific Dream Taq Green PCR MasterMix». Перелік використаних у дослідженні праймерів наведений у табл. 2.

ПЛР проводили відповідно протоколів з використанням ампліфікатора виробництва компанії Biometra. В якості негативного контролю використовували деіонізовану воду.

Продукти ампліфікації піддавали електрофоретичному аналізу (110В, 300 мА) в 1,5 % агарозному гелі протягом 60 хв. Визначення довжини утворених ампліконів проводили за допомогою маркера молекулярної ваги Fast Gene 100 bp DNA Ladder RTU Nippon genetics Europe GmbH за допомогою системи візуалізації BioradGelDoc Universalhood II (USA).

Результати і обговорення. Було проаналізовано 12 культур *L. monocytogenes*, що зберігаються в ліофільно висушеному стані в умовах колекції мікроорганізмів лабораторії вивчення бруцельозу. Так, на першому етапі перевіряли наявність генів *prs* та *inlB* (рис. 1, 2). Дані маркери широко використовуються для детекції лістерій методом ПЛР [6, 19]. Ген *prs* є загальнородовим маркером, присутнім у всіх видах роду *Listeria*, окрім *L. rocourtiae*, та який кодує фермент фосфорибозилпірофосфатсинтетазу, [16]. Ген *inlB* є видоспецифічним для *L. monocytogenes* і кодує один з мембранних білків інтерналінів, завдяки яким збудник проникає в клітини господаря. Ключова роль інтерналіну В (InlB) полягає в тому, що він індукуює фагоцитоз, переважно клітин гепатоцитів, а також бере участь у формуванні біоплівки [28].

Отримані результати показують, що всі ізоляти лістерій містять зазначені гени, що підтверджує попередні результати типування збудників бактеріологічними методами.

Також нами було проведено дослідження щодо наявності інших маркерів патогенності лістерій з групи інтерналінів, а саме *inlA*, *inlC* та *inlJ* (рис. 3). На відміну від *inlB*, ці гени кодують поверхневі білки, які індукують фагоцитоз в макрофагах, ентероцитах та епітеліальних клітинах, адсорбуючись на поверхні цих клітин [26].

Таблиця 2 — Послідовності праймерів, що були використані під час досліджень

Назва праймера	Послідовність праймеру 5'-3'	Назва таргетного гена та продукту, що він кодує	Довжина фрагменту, п. н.	Джерело
inIA	F:ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	inIA, Internalin A	800	16
inIB	F:CATGGGAGAGTAACCCAACC R: GCGGTAACCCCTTTGTCATA	inIB, Internalin B	272	
inIC	F:AATTCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA	inIC, Internalin C	517	
inIJ	F:TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	inIJ, Internalin J	238	
actA	F:TGCATTACGATTAACCCCGACA R: AGGCTTTCAAGCTCACTATCCG	actA, Actin assembly-inducing protein	431	6
plcB	F: AGTGTCTAGTCTTTCCGG R: ACCTGCCAAAGTTTGCTGT	plcB, Phospholipase C (PC-PLC)	792	
hly	F: ACGCAGTAAATACATTAGTG R: AATAAACTTGACGGCCATAC	hly, Listeriolysin O	372	
iap	F: TTTGCTAAAGCGGGTATCTC R: AGCCGTGGATGTTATCGTAT	iap, Invasion-associated protein (p60)	205	
Imo_0737	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	Unknown, no similarity	691	7, 14
Imo_1118	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	Unknown, no similarity	906	
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	Putative transcriptional regulator	471	
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	ORF2110, Putative transcriptional regulator	597	
prs	F: AGCTCGAAGAGATTGCGAAAGA R: TTCACCAAGAAGAGCTGCAA	prs, Regulatory protein all listeria species	350	
Im0690	F: TTAGTAGATCAAAGTCTCC R: AAGAAAAGCCCCCTCGTCC	flaA, Flagelin protein	538	23
LMOSL	F: ATGCAACATCAAGAGCAAGAA R: TGGCATTCTAAGGATGTTCTCT	Hypothetical protein	300	
LMLG	F: TGAGTTTGCAGGAAAGAAGG R: AACCGTGGTTGGAAGTGTAA	Hypothetical protein	388	

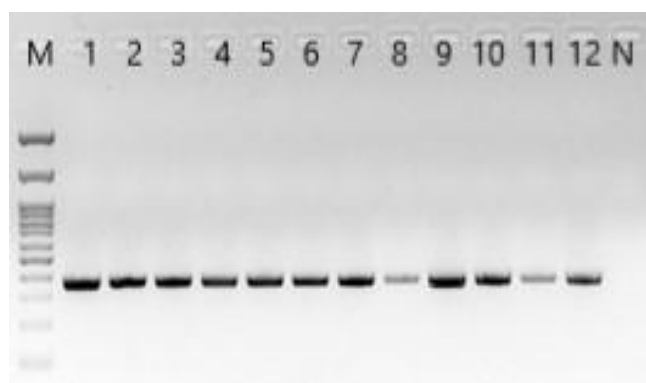


Рис. 1. Електрофорез продуктів ампліфікації специфічної ділянки гена *prs* (350 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

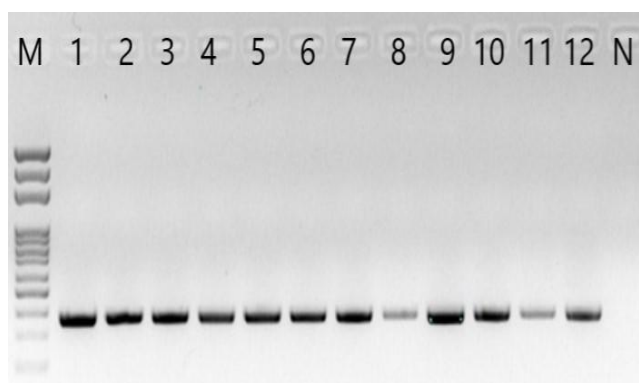


Рис. 2. Електрофорез продуктів ампліфікації специфічної ділянки гена *inIB* (272 п.н) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Встановлено, що всі культури містили досліджувані фактори патогенності, окрім ізоляту *L. monocytogenes* 61052, який не містив ген *inlA*. Цей ізолят був виділений від ВРХ.

Третій етап дослідження був спрямований на виявлення генів *hly*, *iap* та *actA* (рис. 4). Для цього проводили мультиплексну ПЛР для одночасного виявлення зазначених генів. Перший з них відповідає за синтез лістеріолізину О (LLO) – білка, що є відповідальним за стійкість збудника до фагосом і внутрішньоклітинне розмноження лістерій.

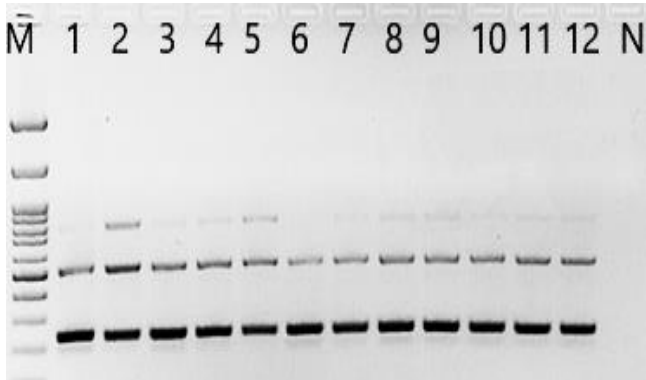


Рис. 3. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянок генів *inlA* (800 п.н.), *inlC* (517 п.н.) та *inlJ* (238 п.н) культур *L. monocytogenes*. М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

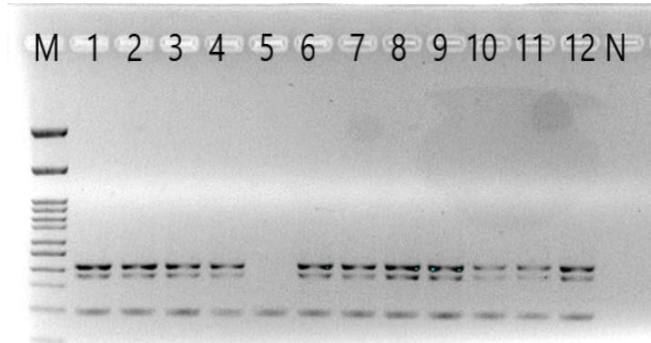


Рис. 4. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянок генів *actA* (431 п.н.), *hly* (372 п.н.) та *iap* (205 п.н) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Роль позаклітинного білку р60, що кодується геном *iap*, полягає у інвазії фагоцитів і також у розмноженні лістерій. [29]. Актиновий білок (ActA) є найбільш поширеним поверхневим секреторним бактеріальним білком, виявленим в інфікованих клітинах, який приймає участь у внутрішньоклітинному розмноженні лістерій і передачі збудника від клітини до клітини. [21]. Відповідно до отриманих результатів тільки ізолят, отриманий від абортплуду собаки, не містив гени *actA* та *hly*, що свідчить про його послаблені вірулентні властивості. Також досліджували наявність гена *plcB* (рис. 5), що є відповідальним за синтез специфічних фосфоліпаз С для підсилення лістеріолізину О, що в свою чергу сприяє більш ефективному лізису вакуолей фагоцитів [2, 27]. Виходячи з отриманих результатів всі лістерії мали ген *plcB*. Отже, за проведеними дослідженнями встановлено ПЛР-профілі культур *L. monocytogenes*, що зберігаються в колекції ННЦ «ІЕКВМ» (табл. 3).

Для виявлення факторів вірулентності, що пов'язані з окремими фрагментами гена *prs*: *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819 та ORF2110, проводили мультиплексну ПЛР (рис. 6). Ці фактори забезпечують надійне прикріплення бактерій до чутливих клітин. Також на основі зазначених маркерів було запропоновано методика визначення серотипу збудника, оскільки встановлення цього серологічними методами потребує вартісних моноклональних сироваток [14]. Так, якщо виявляють тільки ген *lmo0737*, то такий ізолят відносять до серотипу 1/2а або 3а, а наявність тільки гена ORF2819 — до 1/2b, 3b або 7. До серотипів 1/2с або 3с можна віднести лістерії, в яких виявлено гени *lmo0737* та *lmo1118*, а якщо ORF2819 та ORF2110 — до 4b, 4d або 4е [4, 7, 23].

За результатами цих досліджень встановлено, що тільки ізолят від ВРХ можна віднести до серотипу 1/2а або 3а, а всі інші мають однаковий профіль, який включає ділянки генів ORF2819 та ORF2110, тобто їх можна віднести до серотипів 4b, 4d або 4е.

Культури лістерій також досліджували за альтернативною методикою, яка включає детекцію генів *flaA* (*lmo_0690*), *LMOSLCC2372_0308* та *LMLG_0742*. Ген *flaA* кодує флагелін – джгутиковий протеїн, що дозволяє уникати протизапального ефекту викликаного контактом з Toll-like ресептор (TLR), тим самим забезпечуючи виживання та подальше розмноження збудника. Наявність цього гена свідчить про належність лістерії до серотипу 1/2а або 3а. Гени *LMOSLCC2372_0308* та *LMLG_0742* кодують гіпотетичні протеїни, функції яких ще не повністю визначені. За цими генами можна визначити приналежність до серотипу 1/2с або 3а відповідно [1].

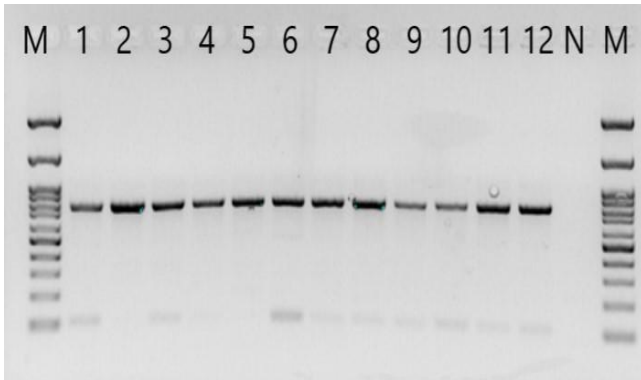


Рис. 5. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянки гена *plcB* (792 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

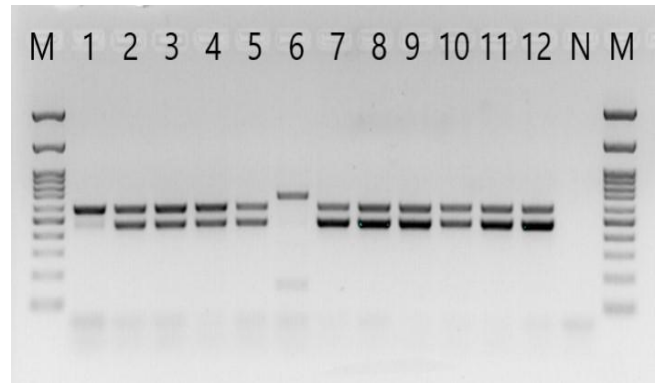


Рис. 6. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянки генів *lmo0737* (691 п.н.), *lmo1118* (906 п.н.), ORF 2819 (471 п.н.) та ORF 2110 (597 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Таблиця 3 — Результати ПЛР з досліджуваними ізолятами *L. monocytogenes* на виявлення відповідних таргентних ділянок.

№ з/п	Назва штаму	Маркери патогенності лістерій								
		<i>prs</i>	<i>inIB</i>	<i>inIA</i>	<i>inIC</i>	<i>inIJ</i>	<i>actA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>iap</i>
	Тернопіль	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	dolph	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Буринь	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Кріль 17	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Varja	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	61052	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/72	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/130	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/129	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/128	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/127	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: (+) – утворення специфічного амплікону; (-) – відсутність утворення специфічного амплікону.

Цю методику використовували для визначення серотипу ізоляту *L. monocytogenes* 61052, який на попередньому етапі за вмістом окремих генів віднесли до серотипа 1/2a або 3a. Результати цих досліджень показано на рис. 7. Таким чином, спостерігали чітке утворення амплікону розміром 538 п.н., що вказує на наявність гена *lm_0690* та належність ізоляту до серотипу 1/2a. Інші специфічні ділянки генів LMOSLCC2372_0308 та LMLG_0742 виявлені не були. За даною методикою також було досліджено решта культур лістерій, що були віднесені до серотипу 4b (4d, 4e). Виявилось, що вісім з них містили специфічну ділянку ділянці гена LMLG_0742 (рис. 8). Оскільки зазначена методика була розроблена для диференціації виключно серотипів 1/2a, 3a та 1/2c, наявність цієї ділянки в геномі наших архівних культур потребує додаткових досліджень. Разом з тим, раніше вже повідомлялося про те, що серотип 4b може мати нетиповий профіль за ПЛР [5, 10]. Отже, було виявлено, що 10 культур лістерій містять всі основні гени вірулентності, та належать до серотипу 4b (або 4d, або 4e) (табл. 4). Ще один ізолят, віднесений до цього серотипу та отриманий з абортплоду собаки, не має гени *actA* та *hly* або мутації не дозволяють повноцінно синтезувати їх *in vitro* обраними праймерами, що може бути предметом для подальших досліджень.

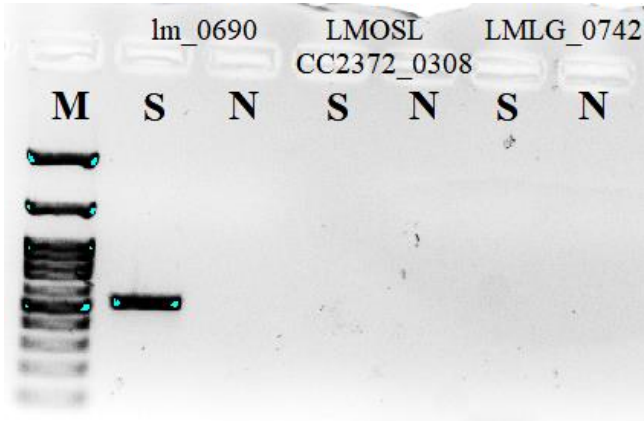


Рис. 7. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянок окремих генів lm_0690, LMOSLCC2372_0308 та LMLG_0742 культури *L. monocytogenes* 61052: М – маркер молекулярної ваги; S – зразок ДНК культури; N – деіонізована вода.

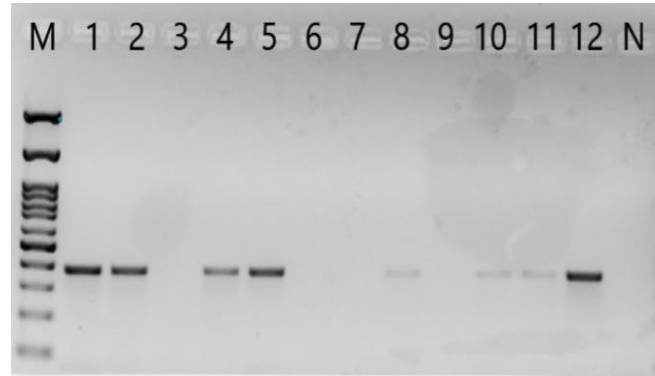


Рис. 8. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянки гена LMLG_0742 (388 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Патогенність *L. monocytogenes* доведена, зокрема за наявність групи інтерналінів, бактеріальних поверхневих білків відповідаючих за входження збудника в клітини, зокрема фаго- та гепатоцити і розповсюдження між клітинами.

Група, для якої збудники представляють потенційну загрозу, включає ДРХ, ВРХ, свиней, переважно вагітних самок, молоді тварини віком від 1,5 до 5 місяців, ослаблені неповноцінною годівлею чи хворобою тварини, а також різноманітні птахи, дрібні ссавці та навіть риба [3].

Таким чином, встановлено належність однієї культури лістерії до серотипу 1/2а, а інших – до 4b (або 4d, або 4e). Необхідно зазначити, що поліморфізм та виникнення мутацій у послідовностях генів сприяє адаптації до несприятливих факторів та може призводити до ослаблення вірулентності *L. monocytogenes* [24].

Таблиця 4 — Узагальнюючі дані за результатами ПЛР з метою визначення серотипу лістерій

№ з/п	Назва штаму	Гени <i>L. monocytogenes</i>								Серотип за ПЛР
		Lmo 0737	Lmo 1118	ORF 2819	ORF 2110	Lm 0690	LMO*	LML#	GLT	
1	Тернопіль	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
2	dolph	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
3	Буринь	-	-	+	+	-	-	-	-	4b, 4d, 4e
4	Кріль 17	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
5	Varja	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
6	61052	+	-	-	-	+	-	-	-	1/2a
7	1	-	-	+	+	-	-	-	-	4b, 4d, 4e
8	9/72	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
9	9/130	-	-	+	+	-	-	-	-	4b, 4d, 4e
10	9/129	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
11	9/128	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
12	9/127	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e

Примітки: * - LMOSLCC2372_0308; # - LMLG_0742; (+) – утворення специфічного амплікону; (-) – відсутність утворення специфічного амплікону.

Виходячи з цього, відсутність або наявність тих чи інших генів вірулентності може бути інструментом для підтвердження потенційної патогенності досліджуваних штамів, оцінки ризиків спалаху захворювання в господарствах, потенційного зараження людини через харчові продукти, отримані від інфікованих тварин [22, 25].

Раніше повідомлялося, що в Україні рівень захворюваності на лістеріоз серед тварин значно зріс у період 2011-2015 рр. При цьому випадки реєстрували в 10 областях (найбільший відсоток припадав на Житомирську та Дніпропетровську області) [31]. Ця тенденція може бути обумовлена відсутністю надійних вакцин проти лістеріозу та несвоєчасним виявленням джерела інфекції, що спонукає до більш детального вивчення циркулюючих ізолятів, проведення постійного моніторингу щодо лістеріозу тварин і розроблення дієвої системи контролю цієї інфекції.

Висновки. 1. Охарактеризовано 12 архівних культур *L. monocytogenes* з використанням молекулярно-генетичних методів. Встановлено, що всі культури містять фактори вірулентності *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB*, *hly*, *iap*, окрім двох – *L. monocytogenes* Varja, яка не містила *inlA*, та *L. monocytogenes* 61052, в якій не було виявлено *actA* і *hly*.

2. За допомогою відповідних протоколів ПЛР встановлено належність однієї культури лістерії до серотипу 1/2a, а інших – до 4b (або 4d, або 4e). Отримані дані можуть бути використані для вдосконалення діагностики лістеріозів тварин в Україні за рахунок створення високо специфічних антигенів.

Список літератури

1. Al-Ali H. J. (2018). Molecular detection of serotype groups of *Listeria monocytogenes* isolated from gallbladder of cattle and sheep in Iraq. *Veterinary World*. 2018. Vol. 11, No 4. P. 431–436. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.431-436>.
2. Alberti-Seguí C., Darren R., Higgins E. Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. *Cellular Microbiology*. 2007. Vol. 9. P. 179–184. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00780.x>.
3. Al-Ghanim A., Abbas B. Detection of *Listeria monocytogenes* in frozen food using a specific *inlB* virulence gene. *Journal of Physics: Conference Series*. 2021. Vol. 66. P. 328–333. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1879/2/022011>.
4. Boukili M. et al. Prevalence, characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from beef meat in Meknes city, Morocco. *Germs*. 2020. Vol. 10, No 2. P. 74–80. DOI: <https://doi.org/10.18683/germs.2020.1180>.
5. Camargo A. C. et al. Molecular Serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil Using PCR. *Journal of Food Protection*. 2016. Vol. 79, No 1. P. 144–147. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-294>.
6. Cao X. et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the blackheaded gull feces in Kunming, China. *Journal of Infection and Public Health*. 2018. Vol. 11. P. 59–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.03.003>.
7. Doumith M. et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. Vol. 42, No 8. P. 3819–3822. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.8.3819-3822.2004>.
8. Gandhi M., Chikindas M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. Vol. 113, No 1. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>.
9. Hingston P. et al. Genotypes associated with *Listeria monocytogenes* isolates displaying impaired or enhanced tolerance to cold, salt, acid, or desiccation stress. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8 P. 369–378. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00369>.
10. Huang B. et al. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011. Vol. 49. P. 426–429. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01207-10>.
11. Johnson J. et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. Vol. 70, No 7. P. 4256–4258. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.70.7.4256-4266.2004>.
12. Kasalica A. et al. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2011. Vol. 27, No 3. P. 1067–1082. DOI: <https://doi.org/10.2298/BAH1103067K>.
13. Nightingale K. *Listeria monocytogenes*: knowledge gained through DNA sequence-based subtyping, implications, and future considerations. *Journal of AOAC International*. 2010. Vol. 93, No 4. P. 1275–1286. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.4.1275>.
14. Kérouanton A. et al. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*. 2010. Vol. 80, No 2. P. 134–137. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.008>.
15. Leong D., Alvarez-Ordóñez A., Jordan K. (2014). Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Frontiers in Microbiology*. 2014. Vol. 5. P. 436. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00436>.
16. Liu D. et al. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*. 2007. Vol. 71, No 2. P. 133–140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007>.

17. Lopez-Valladares G. et al. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958-2010). *Epidemiology & Infection*. 2014. Vol. 142. P. 2251–2260. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0950268813003385>.
18. Matereke L., Okoh A. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence. A Review. *Pathogens*. 2020. Vol. 9, No 7. P. 528. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9070528>.
19. Momtaz H., Yadollahi S. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. *Diagnostic Pathology*. 2013. Vol. 8. P. 149. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-149>.
20. Moors M. A. et al. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 1999. Vol. 67, No 1. P. 131–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.67.1.131-139.1999>.
21. Moors M. A. et al. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 1999. Vol. 67, No 1. P. 131–139. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.67.1.131-139.1999>.
22. Muchaamba F. et al. Different shades of *Listeria monocytogenes*: strain, serotype, and lineage-based variability in virulence and stress tolerance profiles. *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 12 P. 792-811. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.792162>.
23. Nho S. W. et al. Identification of high-risk *Listeria monocytogenes* serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2015. Vol. 119, No 3. P. 845–852. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12876>.
24. Orsi R., Bakker H., Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011. Vol. 301, No 2. P. 79–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>.
25. Parussolo L. et al. Detection of virulence gene sandanti microbial susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from artisanal cheese produced in the Southern region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2021. Vol. 93, No 3. P. 207–208. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-376520210190200>.
26. Portnoy D. A. et al. Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. *Infection and Immunity*. 1992. Vol. 60, No 7. P. 2710–2717. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2710-2717.1992>.
27. Quereda J. J. et al. Role in virulence of phospholipases, listeriolysin O and listeriolysin S from epidemic *Listeria monocytogenes* using the chicken embryo infection model. *Veterinary Research*. 2018. Vol. 49. P. 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0496-4>.
28. Wiśniewski P. et al. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. *Pathogens*. 2022. Vol. 11, No 10. P. 1099. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11101099>.
29. Wuenschel M. D. et al. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of Bacteriology*. 1993. Vol. 175, No 11. P. 3491–3501. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3491-3501.1993>.
30. Yin Y. et al. A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates. 2019. *Nature Communications*. Vol. 10, No 1. P. 4283. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12072-1>.
31. Уховська Т. М. та ін. Моніторинг лістеріозу тварин та засоби його профілактики. *Ветеринарна медицина*. 2017. Т. 103 С. 222–226. URL: http://jvm.kharkov.ua/sbornik/103/3_50.pdf.

MOLECULAR GENETIC STUDIES OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATES FROM DIFFERENT ANIMAL SPECIES IN UKRAINE

Poliushko D. P., Stegnyy B. T., Marchenko N. V., Bolotin V. I.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

The PCR-profiles of 12 archival cultures of listeria isolated from different species of animals and stored in the collection of microorganisms of the NSC IECVM were determined. It was established that 10 isolates have genes *prs*, *inlB*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB*, *hly*, *iap*, which characterizes them as highly virulent. The *L. monocytogenes* 61052 isolate did not contain the *inlA* gene, and the *actA* and *hly* genes were not detected in *L. monocytogenes* Varja. Using PCR, it was also established that 11 studied cultures belong to serotypes 4b, 4d, 4e, as well as one isolate to 1/2a. The obtained data can be used to improve the diagnosis of animal listeriosis in Ukraine due to the creation of highly specific antigens

Keywords: listeriosis, polymerase chain reaction, virulence factors

ВИВЧЕННЯ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ТА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ ЗБУДНИКІВ ІМУНОДЕФІЦИТУ І СПУМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*Горбатенко С. К., Рудова Н. Г., Корнєйкова О. Б., Стегній М. Ю.,
Коваленко Л. В., Кузнецова О. В., Мягких Н. В.*

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: st.gorbatenko@gmail.com*

На підставі аналізу даних МЕБ та світової наукової літератури вивчено розповсюдження спумавірусної інфекції та імунодефіциту великої рогатої худоби у тваринництві світу, а на підставі власних досліджень у тваринництві України. Вивчена адаптаційна здатність польових ізолятів збудників мінорних інфекцій до гомологічних, для великої рогатої худоби, культур клітин, генетична особливість збудників, ізольованих в різних регіонах України, вплив польових ізолятів збудника при їх інокуляції в організм на моделі лабораторних тварин на гематологічному, молекулярно-генетичному та біохімічному рівні

Ключові слова: *мінорні інфекції, культура клітин, гематологічні та біохімічні дослідження*

Прибутковості тваринництва країн з розвинутою галуззю скотарства чинять перепону ряд хронічних вірусних інфекційних захворювань, збудники яких, обумовлюючи імуносупресивну дію, знижують ефективність засобів специфічної профілактики, рівень продуктивності та якості тваринницької продукції, загальної резистентності поголів'я. До них відноситься лейкоз, імунодефіцит, спумавірусна інфекція. Збудники вищезазначених захворювань є генетично та антигенно спорідненими ретровірусами, що, вражаючи велику рогату худобу, обумовлюють повільний перебіг хвороби [1–2].

Вищенаведені повільні, або мінорні, інфекції становлять загрозу здоров'ю поголів'я тварин та якості тваринницької продукції як при їх перебігу у формі моноінфекцій, так і при асоційованому прояві, причому, останній варіант є більш небезпечним. Окрім того, вказані ретровіруси несуть потенційно небезпечну медико-соціальну загрозу, оскільки є структурно близькими до збудників СНІД та Т-клітинного лейкозу людини [3–4].

Вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (BIV) є лентівірусом, його персистенція в організмі інфікованих тварин викликає збільшення лімфатичних вузлів, лімфоцитоз, ураження центральної нервової системи, прогресуючу слабкість і виснаження тварин. Крім того, є свідчення, що BIV може призвести до імуносупресії, що спонукає прояв вторинних бактеріальних інфекцій та розвиток енцефаліту. Відомо, що BIV-інфекція може обумовлювати екзальтацію інфекційного процесу, викликаного вірусом лейкозу великої рогатої худоби (BLV).

Стосовно спумавірусної інфекції ВРХ, збудник якої передається при тісному контакті тварин або перинатальним шляхом, а саме при випоюванні молозива або молока, встановлено, що пінистий вірус великої рогатої худоби (BFV) виявляється в лейкоцитах периферійної крові, клітинах молока та слині худоби. Є підстави вважати негативним вплив продуктів метаболізму збудника за умов вживання тваринницької продукції від інфікованого поголів'я. [4–7].

При вивченні рівня розповсюдження мінорних інфекцій великої рогатої худоби у тваринництві України та біологічних властивостей польових ізолятів збудників, а саме BIV та BFV, передбачалось ряд етапів наукового пошуку — вивчення епізоотичної ситуації з повільних інфекцій великої рогатої худоби в тваринництві світу та України, генетичних особливостей збудників повільних інфекцій, що циркулюють на території України, адаптаційної здатності польових ізолятів збудників повільних інфекцій до культур клітин, гомологічних ВРХ. Окремим завданням передбачалось дослідити на клітинно-гуморальному та біохімічному рівні вплив збудників повільних інфекцій на організм тварин та визначити тенденцію розвитку епізоотичної ситуації з повільних інфекцій ВРХ у тваринництві України і напрями їх контролю.

Мета досліджень. Встановити епізоотичну ситуацію у тваринництві України стосовно спумавірусної інфекції та імунodefіциту великої рогатої худоби, вивчити біологічні властивості польових ізолятів збудників вищезазначених мінорних захворювань.

Матеріал і методи. З метою визначення розповсюдження збудників імунodefіциту та пінистого вірусу великої рогатої худоби в господарствах країн світу проведено аналіз баз даних Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ), національних баз даних з безпеки та якості тваринницької продукції країн Північної Америки, Європи, Азії. При вивченні поширення збудників мінорних інфекцій в тваринницьких господарствах різних областей України вибірково відбирали 10-15 проб стабілізованої крові від корів 12 господарств областей центрального і східного регіонів України.

Молекулярно-генетичні дослідження з індикації генетичного матеріалу збудників BIV, BFV та BLV проведени в умовах лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ» за допомогою полімеразразної ланцюгової реакції у реальному часі згідно з рекомендаціями розробників відповідних праймерів (Materniak M. et al., 2016). Для детекції провірусної ДНК BFV використано системи праймерів Int1-Int2 (зовнішня пара, довжина ампліфікованого продукту становить 430 пар нуклеотидів (п.н.)) та Int3-Int4 (внутрішня пара, довжина ампліфікованого продукту 221 п.н.) шляхом «гніздового» варіанту ПЛР згідно з рекомендаціями розробників (Materniak M. et al., 2016).

З метою детекції провірусної ДНК BIV використано пару праймерів RT_+(-), яка фланкує консервативний домен зворотної транскриптази (довжина ПЛР-продукту становить 495 п.н.), та пара праймерів BIV_PoI_+(-), яка фланкує ген *poI* вірусу імунodefіциту ВРХ (довжина ПЛР-продукту становить 235 п.н.). Ампліфікацію проведено шляхом стандартного варіанту ПЛР згідно з рекомендаціями розробників (Moody C.A. et al., 2002).

Для виявлення провірусної ДНК вірусу лейкозу ВРХ використана пара праймерів BLV-*env*_3-4 згідно з рекомендаціями МЕБ (Fechner et al., 1996), яка фланкує фрагмент гена *env* BLV довжиною 444 п.н. Зворотну транскрипцію та отримання кДНК проведено з використанням ревертази MMLV згідно з рекомендаціями виробника. Ампліфікацію проведено на ампліфікаторі Biometra (США). Візуалізацію результатів ПЛР-аналізу проведено шляхом горизонтального гелелектрофорезу у (1,5-2) %-ому агарозному гелі.

Множинне вирівнювання обраних послідовностей гена *env* ВЛ ВРХ проводили за допомогою програми Bioedit, v. 7.0.0, модулю ClustalW програми Mega 4. Для проведення філогенетичного аналізу використовували програму Mega 4, v. 4.0.2 [8]. Для побудови традиційних дендрограм використовували дистанційно-матричний метод — метод зв'язування найближчих сусідів (Neighbour joining).

Для вивчення адаптаційної здібності польових ізолятів мінорних інфекцій до гомологічних культур клітин кожну пробу стабілізованої крові розводили до співвідношення 1:1 забуференим фізіологічним розчином з додаванням пеніциліну 100 ОД/см³, рН 7,2, потім нашаровували по 8 см³ на розчин триомбразу з щільністю 1,075, який попередньо розливали у центрифужні пробірки по 2 см³. Після центрифугування в режимі 1000 об./хв. протягом 40 хвилин відбирали шар лімфоцитів в окрему пробірку, після чого відмивали 1 раз забуференим фізіологічним розчином з додаванням пеніциліну в режимі 1000 об./хв., 10 хвилин та 1 раз середовищем Ігла у вищезазначеному режимі. Об'єм суспензії лімфоцитів доводили до 10 см³ середовищем Ігла для підрахунку кількості живих клітин за допомогою 0,1 % розчину трипанового синього.

Отримана суспензія лімфоцитів пройшла перевірку на стерильність з використанням бактеріологічних середовищ МПА, МПБ, ТЮ. Для стимулювання продукції вірусу проводили короткострокове культивування лімфоцитів, концентрація живих лімфоцитів складала 3-3.5 x 10⁶ одиниць/см³ на середовищі, до складу якого входить 90 % середовища Ігла, 10 % нативної сироватки ВРХ і 100 ОД/см³ пеніциліну.

Для зараження використано дві перещеплювані культури клітин — легені ембріона корови (ЛЕК) та коронарні судини теляти (КСТ). Вищезазначені культури клітин були отримані з банку культур, що зберігається на базі лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ», на рівні 2 пасажу. Проведена адаптація культур впродовж 4-5 пасажів, після чого культури клітин на рівні 24-48 годин росту з 50-75 % виповнення моношару були піддані інфікуванню досліджуваними ретровірусами шляхом заміни ростового середовища на суміш ростового з суспензією короткостроково культивованих лімфоцитів у співвідношенні 1:1. Пересів культур проводився по

мірі виконання моношару, в середньому кожні 4-5 діб. В якості контролю виступали ємності з неінфікованими культурами клітин ЛЕК та КСТ.

Кожен пасаж контролювався щодня візуально та з використанням світлової мікроскопії. На рівні третього і кожного п'ятого пасажів проби піддавали дослідженню молекулярно-генетичним методом (ПЛР) для виявлення генетичного матеріалу збудників.

При визначенні впливу збудника мінорних інфекцій на організм лабораторних тварин (на моделі кролів) вивчали зміни у чисельності лейкоцитарної фракції дослідних тварин, чисельність та співвідношення клітинних елементів лейкоцитарної фракції у мазках, підданих фарбуванню за Романовським-Гімза, а саме плазмоцитів, лімфоцитів, сегментоядерних гранулоцитів - еозинофілів, базофілів, нейтрофілів, атипових та молодих форм вищезазначених клітин. У динаміці вивчали рівень гемоглобіну гематинним методом по Салі та швидкості осадження еритроцитів (ШОЕ).

Біохімічні дослідження сироватки крові проводили з визначенням стартових показників стосовно рівня загального білку спектрофотометрично, білкового профілю (альбуміни, глобуліни) — за допомогою стандартних наборів реактивів виробництва фірми «Реагент» (Україна). Визначали концентрацію неспецифічних циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси — за методом Гриневича та Алферова, серомукоїдів — за методом Веймера та Мошина.

Результати досліджень. За матеріалами МЕБ та повідомлень світової наукової літератури інфіковані вірусом бичачого імунодефіциту тварини реєструються у багатьох країнах світу, водночас, нерідко реєструється асоційована інфікованість за участю як збудника інфекційного імунодефіциту, так і лейкозу великої рогатої худоби. Варто зауважити, що при серологічному дослідженні великої рогатої худоби в різних країнах на імунодефіцит за матеріалами окремих наукових публікацій виявлена значна розповсюдженість захворювання у тваринництві світу. Так, в США серопозитивність спостерігали на рівні 4 %, в Нідерландах — 1,4 %, в Канаді — 5,5 %, в Германії — 6,6 %, у Франції — 4 %. Імунодефіцит за наслідками лабораторних досліджень встановлено у Великобританії, Швеції, Коста-Ріці, Венесуелі, Новій Зеландії та Австралії. Наявність серопозитивної худоби по відношенні до здорової становила, у більшості випадків, 1-7 %. Однак в окремих стадах з хронічним перебігом захворювання (стаціонарність епізоотії) рівень інфікованості сягав до 50 %. Із 64 % серопозитивних до ВБІ-збудника тварин з лімфосаркомою, лімфаденопатією та іншими порушеннями 74 % були інфіковані саме збудником імунодефіциту. За матеріалами окремих авторів, інфекційний імунодефіцит ВРХ реєструється в Японії, Франції, Канаді, Ірані, Аргентині, Германії, Нідерландах, Італії, Бразилії, Туреччині, Камбоджі, Пакистані, Австралії, водночас, рівень інфікованості від 1 до 50 % та більше. Матеріали, що висвітлені у літературі, свідчать, що від 30 до 45 % ВРХ серопозитивні до збудника спумавірусної інфекції, а викликана ним інфекція розповсюджена в усьому світі.

Вибірковими дослідженнями проб крові ряду тваринницьких господарств центрального та східного регіону областей України встановлено, з використанням молекулярно-генетичних методів, наявність генетичного матеріалу ВІV та ВFV збудників. Результати вибіркового досліджень наведені у таблиці 1. Зауважимо, що у значній чисельності випадків інфікування тварин обумовлюється асоціацією збудників лейкозу, імунодефіциту та спумавірусної інфекції великої рогатої худоби.

Таблиця 1 — Результати молекулярно-генетичного дослідження проб крові великої рогатої худоби

Область	Господарство	n	Виявлено генетичний матеріал		
			BLV	BFV	BIV
Кіровоградська	№1	10	1	2	1
Полтавська	№2	15	4	1	-
Сумська	№3	10	-	1	1
Черкаська	№4	15	2	1	-
Харківська	№5	15	-	-	1
	№6	15	3	2	-
	№7	10	-	1	-

З метою виконання етапу, який передбачав вивчення генетичних особливостей збудників мінорних інфекцій, що циркулюють в межах тваринницьких господарств України, був проведений попередній пошук щодо наявності у міжнародних базах даних послідовностей основних генів (або їх фрагментів) збудників повільних інфекцій, ізольованих від поголів'я великої рогатої худоби різних регіонів України. За результатами даного інформаційного пошуку було сформовано електронну базу даних, яка містила 28 послідовностей генів *env* та *pol* ізолятів вірусу лейкозу ВРХ, циркулюючого у господарствах різних областей України. Відповідні дані стосовно збудників інших повільних інфекцій ВРХ (вірусу імунодефіциту та спумавірусу ВРХ) були відсутні.

На цей час вивченню генетичної варіабельності та генетичних особливостей ВЛ ВРХ приділяють значну увагу внаслідок можливої ролі різних варіантів вірусу у розвитку інфекційного процесу [9]. Найбільш докладні дані стосовно мінливості отримані для гена *env* ВЛ ВРХ, описано декілька його типів, що визначають генотип вірусу та його імуногенність [10]. Крім того, ймовірно, ген *env* визначає ступінь інфекційності певного ізоляту ВЛ ВРХ. Зважаючи на це, був проведений аналіз генетичних особливостей ізолятів ВЛ ВРХ з 7 областей України шляхом філогенетичного аналізу на основі послідовностей саме цього гена. На рисунку 1 представлено реконструкцію філогенетичних взаємовідносин ізолятів ВЛ ВРХ, циркулюючих у тваринницьких господарствах Сумської, Київської, Чернігівської, Харківської, Кіровоградської та Рівненської областей України.

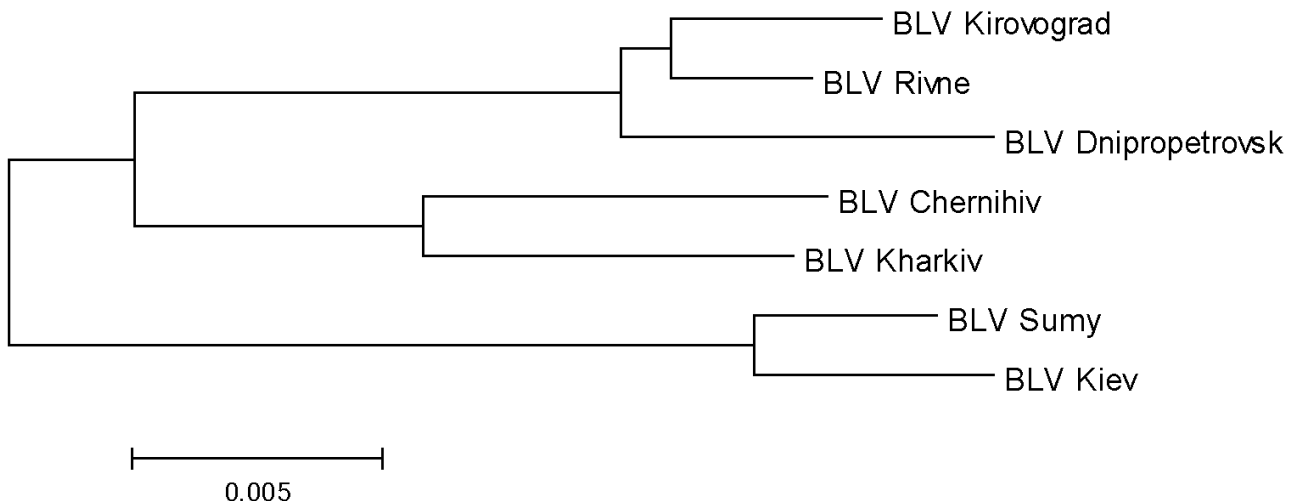


Рис. 1. Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що циркулюють у різних регіонах України

За результатами проведеного аналізу топології побудованого філогенетичного дерева встановлено, що послідовності ген *env* утворюють 3 чітких кластери, що свідчить про циркуляцію, принаймні, трьох генотипів ВЛ ВРХ на території України.

Мікроскопічні дослідження перещеплюваних культур клітин, що були інфіковані польовими ізолятами збудників мінорних інфекцій, свідчать, що додавання короткостроково культивованих лімфоцитів не викликало деструктивних змін морфології клітин обох ліній. Клітини моношару розміщувались щільно, з чітко вираженими кордонами, в цитоплазмі спостерігалась незначна кількість вакуолей, ядра мали типову овальну форму. Після 1 пасажу ще частково зустрічались лімфоцити, але вже після 2 пасажу лімфоцити під час мікроскопії не виявлялись.

Спостереженнями за станом моношару культур клітин (ЛЕК+ВІВ) та (ЛЕК+ВІВ), на рівні 1, 2 та 3 пасажів встановлено задовільне заповнення моношару, морфологічно клітини експериментальної культури були подібні контрольним, за результатами ПЛР на рівні 3 пасажу була відмічена наявність генетичного матеріалу ВІВ та ВІВ в клітинах моношару. На 4–6 пасажах в експериментальній культурі клітин спостерігалась морфологічна деструкція клітин з ознаками симпластоутворення — в культурі зустрічались збільшені клітини з двома або трьома ядрами, клітини моношару знімали зі скла утруднено з використанням суміші версен-трипсину.

На рівні 7, 8 пасажів картина стану моношару залишалась подібною, при цьому відмічалось різке збільшення кількості відмерлих клітин в культуральній рідині.

Для детального вивчення морфології інфікованих клітин ЛЕК виконували висіви клітинної суспензії у пробірки з покривними скельцями за загальноприйнятим методом, після утворення моношару забарвлювали клітини культури за Романовським-Гімзе, при цьому спостерігали більш інтенсивне забарвлення в навколядерній зоні.

Всього було виконано по 15 пасажів культури (ЛЕК+BIV) та (ЛЕК+BFV), генетичний матеріал збудників імунodefіциту та спумавірусної інфекції ВРХ за результатами ПЛР ще фіксувався на рівні 10 пасажу. Молекулярно-генетичне дослідження культури клітин в ПЛР на рівні 13 та 15 пасажів показали негативний результат.

Дослідженням щодо можливості інтеграції польових форм збудників повільних інфекцій імунodefіциту ВРХ (BIV) та пінистого вірусу ВРХ (BFV) в перещеплювану культуру клітин КСТ встановлено більш низьку, у порівнянні з культурою клітин ЛЕК, чутливість клітин цієї культури до вірусів сімейства *Retroviridae*. За результатами ПЛР на рівні 3 пасажу була виявлена наявність генетичного матеріалу BIV та BFV в клітинах моношару культури КСТ і вже на цьому рівні культивування спостерігали багаточисельну вакуолізацію в клітинах зараженого моношару (КСТ+BFV) та деструктивні зміни в стані моношару, які виражались в його частковому руйнуванні з утворенням чисельної кількості відмерлих клітин. На рівні 4 та 5 пасажів вакуолізація та синцитійутворення спостерігалось в більшій частині (70-80 %) клітин моношару. Всього було проведено 7 пасажів. На рівні 5 пасажу за результатами ПЛР ще відслідковувалася наявність генетичного матеріалу збудників ретровірусних інфекцій, а матеріал 7 пасажу дав негативний результат.

Гематологічні показники через 30 днів після інокуляції дослідній групі кролів генетичного матеріалу спумавірусу вказують на збільшення кількості лейкоцитів (до $9.8-9.9 \times 10^3/\text{мл}$). Зважаючи на розрахунки лейкоцитарної формули, відбулось це за рахунок підвищення кількості паличкоядерних гранулоцитів, також незначною мірою збільшилися показники гемоглобіну у всіх кролів дослідної групи (до 15-17 г/дл) в порівнянні з контрольною групою, в якій таких змін гематологічних показників не спостерігалось, виростили показники швидкості осідання еритроцитів до 3-4 мм на годину. Подібні зміни характерні для запальних процесів. У наступному гематологічні показники крові дослідної групи кролів (лейкоцити, гранулоцити, ШОЕ) відновились до рівня початкових величин. Це свідчить про те, що наявність збудника спумавірусної інфекції в організмі кролів суттєво не впливає на гематологічні показники їх крові, хоч звертає на себе увагу перерозподіл елементів лейкоцитарної фракції у бік значного (до 80-88 %) збільшення співвідношення лімфоцитів, що свідчить про розвиток імуносупресивного стану в організмі дослідних тварин.

Аналіз отриманих результатів біохімічних досліджень свідчить, що після зараження кролів спумавірусом виражені зміни досліджених показників відбулись через 39 діб, коли спостерігалась тенденція до підвищення рівня загального білку на 9,4 % загалом за рахунок підвищення глобулінової фракції, вміст якої збільшився на 17,4 % та зниження концентрації ЦІК (циркулюючих імунних комплексів) на 8,6 % порівняно з відповідними показниками контрольної групи. При цьому статистично вірогідне підвищення встановлено щодо рівня серомукоїдів — на 21,2 %.

Через 60 діб після зараження спостерігали зниження концентрації ЦІК на 22,2 % ($p \leq 0,05$) та тенденцію до зниження серомукоїдів (на 6,5 %) порівняно з показниками контролю. Під час останнього взяття крові (97 доба досліду) встановлено статистично вірогідне зниження концентрації ЦІК та підвищення рівня серомукоїдів на 21,5 % та 17,6 % відповідно, а також тенденцію до зниження рівня глобулінів, яке склало 15,5 %. Беручи до уваги біологічну роль досліджених біомаркерів неспецифічного імунітету (ЦІК середньої молекулярної маси є індукторами клітинної ланки, а серомукоїди — супресорами гуморальної ланки вродженого імунітету), можна зробити висновок, що експериментальне зараження кролів спумавірусом викликає незначну активізацію імунної системи через 30 діб після інфікування, яке змінюється вираженим пригніченням функціонального стану обох ланок неспецифічного імунітету у наступні 60 діб досліду (період дослідження).

Висновки. 1. Збудники повільних інфекцій великої рогатої худоби, а саме лейкозу, імунодефіциту та спумавірусної інфекції (BLV, BIV, BFV), згідно класифікації віднесені до сімейства *Retroviridae*, мають широке розповсюдження в тваринницьких господарствах світу.

2. Вибірковими дослідженнями проб крові великої рогатої худоби господарств областей центрального та східного регіонів України з використанням молекулярно-генетичних методів встановлено наявність генетичного матеріалу BLV, BIV та BFV збудників. У ряді випадків спостерігається асоціативний характер інфікування тварин декількома збудниками повільних інфекцій.

3. Збудники повільних інфекцій великої рогатої худоби, а саме імунодефіциту та спумавірусної інфекції великої рогатої худоби (BIV та BFV), спроможні інтегрувати в культури клітин гомологічного для великої рогатої худоби типу, що підтверджується результатами молекулярно-генетичних методів досліджень (ПЛР).

4. Експериментальне зараження кролів спумавірусом викликає незначну активізацію імунної системи через 30 діб після інфікування, яке змінюється у подальшому вираженим пригніченням функціонального стану неспецифічного імунітету

Перспективи подальшого використання отриманих результатів. Накопичення вірусного матеріалу збудників маловивчених мінорних інфекцій (спумавірусу та імунодефіциту) з використанням гомологічних для великої рогатої худоби культур клітин з метою розробки вітчизняних серологічних засобів діагностики

Список літератури

1. Колотвин В. В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота: индикация инфекции и распространённость в хозяйствах Российской Федерации : автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Москва, 2007.
2. Красников Е. С. Эпизоотическая ситуация по вирусному иммунодефициту крупного рогатого скота в городе Саратове и Саратовской области. *Вестник ветеринарии*. 2011. Т. 59, № 4. С. 70–71.
3. Супотницкий М. В. Эволюционная патология. К вопросу о месте ВИЧ-инфекции и ВИЧ/СПИД-пандемии среди других инфекционных, эпидемических и пандемических процессов. Москва : Вузовская книга, 2009. 400 с.
4. Meas S. et al. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet Microbiol*. 2002. Vol. 84. P. 275–282. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00458-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00458-8).
5. Romen F. et al. Serological detection systems for identification of cows shedding bovine foamy virus via milk. *Virology*. 2007. Vol. 364, No 1. P. 123–131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.009>.
6. Murray S. M. et al. Expanded tissue targets for foamy virus replication with simian immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *J Virol*. 2006. Vol. 80, No 2. P. 663–670. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.80.2.663-670.2006>.
7. Orr K. A., O'Reilly K. L., Scholl D. T. Estimation of sensitivity and specificity of two diagnostics tests for bovine immunodeficiency virus using Bayesian techniques. *Preventive veterinary medicine*. 2003. Vol. 61, No 2. P. 79–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.08.001>.
8. Tamura K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007. Vol. 24, No 8. P. 1596–1599. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
9. Asfaw Y. et al. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch Virol*. 2005. Vol. 150, No 3. P. 493–505. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0433-5>.
10. Rodriguez S. M. et al. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *J Gen Virol*. 2009. Vol. 90, Pt. 11. P. 2788–2797. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.011791-0>.

STUDY THE DISTRIBUTION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FIELD ISOLATES OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY AND SPUMAVIRUS INFECTION PATHOGENS

**Gorbatenko S. K., Rudova N. G., Kornieikova O. B., Stegnyy M. Yu.,
Kovalenko L. V., Kuznetsova O. V., Miahkykh N. V.**

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Based on the analysis of OIE data and world scientific literature, the spread of spumavirus infection and bovine immunodeficiency in livestock production worldwide, and on the basis of our own research in Ukrainian livestock production was studied. The adaptive ability of field isolates of minor infections to homologous cell cultures for cattle, genetic characteristics of pathogens isolated in different regions of Ukraine, the effect of field isolates of the pathogen when inoculated into the body of laboratory animal models at the hematological, molecular genetic and biochemical levels have been studied

Keywords: *minor infections, cell culture, hematological and biochemical studies*

4. ЯКІСТЬ І БЕЗПЕЧНІСТЬ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА. ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНА ЕКСПЕРТИЗА. ВЕТЕРИНАРНА ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ТОКСИКОЛОГІЯ

УДК 619:579:636.5.085.3(477)

DOI 10.36016/VM-2023-109-12

БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ ПТИЦІ (КУРИ, ІНДИКИ) ТА КОМБІКОРМІВ ДЛЯ ЇХ ГОДІВЛІ В УКРАЇНІ

Музика Н. М., Майборода О. В., Ечкенко Р. В., Рула О. М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: muzykanat@gmail.com

У статті представлено результати досліджень, здійснених протягом 2021 р. щодо циркуляції бактеріальних патогенів серед сільськогосподарської птиці (кури, індики) з промислових та присадибних господарств України, а також мікробіологічну забрудненість кормів та компонентів для їх виготовлення. Від курей з птахогосподарств різних форм власності було виділено 138 ізолятів бактеріальних культур, від індиків різного віку з присадибних господарств — 12 культур мікроорганізмів. У птиці встановлено циркуляцію широкого спектру мікроорганізмів з родин *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Mycoplasmataceae*, зокрема було виділено три ізоляти збудника токсикоінфекцій — *Salmonella Enteritidis*. 31,4 % (16 проб з 51 досліджених) комбікормів та їх складових не відповідали критеріям якості та безпечності. Основними бактеріальними контамінантами комбікормів були умовно патогенні мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterococcaceae* та *Staphylococcaceae*. Крім того, із однієї проби корму ізольовано культуру *Salmonella spp.* У перспективі подальші дослідження можуть бути направлені на роль природного резервуару збудників (зокрема свійської та дикої птиці) у формуванні антибіотикорезистентних форм бактерій

Ключові слова: бактеріальні хвороби, контамінація, корми

Інфекційні захворювання неможливо повністю викоринити, причому це стосується як гуманної, так і ветеринарної медицини. Не дивлячись на значні зусилля вчених з усього світу щодо вивчення як самих збудників, так і їх біологічних властивостей, розробку сучасних засобів ранньої діагностики та специфічної профілактики, спалахи інфекційних захворювань реєструються постійно, у тому числі і зоонози. Поширення патогенів від тварин до людини визнано основною причиною нових інфекційних захворювань і є причиною останніх пандемій [1–3]. Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (WOAH) разом з Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO), Продовольчою та сільськогосподарською організацією Об'єднаних Націй (FAO), Програмою ООН з навколишнього середовища (UNEP) нещодавно опублікували позиційний документ із закликом до підвищення профілактики поширення зоонозів у рамках тріади: запобігання пандемії, готовність та реагування [4]. Наголошується саме необхідність зменшення ризиків поширення зоонозних хвороб безпосередньо у джерелах інфекції, тому єдиним виходом є проведення постійного моніторингу за циркуляцією патогенів.

Метою нашої роботи було дослідити циркуляцію бактеріальних патогенів серед сільськогосподарської птиці (кури, індики) з промислових та присадибних господарств України, а також встановити рівень мікробіологічної забрудненості кормів та компонентів для їх виготовлення.

Матеріали і методи. Усі бактеріологічні дослідження проводили згідно із загальноприйнятими методиками з використанням стандартних поживних середовищ. Для виділення бактеріальних культур використовували поживні середовища для культивування та попередньої ідентифікації ентеробактерій: м'ясо-пептонний агар та м'ясо-пептонний бульйон із

додаванням 1,0 % глюкози та 10,0 % сироватки великої рогатої худоби (ВРХ), середовище Кода, селенітовий бульйон, середовище Ендо, SS-агар, вісмут-сульфітний агар, середовище Клігlera або Олькеницького. З метою остаточної ідентифікації вивчали біохімічні властивості виділених ентеробактерій за допомогою короткого «строкатого» ряду Гісса та проводили серологічну ідентифікацію — реакцію аглютинації (РА) із специфічними сальмонельозними та колібактеріозними сироватками. Для культивування та ідентифікації стафілококів нами були використані наступні середовища: м'ясо-пептонний агар та м'ясо-пептонний бульйон із додаванням 1,0 % глюкози та 10,0 % сироватки ВРХ, м'ясо-пептонний агар із додаванням крові ВРХ (10 %), плазма крові кроля. Для культивування культур мікоплазм застосовували середовище Едварда, виготовлене за стандартною методикою [5, 6].

Результати досліджень. Бактеріологічні дослідження проведено протягом 2021 року у птахогосподарствах Харківської, Донецької та Волинської областей України. Було досліджено 243 голови птиці різного віку, а саме: 65 дорослих курей, 158 курчат та 20 індиків. Установлено циркуляцію широкого спектру збудників бактеріальних інфекцій. Від курей з птахогосподарств різних форм власності було виділено 138 ізолятів бактеріальних культур (рис. 1). У птиці з промислових господарств ізольовано 101 культуру з родин *Enterobacteriaceae* (89,37 %), *Staphylococcaceae* (4,42 %), *Enterococcaceae* (3,54 %), *Clostridiaceae* (1,77 %), *Mycoplasmataceae* (0,9 %).



Рис. 1. Відсоткове співвідношення родин бактеріальних ізолятів з птахогосподарств різних форм власності.

Аналізуючи видовий склад ізольованих збудників з родини *Enterobacteriaceae*, виявлено, що рід *Escherichia spp.* склав 88,1 %; *Enterobacter spp.* — 6,0 %; *Proteus spp.* — 3,9 %; *Providencia spp.* — 1,0 %, *Salmonella Enteritidis* — 1,0 %. За дослідження курей з дрібних птахівничих господарств, у тому числі присадибних, виділено 37 культур бактерій з родин *Enterobacteriaceae* (92,6 %), *Pseudomonadaceae* (3,7 %), *Clostridiaceae* (3,7 %). Під час аналізу видового складу мікроорганізмів з родини *Enterobacteriaceae* встановлено, що *Escherichia spp.* склала 80,0 %; *Enterobacter spp.* — 12,0 %; *Proteus spp.* — 4,0 %; *Salmonella Enteritidis* — 4,0 % (рис. 2).

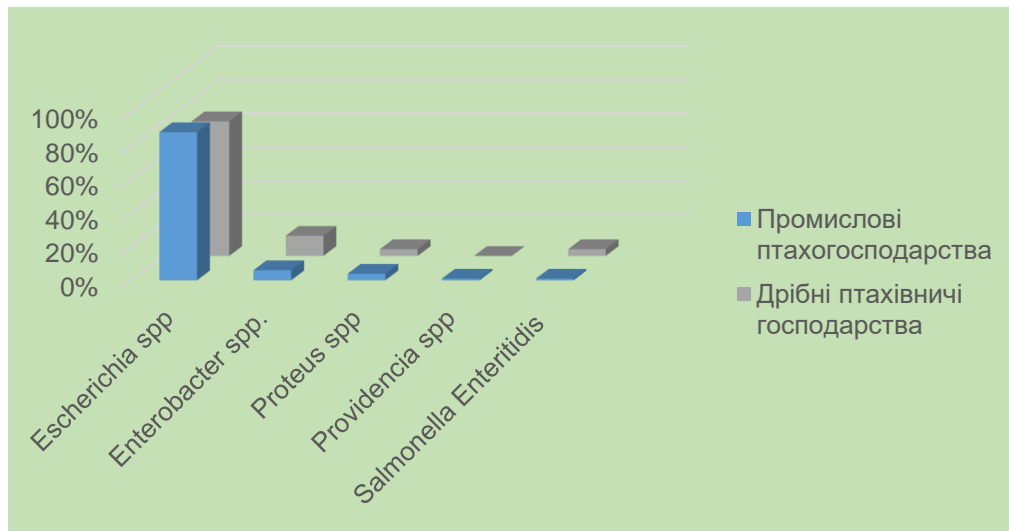


Рис. 2. Відсоткове співвідношення родів родини ентеробактерій від сільськогосподарської птиці з птахогосподарств різних форм власності.

Під час бактеріологічних досліджень індиків різного віку з присадибних господарств ізолювано 12 культур мікроорганізмів з родини *Enterobacteriaceae* — *Escherichia spp.* (50,0 %); *Klebsiella spp.* (16,7 %); *Proteus spp.* (16,7 %); *Enterobacter spp.* (8,3 %); *Citrobacter spp.* (8,3 %) (рис. 3).

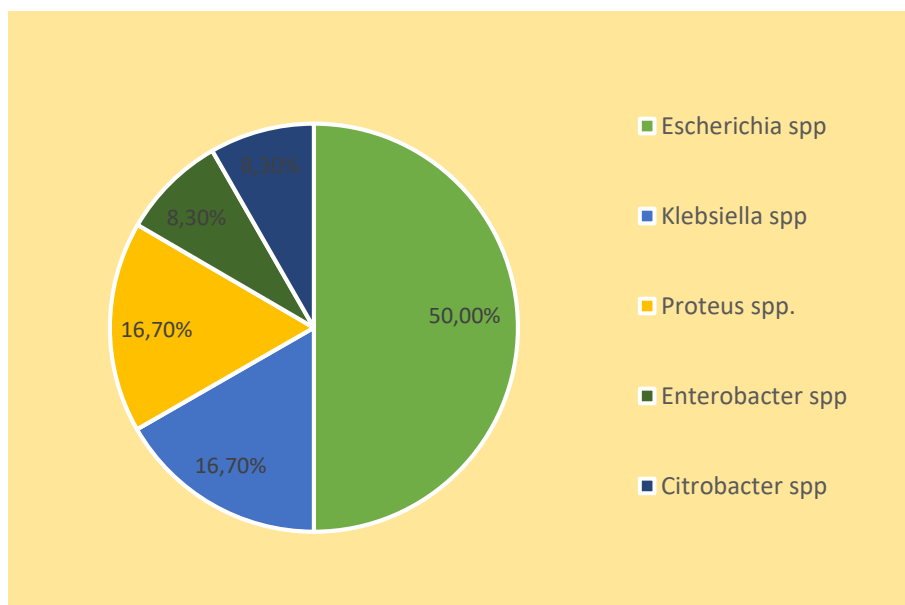


Рис. 3. Співвідношення різних родів мікроорганізмів з родини *Enterobacteriaceae*, ізолюваних з біологічного матеріалу від індиків.

Також протягом 2021 року було проведено бактеріологічне дослідження 51 проби кормів та компонентів для їх виготовлення, які надійшли з Волинської, Донецької, Дніпропетровської, Запорізької, Полтавської та Харківської областей України. Виявлено, що 16 проб не відповідали вимогам Наказу МінАППУ № 131 від 19.03.2012 р. із змінами № 550 від 11.10.2017 — 15 зразків за показником загальної бактеріальної забрудненості (29,4 %) та 16 зразків – за загальною кількістю ентеробактерій (31,37 %). За показником наявності сульфітредукуючих клостридій усі досліджені проби відповідали вимогам Наказу (збудників ізолювано не було). У цілому встановлено, що основними контамінантами комбікормів були умовно-патогенні мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae* (52,5 %), *Bacillaceae* (41,25 %), *Pseudomonadaceae* (3,75 %), *Enterococcaceae* (1,25 %) та *Staphylococcaceae* (1,25 %) (рис. 4).

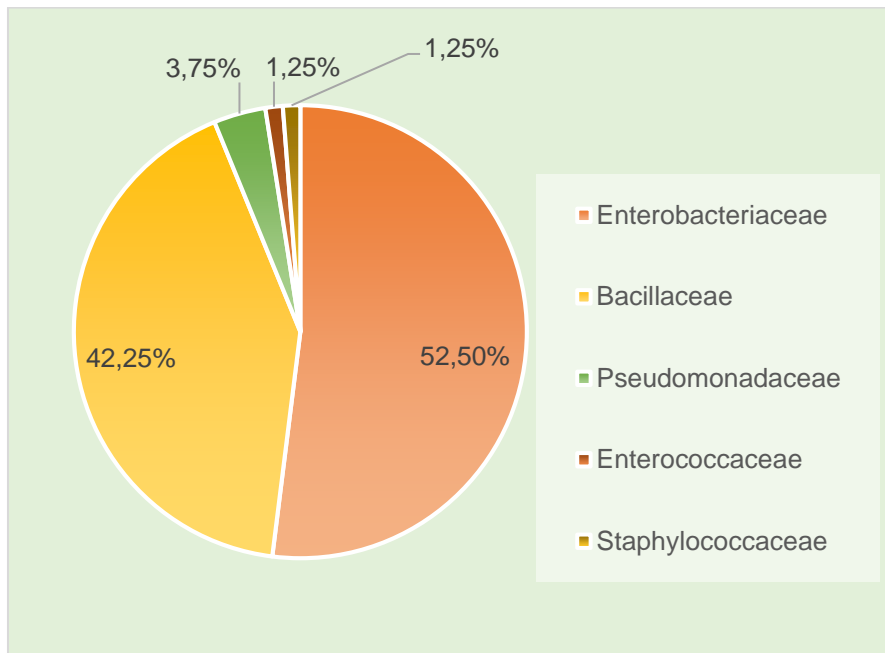


Рис. 4. Бактеріальні ізоляти з різних родин, виділених з кормів та компонентів для їх виготовлення

Представниками домінуючої родини *Enterobacteriaceae* були мікроорганізми роду *Enterobacter spp.* — (69,0 %), *Citrobacter spp.* (12,0 %), *Serratia spp.* (7,1 %), *Klebsiella spp.* (4,7 %), *Escherichia spp.* (2,4 %), *Salmonella spp.* (2,4 %), *Proteus spp.* (2,9 %) (рис. 5).

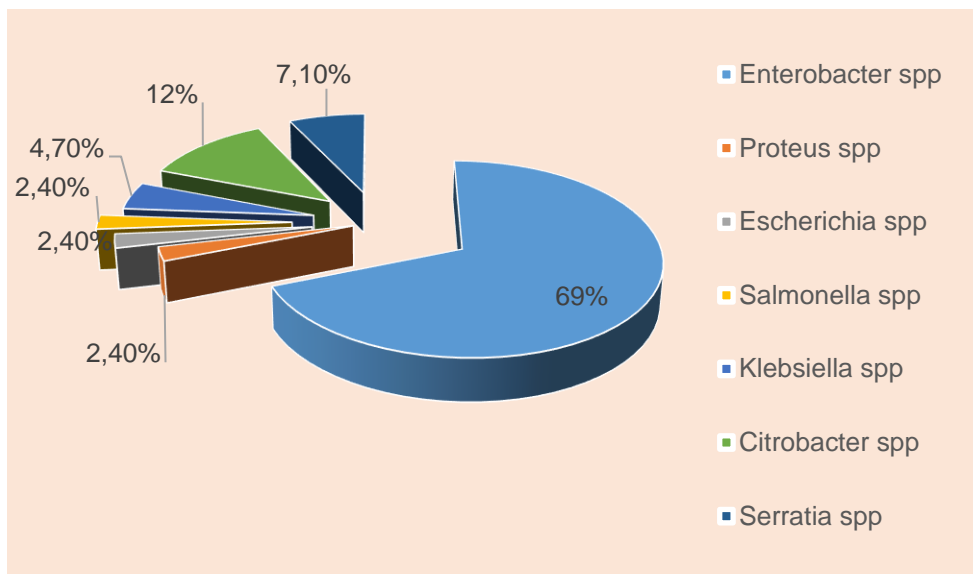


Рис. 5. Відсоткове співвідношення різних родів мікроорганізмів з родини *Enterobacteriaceae*, виділених з кормів та компонентів для їх виготовлення у 2021 р.

Привертає увагу той факт, що з однієї проби корму ізольовано культуру *Salmonella spp.*, (2,4 % від загальної кількості ізольованих бактерій з родини *Enterobacteriaceae*). Це вказує на те, що корми для птиці та їх компоненти часто не відповідають існуючим вимогам за показником контамінації збудниками бактеріальних інфекцій. Згодовування кормів, контамінованих навіть умовно-патогенними мікроорганізмами, може призводити до зниження якості птахівничої продукції, захворювання птиці, та навіть її загибелі. Своєчасне проведення скринінгових бактеріологічних досліджень щодо якості кормів для годівлі птиці дає можливість прогнозувати та передбачати спалахи бактеріозів на виробництві.

Висновки. 1. Серед сільськогосподарської птиці встановлено циркуляцію широкого спектру мікроорганізмів з родин *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Mycoplasmataceae*, у тому числі від птиці різного напрямку продуктивності було виділено три ізоляти збудника токсикоінфекцій – *Salmonella Enteritidis*.

2. 31,4 % (16 проб з 51 досліджених) комбікормів та їх складових не відповідали критеріям якості та безпечності. Основними бактеріальними контамінантами комбікормів виступали умовно патогенні мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterococcaceae* та *Staphylococcaceae*. Крім того, із однієї проби корму ізольовано культуру *Salmonella spp.*

Перспективи подальших досліджень. Широке і повсюдне застосування антибактеріальних препаратів у сільськогосподарській практиці, з метою профілактики та лікування бактеріальних хвороб тварин і птахів, а також нераціональне їх використання для людини призвело до виникнення антибіотикостійких та більш вірулентних штамів. У більшості випадків на розповсюдженість резистентних штамів у світі сприяють глобалізація торгівлі та інтернаціональний транспорт харчових продуктів, але залишається не з'ясованою роль природного резервуару збудників у формуванні антибіотикорезистентних форм. Слід також зауважити, що частота виникнення цього явища серед бактерій кишкової групи, зокрема з родини *Enterobacteriaceae*, є індикатором розповсюдженості резистентних штамів, і тому постійний моніторинг чутливості до антибіотиків є важливою складовою стратегій раннього виявлення, прогнозування антибіотикорезистентності.

Список літератури

1. European food safety authority, European centre for disease prevention and control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 2021. Vol. 19, No 12. P. e06971. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>.
2. European food safety authority, European centre for disease prevention and control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 2021. Vol. 19, No 2. P. e06406. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
3. European food safety authority, European centre for Disease prevention and control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA journal*. 2022. Vol. 20, No 12. P. e07666. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>.
4. One health high-level expert panel. Prevention of zoonotic spillover. 2023. 18 p.
5. Головка А. Н. и др. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине : справочное пособие. Харьков : НТМТ, 2007. 512 с.
6. Vos P. et al., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3: The Firmicutes. New York: Springer, 2009. 2nd ed. 1450 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>.

BACTERIOLOGICAL MONITORING OF POULTRY (CHICKENS, TURKEYS) AND COMPOUND FEED FOR THEIR DIET IN UKRAINE

Muzyka N. M., Maiboroda O. V., Echkenko R. V., Rula O. M.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The article presents the results of studies conducted during 2021 on the circulation of bacterial pathogens among poultry (chickens, turkeys) from industrial and private households in Ukraine, as well as the microbiological contamination of feed and components for their production. 138 isolates of bacterial cultures were isolated from chickens in poultry farms of various forms of ownership, and 12 cultures of microorganisms were isolated from turkeys of different ages in private households. The circulation of a wide range of microorganisms from the families Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, Enterococcaceae, Pseudomonadaceae, Clostridiaceae, Mycoplasmataceae was established in poultry, in particular, three isolates of the causative agent of toxic infections – Salmonella Enteritidis were isolated. 31.4% (16 samples out of 51 tested) of compound feed and their components did not comply with the quality and safety criteria. The main bacterial contaminants of the feed were conditionally pathogenic microorganisms of the Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterococcaceae and Staphylococcaceae families. In addition, a culture of Salmonella spp. was isolated from one feed sample. In the future our researches may be directed to the role of the natural reservoir of pathogens (especially poultry and wild birds) in the formation of antibiotic resistant forms of bacteria

Keywords: bacterial diseases, contamination, feed

ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОДИНАМІКИ СПОЛУКИ ТРИАЗОЛІНОВОГО РЯДУ ПРИ ВИРОЩУВАННІ ПЕРЕПЕЛІВ

Дубін Р. А. ¹, Палій А. П. ², Тодоров М. І. ¹, Коренєва Ж. Б. ¹

¹ Одеський державний аграрний університет,
Одеса, Україна, e-mail: dubinruslan1@gmail.com

² Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна

При введенні в раціон нових сполук триазолінового ряду сприяє збереження поголів'я підвищує приріст маси та покращує метаболічні процеси в обміні речовин у перепелів. Метою наших досліджень було вивчення фармакотоксикологічних властивостей та обґрунтування ефективності застосування у птахівництві впливу сполуки триазолінового ряду GKPF-109. Дослідження було проведено у період з 2022 р. по 2023 р. в Одеського державному аграрному університеті. Для проведення дослідів з вивчення фармакодинаміки сполуки триазолінового ряду GKPF-109 були відібрані перепели породи Фараон у добовому віці, клінічно здорові, яких розділили на чотири групи по 30 голів у кожній: 1 контрольна група якій не задавали сполуку триазолінового ряду; 2 дослідна група випоювали сполуку триазолінового ряду GKPF-109 – 0,5 % розчині; у дослідних групах №№ 3 і 4 випоювали сполуку триазолінового ряду GKPF-109 – 1,0 % та 1,5 % відповідно. В ході роботи використано методи дослідження: морфологічні та біохімічні, статистичні. Результатами встановлено, що фармакодинамічні ефекти сполуки триазолінового ряду GKPF-109 при його включенні до раціону перепелів у дозах від 0,5 до 1,5 % сприяють: підвищенням збереження поголів'я птиці на 6,7–13,4 %; ростостимулюючою дією при збільшенні приростів маси тіла на 3,7–9,1 %; оптимізуючим впливом на еритро- та гемопоез при збільшенні концентрації еритроцитів на 9,5–10,8 % та гемоглобіну на 5,1–6,3 %; покращенням показників метаболізму, збільшенні рівня загального білка на 3,3–6,9 %, альбумінів на 9,1–14,5 %, глюкози на 8,2–9,3 % та кальцію на 5,8–6,6 %. Використання сполуки триазолінового ряду GKPF-109 сприяє зниженню в крові продуктів перекисного окиснення ліпідів та рівня ендогенної інтоксикації при поліпшенні стану печінки перепелів. Аналізуючи вищевикладене можна зробити висновок, що додавання до питної води 1 % розчину сполуки триазолінового ряду GKPF-109 проявляє найбільш фармакологічно ефективним та економічно доцільним при вирощуванні перепелів

Ключові слова: похідні 1,2,4-тріазолу, еритроцити, гемоглобін, лейкоцити.

Найважливішою галуззю тваринництва, що забезпечує населення повноцінними продуктами харчування, є промислове птахівництво. Основними показниками, що визначають ефективність функціонування даної галузі, є продуктивність, збереження птахопоголів'я і якість отриманої продукції. Якість і безпечність продукції птахівництва напряму залежить від цілої низки біотичних [1, 2] та абіотичних [3, 4] факторів середовища утримання продуктивного поголів'я. Доведено, що основою здоров'я птиці та успішної реалізації її генетичного потенціалу є належне функціонування імунної системи [6]. Безперечно, що вакцинація є головним ветеринарно-профілактичним заходом, необхідним для запобігання виникнення та розповсюдження інфекційних захворювань [5, 6]. Поряд з вакцинами для підвищення життєздатності, стійкості до стресів у птиці, а також для забезпечення її високої продуктивності використовують ряд імуномодуляторів та імуностимуляторів [7]. Результати експериментальних досліджень та виробничих випробувань дозволяють рекомендувати імуномодулятори для впровадження у практику промислового птахівництва, що є економічно вигідним і сприяє суттєвому підвищенню якісних та кількісних характеристик одержуваної птахівничої продукції [8]. Як наслідок, за останні роки виріс інтерес до використання кормових добавок з імуномодулюючими властивостями для використання в промисловому птахівництві [9]. Проте, ефективність застосування сучасних імуномодуляторів ще не до кінця вивчена. Тому розробка та застосування в птахівництві нових сполук триазолінового ряду, що підвищують адаптивні

можливості організму птиці до впливу стрес-факторів і надають нормалізуючий вплив на обмін речовин, є перспективним напрямом у ветеринарній фармакології [10].

Метою наших досліджень було вивчення фармакотоксикологічних властивостей та обґрунтування ефективності застосування у птахівництві впливу сполуки триазолінового ряду GKPF-109.

Матеріали та методи. Дослідження виконано у період з 2022 р. по 2023 р. в Одеському державному аграрному університеті. Науково-господарський дослід було проведено з метою вивчення впливу нових похідних триазоліну GKPF-109 в дозі (0,5 мл/птиці на добу).

Похідні 1,2,4-триазолу синтезовані в Запорізькому державному медичному університеті. Для дослідження використовували: GKPF-109 – Morpholin-4-ium-2-((4-аміно-5-(3-метил-піразол-5-іл)-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат. Для проведення дослід з вивчення фармакодинаміки сполуки триазолінового ряду GKPF-109 були відібрані перепели породи Фараон у добовому віці, клінічно здорові, яких розділили на чотири групи по 30 голів у кожній: 1 контрольна група, якій не задавали сполуку триазолінового ряду; 2 дослідна група – випоювали сполуку триазолінового ряду GKPF-109 (0,5 % розчин); дослідним групам №№ 3 і 4 випоювали сполуку триазолінового ряду GKPF-109 у дозах 1,0 % та 1,5 % відповідно (табл. 1).

Таблиця 1 — Схема дослід з вивчення фармакодинаміки сполуки триазолінового ряду GKPF-109 на перепелах (n=30)

Група	Дози
1 контрольна	Без сполуки
2 дослідна	0,5% р-н сполуки триазолінового ряду GKPF-109
3 дослідна	1% р-н сполуки триазолінового ряду GKPF-109
4 дослідна	1,5% р-н сполуки триазолінового ряду GKPF-109

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з птицею здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) [11]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти (DIRECTIVE 2010/63/EU) [12].

За перепелами впродовж дослід (42 доби) проводили клінічне спостереження, звертали увагу на збереження поголів'я та динаміку зміни маси тіла. Зважування птиці проводили на початку дослід, потім на 28 та 42 добу. Для визначення впливу сполуки триазолінового ряду GKPF-109 на обмінні процеси у 5 перепелів з кожної групи на 28 та 42 добу дослід було взято кров для лабораторних досліджень [13]. Отримані в дослідях цифрові дані були піддані біометричній обробці за допомогою програмного забезпечення фірм Mikrosoft® та CarlZeiss®. Критерій достовірності визначали за таблицею Стьюдента.

Результати досліджень. Результати впливу сполуки триазолінового ряду GKPF-109 на деякі зоотехнічні показники, з різним відсотком введення до складу основного раціону, представлені в табл. 2.

Як показав аналіз результатів досліджень, випоювання з водою 1,0 % та 1,5 % розчину сполуки триазолінового ряду GKPF-109 позитивно вплинуло на збереженість поголів'я перепелів у 3 та 4 дослідних групах – 96,7 % та 93,3 % відповідно. Збереженість поголів'я перепелів 3 групи, що отримувала 0,5 % розчин сполуки триазолінового ряду GKPF-109, була лише на рівні 90,0 %, а контрольної – на рівні 83,3 % відповідно. Отже, застосування сполуки триазолінового ряду GKPF-109 підвищує збереженість поголів'я перепелів на 6,7-13,4 %. Те саме характерне і для динаміки живої маси, яка у перепелів дослідних груп протягом усього періоду вирощування була достовірно вищою за контроль. При цьому виявлено відмінності по масі тіла у перепелів дослідних груп. Середньодобовий приріст маси тіла до кінця дослід відносно 1 контрольної групи був вищим у 2 дослідній групі — на 3,71 %, у 3 дослідній групі — на 8,97 % та у 4 дослідній групі — на 9,11 %.

Наступним етапом було проведення гематологічних досліджень перепелів на 28 та 42 добу вирощування (табл. 3).

Таблиця 2 — Вплив сполуки триазолінового ряду GKPF-109 на зоотехнічні показники перепелів (n=30)

Показники	Групи			
	1 контрольна	2 дослідна	3 дослідна	4 дослідна
		GKPF-109		
		0,5 %	1 %	1,5 %
Динаміка зміни маси тіла, г				
Маса тіла на початку досліду	6,27±0,15	6,25±0,15	6,24±0,13	6,26±0,16
Через 28 діб	201,25±4,36	209,29±4,08	219,08±3,16*	218,74±2,54*
Через 42 доби	279,16±3,58	289,31±5,67	305,69±2,71*	306,30±3,42*
Приріст маси тіла (0-42 дн.)				
Абсолютний, г	272,83	283,06	299,45	300,01
Середньодобовий, г	6,49	6,74	7,13	7,14
Збереженість, %	83,3	90,0	96,7	93,3

Примітка: *P<0,05 порівняно з контрольною групою.

Таблиця 3 — Вплив сполуки триазолінового ряду GKPF-109 на гематологічні показники перепелів (M±m; n=5)

Групи	Показник			
	Еритроцити, 10 ¹² /л	Тромбоцити, 10 ⁹ /л	Лейкоцити, 10 ⁹ /л	Гемоглобін, г/л
на 28 добу				
1 (контрольна)	3,95±0,11	119,59±3,91	22,36±0,32	123,31±1,67
2 дослідна	4,39±0,07*	121,09±3,59	20,46±0,29	129,72±3,98
3 дослідна	4,42±0,09*	124,14±3,80	19,30±0,38	136,11±1,76
4 дослідна	4,48±0,10	124,30±4,19	20,33±0,27	138,34±2,05
на 42 добу				
1 (контрольна)	4,12±0,05	124,20±4,02	24,31±0,32	129,17±2,84
2 дослідна	4,55±0,07*	126,21±3,41	22,67±0,30	134,62±4,05
3 дослідна	4,62±0,03*	126,14±3,79	20,70±0,46	136,08±1,21
4 дослідна	4,64±0,12	125,31±4,21	21,73±0,27	137,82±2,95

Примітка: *P<0,05 порівняно з контрольною групою.

Проведені дослідження показали, що всі показники крові знаходяться в межах референтних значень, а це свідчать про нормальний розвиток і фізіологічний стан контрольних і дослідних перепелів. Однак у крові перепелів з 3 та 4 дослідних груп, яким випоювали з водою 1,0 % та 1,5 % розчину сполуки триазолінового ряду GKPF-109, спостерігається достовірно збільшення кількості еритроцитів відносно контрольної групи: у 3 дослідній групі – на 9,45 %; у 4 дослідній групі – на 10,82 %. Також у цих групах до кінця досліду спостерігалось на рівні тенденції підвищення рівня гемоглобіну на 5,1 % та 6,27 % відповідно.

Біохімічні показники сироватки крові характеризують обмінні процеси в організмі птиці (табл. 4). При дослідженні крові перепелів відмічено позитивний вплив сполуки триазолінового ряду на низку біохімічних показників. Рівень загального білка був максимально вищим за контроль у 3 дослідній групі — до середини досліду на 5,5 %, а після його завершення — на 6,9 % (P<0,05). У 2 та 4 дослідних групах різниця на 42 добу досліджень складала 3,3 % та 6,2 % відповідно. Вміст альбумінів реєструвався вище у перепелів, що отримували сполуку триазолінового ряду, з різницею відносно контролю в кінці досліду в 2 дослідній групі 9,1 % (P<0,05), у 3 дослідній групі – 13,8 % (P<0,01) та в 4 дослідній групі 14,5 % (P<0,05). Таким чином, застосування адаптогуміну в період вирощування сприяло підвищенню не тільки білкового пулу в крові, а й концентрації альбуміну.

Застосування сполуки триазолінового ряду GKPF-109 сприяло достовірному збільшенню вмісту глюкози в сироватці крові перепелів щодо інтактних аналогів, причому найбільша різниця спостерігалась у 3 групі, і складала 9,2 % (P<0,05). У 2 та 4 дослідних групах рівень глюкози збільшився на 8,2 % та на 6,1 % (P<0,05) відповідно.

Таблиця 4 — Вплив сполуки триазолінового ряду GKPF-109 на біохімічні показники перепелів ($M \pm m$; $n=5$)

Показник	Групи			
	1 (контрольна)	2 дослідна	3 дослідна	4 дослідна
на 28 добу				
Загальний білок, г/л	30,61±0,97	30,85±1,11	32,38±0,93	31,67±1,02
Альбуміни, г/л	13,13±0,52	14,50±0,38	14,82±0,41**	14,53±0,27*
Глобуліни, г/л	17,46±0,48	17,52±0,55	17,59±0,56	17,70±0,61
Глюкоза, ммоль/л	15,3±0,24	17,5±0,23	18,1±0,12*	18,9±0,22
Холестерин, ммоль/л	3,84±0,12	3,82±0,09	3,80±0,07	3,81±0,14
Сечова кислота, ммоль/л	182,2±3,42	181,1±5,26	180,6±4,98	181,5±5,18
АсАТ, Од/л	380,18±5,11	370,27±8,02	379,32±6,43	379,02±5,31
АлАТ, Од/л	18,02±1,14	16,71±1,20	16,13±1,11	15,11±1,17
Фосфор, ммоль/л	2,15±0,15	2,26±0,13	2,29±0,25	2,31±0,26
Кальцій, ммоль/л	2,91±0,24	2,98±0,18	3,11±0,22	3,14±0,33
на 42 добу				
Загальний білок, г/л	31,84±1,03	32,92±1,11	34,21±0,55*	33,95±0,96
Альбуміни, г/л	14,41±0,45	16,64±0,45*	17,72±0,33**	17,86±0,22*
Глобуліни, г/л	18,63±0,55	18,08±0,61	18,45±0,58	18,96±0,64
Глюкоза, ммоль/л	16,8±0,29	18,3±0,15	18,5±0,11*	17,9±0,09*
Холестерин, ммоль/л	3,59±0,21	3,57±0,29	3,63±0,18	3,58±0,24
Сечова кислота, ммоль/л	180,6±5,33	181,4±4,97	181,8±5,25	181,9±3,91
АсАТ, Од/л	380,8±5,1	377,2±6,4	379,3±7,3	376,2±5,1
АлАТ, Од/л	23,2±1,14	19,1±0,86*	18,3±0,54**	18,5±1,17*
Фосфор, ммоль/л	1,76±0,06	1,79±0,09	1,84±0,17	1,81±0,14
Кальцій, ммоль/л	2,42±0,19	2,56±0,21	2,57±0,14*	2,59±0,07*

Примітка: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Основними гепатоіндикаторними ферментами є аланінамінотрансфераза (АлАТ) та аспартатамінотрансфераза (АсАТ). Підвищений вміст цих ферментів у сироватці крові вказує на деструктивні процеси у печінковій тканині. Під час проведення дослідження нами було встановлено, що в групі перепелів, які отримують сполуку триазолінового ряду GKPF-109, спостерігається зниження активності АлАТ, що вказує на оптимізацію стану гепатоцитів: у 2 дослідній – на 21,5 % ($P < 0,05$); у 3 дослідній – на 26,8 % ($P < 0,01$); у 4 дослідній – на 25,4 % ($P < 0,05$).

Фармакологічні ефекти сполуки триазолінового ряду GKPF-109 вплинули також на мінеральний склад крові перепілок. Найнижча концентрація кальцію була у крові птиці з контрольної групи (2,42±0,19 ммоль/л). Сполука триазолінового ряду GKPF-109 підвищувала його концентрацію в крові перепелів на 5,5 % (2 група), 5,8 % (3 група), 6,6 % (4 група) порівняно з 1 контрольною групою. Що стосується фосфору, то в усіх дослідних групах його концентрація у сироватці крові була близька до показників інтактного контролю.

Оцінити швидкість переокислення ліпідів у птиці можна за допомогою спеціальних тестів. Так, концентрація малонового діальдегіду (МДА) у сироватці крові характеризує активність процесів ліпопероксидації в організмі та є маркером ступеня його ендогенної інтоксикації. У проведеному дослідженні ми оцінювали вміст МДА в сироватці крові перепелів наприкінці досліду. У дослідних групах варіабельність цього показника відносно контролю становила 1,8-10,4 %. Мінімальна різниця була у контрольній групі, а максимальна – при використанні з водою 1,0 % розчину сполуки триазолінового ряду GKPF-109. З чого випливає, що фармакодинамічні ефекти у перепелів, яким випоювали з водою розчин сполуки триазолінового ряду GKPF-109 дозволяють знизити утворення нерозчинних ліпід-білкових комплексів, зменшивши вплив катаболітів на організм.

Під ендогенною інтоксикацією розуміють комплекс симптомів патологічних станів органів та систем організму, зумовлених накопиченням у тканинах та біологічних рідинах ендотоксинів.

Як маркер ендогенної інтоксикації організму найчастіше використовується показник концентрації молекул середньої маси (ЧСЧ). Традиційно визначають дві фракції ЧСЧ — при довжинах хвиль 254 і 280 нм. Фракція ЧСЧ 254 нм — токсична фракція, представлена гідрофобними токсинами та продуктами неповного розпаду білків. Інтенсивність УФ-поглинання при 280 нм визначається головним чином наявністю ароматичних хромофорів, і її збільшення відбувається внаслідок накопичення тирозин- та триптофановмісних пептидів.

Наприкінці досліду у 5 перепелів з кожної групи була взята кров для визначення рівня ЧСЧ при двох довжинах хвиль — $X = 254$ нм (ЧСМ 254) і $X = 280$ нм (ЧСМ 280). При розрахунку різниця між показниками дослідних груп щодо інтактного контролю становила:

при довжині хвилі $X = 254$ нм у 2 групі — 2,8 %, у 3 групі — 5,7 % та у 4 групі — 5,3 %;

при довжині хвилі $X = 280$ нм у 2 групі — 3,5 %, у 3 групі — 9,9 % ($P < 0,05$) та у 4 групі — 8,4 % ($P < 0,05$).

Отже, рівень ендогенної інтоксикації в організмі перепелів при застосуванні 1,0 % та 1,5 % розчину сполуки триазолінового ряду GKPF-109 з водою був достовірно нижчим від даних інтактного контролю.

Висновки. Результати проведеного дослідження показали, що фармакодинамічні ефекти розчину сполуки триазолінового ряду GKPF-109 при його включенні до раціону перепелів у різних дозах проявляються ростостимулюючою дією та оптимізуючим впливом на еритропоез і біохімічну картину крові птиці, зумовлюючи підвищення показників білкового, вуглеводного та мінерального обмінів, гепатоцитів, зниження продуктів переокисного окислення ліпідів та рівня ендогенної інтоксикації. Виявлено, що найбільш ефективним та економічно доцільним є дозування 1,0 % розчину сполуки триазолінового ряду GKPF-109 з водою.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні дії сполуки триазолінового ряду на фоні інфікування птиці хворобами бактеріальної етіології.

Список літератури

1. De Boeck C. et al. Longitudinal monitoring for respiratory pathogens in broiler chickens reveals co-infection of *Chlamydia psittaci* and *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Medical Microbiology*. 2015. Vol. 64, Pt. 5. P. 565–574. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000047>.
2. Mesquita M. A. et al. Results of hatching and rearing broiler chickens in different incubation systems. *Poultry Science*. 2021. Vol. 100, No. 1. P. 94–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.028>.
3. Mohammed L. S. et al. Growth performance, economic efficiency, meat quality, and gene expression in two broiler breeds fed different levels of tomato pomace. *Veterinary Research Communications*. 2021. Vol. 45, No. 4. P. 381–397. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09819-x>.
4. Song B. et al. Effects of age on immune function in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2021. Vol. 12, No. 1. P. 42. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00559-1>.
5. Ghosh A. et al. (2016). Effects of supplementation of manganese with or without phytase on growth performance, carcass traits, muscle and tibia composition, and immunity in broiler chickens. *Livestock Science*. 2016. Vol. 191. P. 80–85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.07.014>.
6. Rehman Z. et al. Mast cells and innate immunity: Master troupes of the avian immune system. *World's Poultry Science Journal*. Vol. 73, No 3. P 621–632. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043933917000526>.
7. Sunder G. S. et al. Effects of higher levels of zinc supplementation on performance, mineral availability, and immune competence in broiler chickens. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2008. Vol. 17, No 1. P. 79–86. DOI: <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00029>.
8. Arif M. et al. Effect of varying levels of chromium propionate on growth performance and blood biochemistry of broilers. *Animals*. 2019. Vol. 9, No 11. P. 935. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani9110935>.
9. De Oliveira J. et al. Composition of broilers meat. *Journal of Applied Poultry Research*. 2016. Vol. 25, No 2. P. 173–181. DOI: <https://doi.org/10.3382/japr/pfv095>.
10. Dubin R. et al. Productivity and quality of broiler chicken meat using new triazolin compounds. *Scientific Horizons*. 2022. Vol. 25, No 5. P. 9–21. DOI: [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(5\).2022.9-21](https://doi.org/10.48077/scihor.25(5).2022.9-21).
11. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text.
12. Директива європейського парламенту і ради 2008/68/ЄС від 24 вересня 2008 року. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/984_007-08#Text.
13. Sadovnikov N.V. et al. *General and special methods for the study of blood of birds of industrial crosses*. AVIAK. 2009.

STUDY OF PHARMACODYNAMICS OF TRIAZOLINE COMPOUNDS IN QUAIL GROWING

Dubin R. A.¹, Paliy A. P.², Todorov M. I.¹, Koreneva Zh. B.¹

¹ Odesa State Agrarian University, Odesa, Ukraine

² National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

When new compounds of the triazoline series are introduced into the diet, it contributes to the preservation of livestock, increases weight gain and improves metabolic processes in the metabolism of quails. The purpose of our research was to study the pharmacotoxicological properties and to substantiate the effectiveness of the use of the compound of the triazoline series GKPF-109 in poultry farming. The study was conducted in the period from 2022 to 2023 at the Odesa State Agrarian University. To conduct an experiment to study the pharmacodynamics of the compound of the triazoline series GKPF-109, day-old quails of the Pharaoh breed, clinically healthy, were selected and divided into four groups of 30 heads in each: 1 control group, which was not given a compound of the triazoline series; 2 experimental group drank the compound of the triazoline series GKPF-109 - 0.5% solution; in experimental groups Nos. 3 and 4, the compound of the triazoline series GKPF-109 – 1.0% and 1.5% was administered, respectively. Research methods were used during the work: morphological and biochemical, statistical. The results showed that the pharmacodynamic effects of the compound of the triazoline series GKPF-109 when included in the diet of quails in doses from 0.5 to 1.5% contribute to: increasing the preservation of poultry stock by 6.7–13.4%; growth-stimulating effect when increasing body weight gains by 3.7-9.1%; an optimizing effect on erythro- and hematopoiesis with an increase in the concentration of erythrocytes by 9.5–10.8% and hemoglobin by 5.1–6.3%; improvement of metabolic indicators, an increase in the level of total protein by 3.3–6.9%, albumin by 9.1–14.5%, glucose by 8.2–9.3%, and calcium by 5.8–6.6%. The use of the compound of the triazoline series GKPF-109 contributes to the reduction in the blood of lipid peroxidation products and the level of endogenous intoxication while improving the condition of the liver of quails. Analyzing the above, it can be concluded that adding a 1% solution of the compound of the triazoline series GKPF-109 to drinking water is the most pharmacologically effective and economically feasible in raising quail

Keywords: 1,2,4-triazole derivatives, red blood cells, hemoglobin, leukocytes

УДК 619:616.64/68-085:615.31:[669.85/.86+669.21/.23]-022.532 DOI [10.36016/VM-2023-109-14](https://doi.org/10.36016/VM-2023-109-14)

**ОЦІНКА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ ЯК
ПОТЕНЦІЙНИХ ЗАСОБІВ КОРЕКЦІЇ ПАТОЛОГІЙ СТАТЕВОЇ СИСТЕМИ ТВАРИН**

Кошевой В. І., Науменко С. В.

Державний біотехнологічний університет, Харків, Україна,

e-mail: koshevoyvsevolod@gmail.com

Сергієнко В. Р.

Ветеринарна клініка «Ветексперт», Харків, Україна

Актуальною науковою проблемою є пошук засобів для корекції запальних процесів, особливо репродуктивних патологій. У статті узагальнено інформацію сучасних наукових джерел щодо розроблення препаратів з вираженими протизапальними властивостями на основі наночастинок (НЧ) металів, зокрема благородних — Срібла й Золота, що виявляють антимикробну, антиоксидантну дію і сприяють зменшенню запальних процесів за різноманітних патологічних станів, що є науковим підґрунтям для впровадження їх в практику репродуктивної ветеринарної медицини. З іншого боку, обґрунтовано актуальність дослідження протизапальної активності НЧ рідкісноземельних елементів (Гадолінію, Ітрію, Лантану), що мають антибіотичну дію, здатні знешкоджувати токсичні радикали, а отже мають потенційну здатність корегувати деякі ланки патогенезу хвороб статевої системи запального генезу. Використання вищенаведених металів як протизапальних агентів стало можливим завдяки синтезу сполук на їх основі у наноформі, внаслідок переходу у яку вони набувають унікальних властивостей — здатності проникати у клітину, долати гістогемаїтичні бар'єри, мають велику площу поверхні і нижчу токсичність порівняно з

макроергами. Слід наголосити, що прояв протизапальних властивостей залежить від методу отримання НЧ, їх фізико-хімічних характеристик, а тому є необхідність детальних досліджень різноманітних НЧ для деталізації механізмів дії і оцінки фармакологічної активності

Ключові слова: антиоксиданти, антибіотики, благородні метали, рідкісноземельні елементи

Численні типи запалень, викликаних чужорідними патогенами або хімічними речовинами, і мутації, які посилюють інгібітори запалення, обумовлюють потребу в розробці нових засобів з вираженою протизапальною ефективністю [1]. За останнє десятиліття було досягнуто величезного прогресу в тому, щоб зробити комерційно доступними терапевтичні продукти та препарати на основі наночастинок (НЧ) [2–4]. Завдяки вражаючим досягненням у нанотехнологіях було досліджено наноматеріали з унікальними регулюючими властивостями щодо активних форм Оксигену (АФО), щоб керувати тимчасово-просторовою динамічною поведінкою АФО у біологічному середовищі, що сприяє появі терапевтичної методології нового покоління, тобто керованої наноматеріалами еволюції АФО *in vivo* для терапевтичних заходів [5, 6]. Тому, застосування НЧ є перспективним напрямком у розробці засобів протизапальної дії. Зазначимо, що НЧ набули поширеного використання в біомедичній галузі завдяки їх високій здатності проникати всередину клітин, властивостям зв'язування лігандів завдяки високому співвідношенню площі поверхні до об'єму [7–9]. Механістичне дослідження показало наявність протизапальної активності у різних металів і наночастинок оксидів металів, таких як Срібло, Золото тощо [1, 9, 10].

Метою роботи було обґрунтувати застосування наночастинок благородних металів з вираженою протизапальною активністю та оцінити перспективи розроблення лікарських форм на їх основі за корекції патологій статевої системи самців.

Матеріали і методи. Здійснюючи огляд наукової літератури з метою встановлення токсичних ризиків використання металевих наночастинок автори цього дослідження проаналізували результати з наукових баз даних Scopus і PubMed. Доступ до даних і матеріалів наукових статей отримано завдяки ініціативі Research4Life, яка надала науковцям і дослідникам з України вільний доступ до значної кількості наукових журналів.

Результати роботи. Запалення — це рання імунологічна відповідь на чужорідні частинки тканинами, яка підтримується посиленою продукцією прозапальних цитокінів, активацією імунної системи та вивільненням простагландинів та хемотаксичних речовин, таких як фактори комплементу, інтерлейкіни й фактори некрозу пухлин [10–12].

Залежно від способу синтезу НЧ, обраної експериментальної моделі, дози та умов експозиції введення НЧ може мати як позитивний, так і негативний ефект шляхом впливу на клітинні процеси, такі як розвиток оксидативного стресу, ініціація запальної відповіді, дисфункції мітохондрій тощо. З точки зору тканинспецифічних ефектів, місцеве мікрооточення може мати глибокий вплив на те, чи є НЧ безпечною чи шкідливою для клітини. Взаємодія НЧ з протеїнами, що зв'язують метали (цинк, мідь, залізо та кальцій), впливає як на їх структуру, так і на функцію [13].

Серед них наночастинок Срібла мають великі перспективи у вирішенні проблем резистентності мікроорганізмів до антибіотичних засобів й пошуку ефективних протизапальних сполук завдяки їх широкому спектру дії та стійким антимікробним властивостям. Слід наголосити, що хімічний склад поверхні, розмір і форма, впливають на їхню антибактеріальну дію та протизапальну активність, що відіграє важливу роль у розробці препаратів на основі НЧ Срібла [14]. Bhol & Schechter (2007) повідомили про протизапальну активність у щурів, які отримували перорально 40 мг/кг нанокристалічного Срібла та показали значне зменшення запалення товстої кишки [15]. Миші, які отримували НЧ Срібла, показали швидке загоєння ран, що мало дозозалежний ефект. Крім того, було доведено значні антимікробні властивості, зменшення запалення рани та модуляцію цитокінів [16]. Wong et al. (2007) виявили, що НЧ

Срібла здатні знижувати кількість маркерів запалення, можуть пригнічувати запальні процеси на ранніх фазах загоєння ран [17]. Модель контактного дерматиту у свиней показала, що лікування НЧ Срібла значно збільшує апоптоз у запальних клітинах та знижує рівень прозапальних цитокінів, а також знижують набряк і інші клінічні ознаки [18, 19].

Сполуки Золота використовуються як ефективні терапевтичні засоби для лікування деяких запальних захворювань, однак використання даних сполук стало обмеженим через пов'язану високу частоту побічних ефектів. Останні розробки наноматеріалів для терапевтичного застосування з золотовмісними препаратами покращують корисні дії та знижують токсичні властивості цих засобів. Повідомлялося, що нижча токсичність у поєднанні з протизапальними та антиангіогенними ефектами виникає при лікуванні препаратами на основі НЧ Золота [20]. Синтез НЧ Золота на основі куркуміну з подальшим розвитком відповідної зовнішньої корони з використанням ізоніазиду, тирозину або кверцетину дозволяє отримати пероксидазо-подібні властивості залежно від поверхневої корони відповідних наночастинок, внаслідок чого вони виявляються чудовими кандидатами для дії поглинання вільних радикалів. Взаємодія НЧ Золота, що імітують пероксидазу, з еритроцитами і мишачими макрофагами підтвердила їх гемо- і біосумісну природу та протизапальну активність [21]. Di Bella et al. (2021) показали важливі протизапальні властивості застосування НЧ Золота мишам в якості ад'ювантного препарату поряд з антибіотиками при лікуванні сепсису [22]. У комбінованій формі НЧ Золота сприяють зменшенню проявів запалення за цукрового діабету та можуть використовуватися для профілактики ускладнень метаболічного синдрому [23]. Протизапальна активність, антимікробна дія і антиоксидантні властивості НЧ Срібла й Золота узагальнені у таблиці 1.

Таблиця 1 — Основні властивості наночастинок благородних металів та перспективи розробки лікарських форм на їх основі.

Параметри	НЧ на основі Срібла	НЧ на основі Золота
Протизапальні властивості	↑↑↑	↑↑
Антимікробна здатність	↑↑↑	↑
Редокс-активність	↑↑	↑↑
Пропонований спосіб використання та лікарська форма	Ректальне введення за хронічного простатиту у псів у формі гідрогелю	Промивання препуційної порожнини в якості сануючого засобу з метою профілактики баланопоститу

Примітки: ↑↑↑ – виражені властивості; ↑↑ – помірний вплив; ↑ – потребує додаткових досліджень.

Підсумовуючи, зазначимо що потужні антиоксидантні властивості НЧ металів є науковою основою розроблення нових методів лікування з посиленою цілеспрямованою дією. Проте оксидативний стрес є основним несприятливим ефектом НЧ оксидів металів, таких як оксид нікелю, оксид цинку та діоксид титану. Таким чином, НЧ властивий подвійний вплив на клітинний окисно-відновний гомостаз [24, 25]. У сучасних дослідженнях увага науковців зосереджена на вивченні НЧ рідкісноземельних металів (Ітрій, Лантан, Гадоліній) [26]. НЧ Ітрію – багатообіцяючий антиоксидант та протизапальний засіб, ефективно зменшували окислювально-нітрозативний стрес. Крім того, введення НЧ Ітрію також зменшило запальні цитокіни та хемокіни, що призвело до інгібування передачі сигналів фіброзу [27]. З іншого боку, встановлено, що введення наноматриць на основі НЧ Лантану викликало мінімальну індукцію синтезу АФО [28]. НЧ Гадолінію-Ітрію володіють вираженими антиоксидантними властивостями та ефективно знешкоднують токсичні радикали [29]. НЧ ортованадату Гадолінію і Лантану продемонстрували хорошу активність розщеплення ДНК та індукцію дволанцюгових розривів у суперспіральной плазмідній ДНК, обидві НЧ показали активність інгібування біоплівки проти *S. aureus* і знизили життєздатність мікробних клітин. Беручи до уваги результати досліджень токсичності та антимікробної активності, можна припустити, що НЧ Гадолінію є більш перспективними антибактеріальними засобами [30].

Висновки. 1. Наночастинки благородних металів — Срібла й Золота, за рахунок протизапальної активності і антимікробних та антиоксидантних властивостей є перспективними для розробки лікарських форм при лікуванні хвороб репродуктивної системи запального генезу.

2. Враховуючи виражені редокс-властивості наночастинок рідкісноземельних елементів (Гадолінію, Ітрію, Лантану) та їх антибіотичну дію зауважимо, що вони можуть використовуватися як потенційні протизапальні компоненти у лікувально-профілактичних схемах.

Список літератури

1. Agarwal H. et al. Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019. Vol. 109. P. 2561–2572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.116>.
2. Aleya L., Abdel-Daim M. M. Advances in nanotechnology, nanopollution, nanotoxicology, and nanomedicine. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2020. Vol. 27, No 16. P. 18963–18965. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08800-6>.
3. Nair H. B. et al. Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2010. Vol. 80, No 12. P. 1833–1843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.021>.
4. Forest V. Experimental and computational nanotoxicology-complementary approaches for nanomaterial hazard assessment. *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, No 8. P. 1346. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano12081346>.
5. Yang B., Chen Y., Shi J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chemical Reviews*. 2019. Vol. 119, No 8. P. 4881–4985. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>.
6. Ahmad A., Imran M., Sharma N. Precision nanotoxicology in drug development: current trends and challenges in safety and toxicity implications of customized multifunctional nanocarriers for drug-delivery applications. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, No 11. P. 2463. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112463>.
7. Miranda R. R. et al. Proteome-wide analysis reveals molecular pathways affected by AgNP in a ROS-dependent manner. *Nanotoxicology*. 2022. Vol. 16, No 1. P. 73–87. DOI: <https://doi.org/10.1080/17435390.2022.2036844>.
8. Yedgar S., Barshtein G., Gural A. Hemolytic activity of nanoparticles as a marker of their hemocompatibility. *Micromachines*. 2022. Vol. 13, No. 12. P. 2091. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi13122091>.
9. Singh A. V. et al. Artificial intelligence and machine learning disciplines with the potential to improve the nanotoxicology and nanomedicine fields: a comprehensive review. *Archives of Toxicology*. 2023. Vol. 97, No 4. P. 963–979. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03471-x>.
10. Zhang X. F. et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17, No 9. P. 1534. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>.
11. Eming S. A., Krieg T., Davidson J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2007. Vol. 127, No 3. P. 514–525. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>.
12. Broughton G. et al. The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006. Vol. 117, No 7. P. 12S–34S. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>.
13. Cameron S. J. et al. Nanoparticle effects on stress response pathways and nanoparticle-protein interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, No 14. P. 7962. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23147962>.
14. Tang S., Zheng J. Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Advanced Healthcare Materials*. 2018. Vol. 7, No 13. P. e1701503. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>.
15. Bhol K. C., Schechter P. J. Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2007. Vol. 52, No 10. P. 2732–2742. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9738-4>.
16. Tian, J. et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*. 2007. Vol. 2, No 1. P. 129–136. DOI: <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600171>.
17. Wong C. K. et al. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2007. Vol. 37, No 1. P. 85–96. DOI: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0457OC>.
18. Nadworny P. L. et al. Does nanocrystalline silver have a transferable effect? *Wound Repair and Regeneration*. 2010. Vol. 18, No 2. P. 254–265. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00579.x>.
19. David L. et al. Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 2014. Vol. 122. P. 767–777. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.08.018>.
20. Hornos Carneiro M. F., Barbosa F., Jr. Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*. 2016. Vol. 19, No 3-4. P. 129–148. DOI: <https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1168762>.
21. Kumawat M. et al. Surface engineered peroxidase-mimicking gold nanoparticles to subside cell inflammation. *Langmuir*. 2022. Vol. 38, No 5. P. 1877–1887. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c03088>.
22. Di Bella D. et al. Gold nanoparticles reduce inflammation in cerebral microvessels of mice with sepsis. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021. Vol. 19, No 1. P. 52. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00796-6>.

23. Díaz-Pozo P. et al. Gold nanoparticles supported on ceria nanoparticles modulate leukocyte-endothelium cell interactions and inflammation in type 2 diabetes. *Antioxidants*. 2022. Vol. 11, No 11. P. 2297. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11112297>.
24. Koshevoy V. et al. Male infertility: Pathogenetic significance of oxidative stress and antioxidant defence (review). *Scientific Horizons*. 2021. Vol. 24, No 6. P. 107–116. DOI: [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(6\).2021.107-116](https://doi.org/10.48077/scihor.24(6).2021.107-116).
25. Horie M., Tabei Y. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radical Research*, 2021. Vol. 55, No 4. P. 331–342. DOI: <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1859108>.
26. Koshevoy V. et al. Effect of gadolinium orthovanadate nanoparticles on male rabbits' reproductive performance under oxidative stress. *World's Veterinary Journal*. 2022. Vol. 12, No 3. P. 296–303. DOI: <https://doi.org/10.54203/scil.2022.wvj37>.
27. Khurana A., Saifi M. A., Godugu C. Yttrium oxide nanoparticles attenuate L-arginine induced chronic pancreatitis. *Biological Trace Element Research*. 2023. Vol. 201, No 7. P. 3404–3417. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03446-6>.
28. Vijayan V. et al. Lanthanum oxide nanoparticles reinforced collagen k-carrageenan hydroxyapatite biocomposite as angio-osteogenic biomaterial for in vivo osseointegration and bone repair. *Advanced Biology*, 2023. P. e2300039. DOI: <https://doi.org/10.1002/adbi.202300039>.
29. Maksimchuk P. O. et al. High antioxidant activity of gadolinium-yttrium orthovanadate nanoparticles in cell-free and biological milieu. *Nanotechnology*. 2021. Vol. 33, No 5. P. 055701. DOI: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac31e5>.
30. Gonca S. et al. Antimicrobial effects of nanostructured rare-earth-based orthovanadates. *Current Microbiology*. 2022. Vol. 79, No 9. P. 254. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02947-w>.

ASSESSMENT OF ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF METAL NANOPARTICLES AS POTENTIAL MEANS FOR THE CORRECTION OF PATHOLOGIES ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM IN ANIMALS

Koshevoy V. I., Naumenko S. V.

State Biotechnological University, Kharkiv, Ukraine

Serhienko V. R.

Veterinary Clinic "Vetekspert", Kharkiv, Ukraine

An urgent scientific problem is the search for means to correct inflammatory processes, especially reproductive pathologies. The article summarizes information from modern scientific sources regarding the development of drugs with pronounced anti-inflammatory properties based on nanoparticles (NPs) of metals, in particular noble ones – Silver and Gold, which exhibit antimicrobial and antioxidant effects and contribute to the reduction of inflammatory processes in various pathological conditions, which is the scientific basis for their introduction into the practice of reproductive veterinary medicine. On the other hand, the relevance of the study of the anti-inflammatory activity of NPs of rare earth elements (gadolinium, yttrium, lanthanum), which have an antibiotic effect, are able to neutralize toxic radicals, and therefore have a potential ability to correct some links in the pathogenesis of diseases of the reproductive system of inflammatory origin, is substantiated. The use of the above-mentioned metals as anti-inflammatory agents became possible due to the synthesis of compounds based on them in nanoform, as a result of the transition into which they acquire unique properties – the ability to penetrate the cell, overcome histohematic barriers, have a large surface area and lower toxicity compared to macroergs. It should be noted that the manifestation of anti-inflammatory properties depends on the method of obtaining NPs, their physicochemical characteristics, and therefore there is a need for detailed studies of various NPs to detail the mechanisms of action and assess pharmacological activity

Keywords: antioxidants, antibiotics, precious metals, rare earth elements

5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 619:616.98:579.843.94:615.371:636.52/.58(477)

DOI 10.36016/VM-2023-109-15

ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННОЇ ТА ІМУНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ СЕРІЙ ІНАКТИВОВАНОЇ ЕМУЛЬСОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ГЕМОФІЛЬОЗУ КУРЕЙ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

Колесников А. О., Стегній Б. Т.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: artemon909@gmail.com

У всьому світі *Avibacterium paragallinarum* є етіологічним агентом інфекційного риніту свійської птиці. Вакцини є найкращим засобом контролю хвороби за рахунок зменшення клінічних ознак та колонізації цією бактерією організму господаря. Більшість вакцин ґрунтується на міжнародних еталонних штаммах без урахування сучасної епізоотичної ситуації щодо гемофільозу на відповідних територіях. Проведено ряд лабораторних дослідів із встановлення антигенної та імуногенної активності на дослідній птиці інактивованої трьохвалентної вакцини проти гемофільозу курей з використанням епізоотично актуальних ізолятів *Av. paragallinarum* (штам «SS 6/20», серотип А; штам «SS 7/20», серотип В; штам «SS 6/20», серотип С). Оптимальним інактивантом для отримання бактеріальної сировини є формальдегід у кінцевій концентрації 0,5 % та режиму — 48 год та температури 37 °С. Виготовлено три експериментальні зразки вакцини з використанням суміші інактивованих антигенів *Av. paragallinarum* трьох серотипів (1:1:1) та ад'ювантів (зразок № 1 – АГ + «ГОА»; № 2 – АГ + «ГОА+сапонін»; №3 – АГ + «Montanide ISA 70»). Для порівняння було використано комерційну вакцину, яка зареєстрована на території України. Щеплення птиці проводили дворазово в дозі 0,5 см³ з інтервалом 21 доба, підшкірно, в ділянку середньої третини шиї. Досліджені експериментальні зразки № 2 та № 3 за антигенною активністю не поступаються комерційній вакцині, рівень антитіл коливається від 1:64 до 1:512. Імуногенна активність цих зразків становить 80-100 % у порівнянні з комерційною вакциною (група птиці № 4), імуногенна активність якої знаходиться на тому ж рівні. Реплікація збудника гемофільозу курей з патматеріалу курчат щеплених комерційною вакциною (група № 4) та експериментальними вакцинами № 2 (група № 2, ад'ювант — ГОА+сапонін) і №3 (група № 3, ад'ювант — «Montanid ISA 70») та інфікованих контрольними штамми збуднику не відмічена. Ріст культур *A. paragallinarum* на збагачених поживних середовищах виявлено у дослідних групах № 1 (експериментальний зразок вакцини № 1 з використанням ад'юванту ГОА) та № 5 (контроль)

Ключові слова: *Avibacterium paragallinarum*, свійська птиця

Гемофільоз курей (інфекційний риніт) є гострим захворюванням дихальних шляхів, що викликається *Avibacterium paragallinarum* (*Av. paragallinarum*), раніше відомим як *Haemophilus paragallinarum* [1, 2]. Клінічний синдром, викликаний даним збудником, відомий ще з 1930-х років [3]. *Av. paragallinarum* розповсюджений по всьому світі, але завдає найбільшу економічну шкоду птахівництву в країнах, що розвиваються [2]. У молодняку захворювання проявляється пригніченням, відставанням у рості, сонливістю (синдром «сплячої птиці»), у дорослих курей спостерігаються синусити, кон'юнктивіти, серозний та/або серозно-фібринозний риніт. За прогресування хвороба супроводжується синдромом «опухлої голови».

Окрім курей *Av. paragallinarum* було виділено від інших видів птахів, таких як цесарки [4], гуси [5] та качки [6]. Також *Av. gallinarum* був виділений від людей з гострим гастроентеритом та ендокардитом, але патогенність його до кінця так і не була доведена [7-9].

Збудник гемофільозу курей внаслідок патогенної дії на організм птиці викликає ускладнення в асоціації з іншими бактеріальними збудниками [10-12] такими, як *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Gallibacterium anatis* [13], *Escherichia coli* [14] і

Ornithobacterium rhinotracheale [11], та вірусами (інфекційний бронхіт, вірус інфекційного ларинготрахеїту, вірус віспи і аденовіруси) [10, 15].

Av. paragallinarum вперше був класифікований L. A. Page за допомогою аглютинації на три серовари (А, В та С) [16]. У свою чергу, К. Куте створив альтернативну схему, засновану на тесті гальмування гемаглютинації [17]. Ця модифікована схема також типує серогрупи А, В і С, при цьому додатково розпізнаються дев'ять сероварів (А1–А4, В–1 та С1–С4). Тим не менш, ці схеми потребують постійного перегляду та оновлення, оскільки багато штамів серогрупи В були віднесені до інших (А та С) [18].

Є багато повідомлень щодо використання проти даного збудника з лікувальною та профілактичною метою протимікробних препаратів, але вони лише тимчасово зменшують клінічний прояв захворювання і не можуть повністю усунути його у птиці, а при зниженні резистентності організму (погіршення умов утримання та годівлі тощо) збудник інфекції легко рецидивує [7, 19-23]. Окрім цього, недотримання рекомендованих схем застосування антибактеріальних препаратів може призвести як до розвитку стійкості збудника до антибіотиків, так і вплинути на основні біологічні особливості та появу нових генетичних варіантів бактерій з новими властивостями, часто більш вірулентних, ніж попередні [22, 24, 25].

У якості альтернативи антибіотикам та для зменшення прояву клінічних ознак є використання дезінфікуючих засобів як з питною водою так і аерозольно під час обробки пташнику у присутності птиці [26, 27], але циркуляція *Av. paragallinarum* все одно зберігається у стаді та поступово набирає своїх обертів.

Поширення збудника інфекційного риніту птиці у країнах, де птахівництво є економічно значущим напрямком, сприяло розробці засобів специфічної профілактики цього захворювання. Під час конструювання профілактичного біопрепарату виникає ряд труднощів, пов'язаних головним чином із виділенням з біологічного матеріалу від птиці бактеріальних культур зазначених серотипів. Більше того, *Av. paragallinarum* ізолюють лише на стадії гострої інфекції. Слід також відмітити, що *Av. paragallinarum* повільно зростаюча та вибаглива бактерія, і більшості штамів для росту *in vitro* необхідний фактор V-нікотинамідаденіндинуклеотид. Крім того, у процесі виділення та культивування *Av. paragallinarum* заростає іншими бактеріями *Pasteurellaceae* [7, 19, 28-30].

Також, за літературними даними [31, 32], на виділення *Av. paragallinarum* може впливати безконтрольне використання у птахівництві з лікувальною або профілактичною метою антибіотиків, як зазначено вище, та згодовування птиці комбікормів у склад яких також входять ці препарати.

Значне поширення збудника інфекційного риніту птиці у розвинутих країнах, де птахівництво є економічно значущим напрямком, сприяло розробці засобів специфічної профілактики цього захворювання. Та навіть за широкого використання в світовому птахівництві інактивованих вакцин, які містили всі три серотипи, за останні десять років спостерігається збільшення поширення захворювання – з 14 % до 25 % [31]. Збільшення відсотку може бути цілком пов'язано як з персистенцією збудника на птахофермах із різновіковою птицею, так і частковим імунітетом, що забезпечується не відповідним вмістом сероварів у комерційних вакцинах проти широко поширених у регіоні сероварів *Av. Paragallinarum*, а також роллю свійської птиці як джерела збудника [10]. Тому існуючі заходи боротьби поки не здатні захистити птахогосподарства від даного збудника [2].

Мета роботи – встановлення ефективності (антигенна та імуногенна активність, реізоляція збудника від щепленої птиці, встановлення реактогенності) розроблених експериментальних серій інактивованої емульсованої вакцини проти гемофільозу курей в лабораторних умовах на дослідній птиці.

Матеріали та методи. У даній науковій публікації наведено результати власних досліджень, аналізу даних відділу хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ») та Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).

З метою встановлення антигенної активності трьох експериментальних зразків вакцини проти гемофільозу курей проведено лабораторні випробування на дослідній птиці (курчата-бройлери кросу «КОББ-500» 8 тижневого віку) (табл. 1).

Таблиця 1 — Експериментальні зразки інактивованої вакцини проти гемофільозу курей

Номер експериментального зразка інактивованої вакцини	Використаний штам збудника та його серотип	Співвідношення штамів (А:В:С)	Ад'ювант	Номер дослідної групи птиці
№ 1	штам SS 6/20 (серотип А), штам SS 7/20 (серотип В), штам SS 8/20 (серотип С)	1:1:1	гідроокис алюмінію (ГОА)	№1
№ 2	штам SS 6/20 (серотип А), штам SS 7/20 (серотип В), штам SS 8/20 (серотип С)	1:1:1	ГОА+ сапонін	№2
№ 3	штам SS 6/20 (серотип А), штам SS 7/20 (серотип В), штам SS 8/20 (серотип С)	1:1:1	Montanid ISA 70	№3

У якості порівняльного контролю використовували комерційну вакцину, зареєстровану на території України (група птиці № 4). 5 група птиці була контрольною. Кожна дослідна та контрольна група птиці складалась із п'ятнадцяти голів.

Щеплення птиці експериментальними зразками вакцини проводили дворазово в дозі 0,5 см³ з інтервалом 21 доба, підшкірно, у ділянку середньої третини шиї.

Оцінку напруженості імунітету в птиці після застосування експериментальних зразків вакцини проводили в реакції аглютинації (РА) макрометодом у полістиролових планшетах за методикою, описаною L. Page (1962) [32].

З цією метою використано сироватки крові щепленої птиці, відібрані через 21 добу після першого введення вакцини та через 21 добу після ревакцинації. У якості антигену для РА використовували антигени штамів (SS 6/20, серотип А; SS 7/20, серотип В; SS 8/20, серотип С), які входять до складу вакцини.

Постановка реакції: у круглодонних лунках планшета готували двократні розведення сироваток в об'ємі 0,4 см³ на фосфатно-сольовому буфері, починаючи з 1:2 до 1:1024. Потім в кожен лунку вносили по 0,4 см³ антигену. Вміст лунок перемішували струшуванням планшета і ставили на контакт у термостат за 37 °С на 2 год, після чого залишали за кімнатної температури (20-25 °С) на 12 год.

Реакцію оцінювали за «чотирьоххрестової» системи. За титр брали найбільше розведення сироватки, яке дає чітко виражену аглютинацію антигену («+++» або «++++»). Одночасно проводили тестування на відсутність спонтанної аглютинації антигену (негативний контроль).

Імуногенні властивості експериментальних зразків № 1-3 (групи птиці № 1-3) та комерційної вакцини (група № 4) визначали методом контрольного інфікування вакцинованої птиці гомологічними ізолятами. Для цього дослідні (вакциновані) та контрольну (не вакциновану) птицю (група № 5) було інфіковано інтраназально 20-год добовою бульйонною культурою ізолятів у дозі 0,5 см³, з вмістом не менше 10⁸ КУО збудника. Крім того, проводили щоденний огляд кожної особини щодо можливих клінічних ознак та можливої місцевої реакції (реактогенність) у місці введення вакцини (гіперемія шкіри, абсцеси).

Результати досліджень. Під час розробки технології виготовлення вакцини було опрацьовано та проаналізовано як закордонну, так і вітчизняну науково-специфічну літературу. У якості антигенної складової були використанні епізоотично актуальні штами трьох серотипів (серотип А – штам «SS 6/20», серотип В – штам «SS 7/20», серотип С – штам «SS 6/20»). У якості інактиванта використано формалін (кінцева концентрація 0,5 %) та підібраний режим інактивації (48 год та температури 37 °С). Для отримання стабільного препарату було використано гідроксид алюмінію в суміші з емульгаторами сапонін та без, а також готовий ад'ювант — «Montanid ISA 70» фірми «SEPPIC» (Франція).

У результаті розробленої технології було виготовлено три експериментальні зразки інактивованої вакцини (№ 1: штам SS 6/20, серотип А; штам SS 7/20, серотип В; штам SS 8/20, серотип С; ад'ювант – гідроокис алюмінію (ГОА); № 2: штам SS 6/20, серотип А; штам SS 7/20, серотип В; штам SS 8/20, серотип С; ад'ювант – ГОА+сапонін; № 3: штам SS 6/20, серотип А;

Розділ 5. Біотехнологія

штам SS 7/20, серотип В; штам SS 8/20, серотип С; ад'ювант – «Montanid ISA 70»), які відповідали внутрішньолабораторним вимогам за якістю та були нешкідливими для лабораторних мишей.

З метою визначення антигенної активності експериментальних зразків інактивованої вакцини проти гемофільозу курей на дослідному поголів'ї птиці проведено дворазовий відбір зразків крові для РА – на 21 добу після першого щеплення та через 21 добу після другої ін'єкції. Результати наведено у таблиці 2.

Таблиця 2 — Результати визначення антигенної активності експериментальних зразків та комерційної вакцини проти гемофільозу птиці (по 5 голів на серотип)

Номер дослідної групи птиці	Титри АТ через 21 день після I вакцинації (log ₂)			Титри АТ через 21 день після II вакцинації (log ₂)		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
№ 1 (зразок № 1)	3	4	3	4	5	4
	1	4	3	4	5	4
	3	4	3	3	4	4
	2	2	1	2	5	3
	2	3	1	3	3	2
У середньому	2,2±2,05 CV=34%	3,4±3,29 CV=23,5%	2,2±1,93 CV=44,5%	3,2±3,10 CV=23,4%	4,4±4,32 CV=18,2%	3,4±3,29 CV=23,5%
№ 2 (зразок № 2)	6	7	7	8	9	8
	6	6	6	8	7	7
	5	7	5	7	8	6
	6	7	7	8	8	8
	4	5	7	6	7	8
У середньому	5,4±5,33 CV=14,8%	6,4±6,35 CV=12,5%	6,4±6,35 CV=12,5%	7,4±7,35 CV=10,8%	7,8±7,76 CV=9,5%	7,4±7,35 CV=10,8%
№ 3 (зразок № 3)	5	6	7	8	9	8
	6	4	7	8	6	8
	5	4	6	7	7	8
	4	5	6	6	8	7
	3	6	7	6	9	7
У середньому	4,6±4,48 CV=22,2%	5,0±4,92 CV=17,9%	6,6±6,58 CV=7,4%	7,0±6,94 CV=12,8%	7,8±7,71 CV=14,9%	7,6±7,58 CV=6,4%
№ 4 (комерційна вакцина)	6	7	7	8	8	9
	6	3	7	8	7	8
	5	4	6	8	7	7
	3	7	4	6	8	7
	4	7	7	7	8	8
У середньому	4,8±4,64 CV=24,3%	5,6±5,28 CV=31,1%	6,2±6,07 CV=18,8%	7,4±7,35 CV=10,8%	7,6±7,58 CV=6,4%	7,8±7,76 CV=9,5%
№ 5 (контроль)	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

Так, з результатів таблиці 2 видно, що на 21 день після щеплення найвища антигенна активність була відмічена у групі щепленої птиці № 2: середній титр антитіл до антигену серотип А (штам SS 6/20) – 5,4±5,33, до серотипу серотип В (штам SS 7/20) – 6,4±6,35 log₂, до серотипу С (штам SS 8/20) – 6,4±6,35 log₂. Титри коливались від 1:16 до 1:128. Через 21 добу після ревакцинації високий показник антигенної активності був відмічений у групі № 2 та № 3. Так, середній титр антитіл у сироватках крові дослідної групи птиці № 2 до антигену серотипу А

(штам SS 6/20) становив $7,4 \pm 7,35 \log_2$, до серотипу В (штам SS 7/20) – $7,8 \pm 7,76 \log_2$, до серотипу С (штам SS 8/20) – $7,4 \pm 7,35 \log_2$. У птиці з дослідної групи №3 ці показники були наступні – $7,0 \pm 6,94 \log_2$, $7,8 \pm 7,71 \log_2$, $7,6 \pm 7,58 \log_2$ відповідно до антигенів А, В та С. Коливання титрів антитіл у обох групах були аналогічними – від 1:64 до 1:512.

Слід відмітити, що досліджені експериментальні зразки № 2 та № 3 за антигенною активністю не поступались комерційній вакцині, а рівень антитіл у птиці, щепленої дослідними зразками, знаходився майже на тому ж рівні, що і у птиці групи 4.

Імуногенні властивості експериментальних зразків № 1, 2, 3 та комерційної вакцини визначали контрольним зараження вакцинованої птиці гомологічними ізолятами (таблиця 3).

Таблиця 3 — Визначення імуногенних властивостей експериментальних зразків та комерційної вакцини проти гемофільозу птиці (по 5 голів на серотип)

Номер дослідної групи птиці	Птиця з клінічними ознаками хвороби, % (гол)			Загибель птиці, % (гол)		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	40 (2)	20 (1)	40 (2)	20 (1)	0	20 (1)
2 (зразок № 2)	20 (1)	0	20 (1)	0	0	0
3 (зразок № 3)	20 (1)	0	20 (1)	0	0	0
4 (комерційна вакцина)	20 (1)	0	20 (1)	0	0	0
5 (контроль)	100 (5)	60 (30)	100 (5)	80 (4)	60 (3)	100 (5)

Імуногенна активність експериментальних зразків № 2 і 3 становила 80-100 % у порівнянні з комерційною вакциною, імуногенна активність якої знаходиться на тому ж рівні.

У таблиці 4 представлені дані щодо залежності між титром антитіл після щеплення та відсотком захисту птиці за визначення імуногенності експериментальних серій вакцини та комерційного препарату.

Таблиця 4 — Залежність між титром антитіл та відсотком захисту птиці

Номер дослідної групи птиці	Титр антитіл через 21 добу після II вакцинації (\log_2)			% захисту		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	$3,2 \pm 3,10$	$4,4 \pm 4,32$	$3,4 \pm 3,29$	60	80	60
2 (зразок № 2)	$7,4 \pm 7,35$	$7,8 \pm 7,76$	$7,4 \pm 7,35$	80	100	80
3 (зразок № 3)	$7,0 \pm 6,94$	$7,8 \pm 7,71$	$7,6 \pm 7,58$	80	100	80
4 (комерційна вакцина)	$7,4 \pm 7,35$	$7,6 \pm 7,58$	$7,8 \pm 7,76$	80	100	80

На сьому добу після введення контрольних штамів птицю дослідних груп було евтаназовано та відібрано слизові оболонки підочних синусів для бактеріологічних досліджень. Результати наведено у таблиці 5.

Таблиця 5 — Реізоляція *Av. paragallinarum* після контрольного інфікування щепленої птиці (по 5 голів на серотип)

Номер дослідної групи птиці	Реізоляція збудника, % (гол)		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	20 (1 гол.)	0	20 (1 гол.)
2 (зразок № 2)	0	0	0
3 (зразок № 3)	0	0	0
4 (комерційна вакцина)	0	0	0
5 (контроль)	80 (4 гол.)	60 (3 гол.)	100 (5 гол.)

Так, під час проведення бактеріологічних досліджень біологічного матеріалу, відібраного від птиці, ріст культур *Av. paragallinarum* на збагачених поживних середовищах виявлено у

дослідних групах № 1 (експериментальний зразок вакцини № 1 з використанням ад'юванту ГОА) та № 5 (контроль).

Як видно з таблиці 6, рівень антитіл до *A. paragallinarum* (серотип А, В, С) у сироватках крові дослідних груп птиці № 2, 3 та № 4 (1:256-512) сприяв 80-100 % захисту птиці від контрольних штамів збудника.

Таблиця 6 — Залежність між титром антитіл до *Av. paragallinarum* та відсотком захисту птиці

Номер дослідної групи птиці	Титр антитіл через 21 добу після II вакцинації			% захисту		
	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20	ізолят SS 6/20	ізолят SS 7/20	ізолят SS 8/20
1 (зразок № 1)	1:16	1:32	1:16	60	80	60
2 (зразок № 2)	1:256	1: 512	1: 256	80	100	80
3 (зразок № 3)	1:256	1: 512	1: 256	80	100	80
4 (комерційна вакцина)	1:256	1: 256	1: 512	80	100	80

Обговорення. Дані наукові результати є першим опублікованим дослідженням лабораторних випробувань вітчизняної інактивованої трьохвалентної вакцини проти гемофільозу курей.

Перед ветеринарними фахівцями постійно виникає дилема щодо використання на поголів'ї птиці профілактичних вакцин, у склад яких входять «місцеві» або «міжнародні» штами. Великі глобальні виробники вакцин, як правило, конструюють свої препарати на стандартних, визнаних у всьому світі штаммах. Ці «міжнародні» вакцини реалізуються всюди на тій підставі, що місцеві відмінності збудників є недостатніми для виправдання додавання або видалення штамів. Тому, низка дослідницьких груп, зокрема Bragg et al. [34] у Південній Африці і Terzolo et al. [35] в Аргентині, Guo, M. et al. та Xu Y. et al. [2, 36], а також у Китаї вказують на відсутність перехресного захисту серед вакцинних сероварів, що ймовірно, є причиною появи варіантних штамів та підвищеної вірулентності місцевих культур *Av. paragallinarum*.

Тому, нашою метою було проведення ряду дослідів на птиці з визначення антигенної та імуногенної активності трьох зразків інактивованої трьохвалентної вакцини проти гемофільозу курей з використанням епізоотично актуальних ізолятів *Av. paragallinarum* (штам «SS 6/20», серотип А; штам «SS 7/20», серотип В; штам «SS 6/20», серотип С).

Ефективність (антигенна активність, імуногенність) та нешкідливість (реактогенність) запропонованої вакцини також залежала від використаного нами інактиванта – формаліну (кінцева концентрація 0,5 %) та режиму інактивації (48 год за температури 37 °С), за використання якого нейтралізується інфекційна активність та зберігаються властивості щодо антигенної активності бактеріальної сировини, а також відсутність негативних наслідків (реактогенність) за введення в організм птиці залишків хімічної речовини. Формалін має довгу історію безпечного використання у виробництві біопрепаратів, у тому числі і вакцин проти гемофільозу курей [37, 38].

Використання ад'ювантів підвищує імунну реакцію на введення вакцини, іноді шляхом більш тривалого утримання біопрепарату в місці ін'єкції або стимулювання місцевих імунних клітин.

Тому, нами з метою підвищення антигенної та імуногенної активності у складі вакцин використано ряд ад'ювантів: зразок № 1 – гідроокис алюмінію (ГОА), зразок № 2 – ГОА+сапонін, зразок № 3 – «Montanid ISA 70».

«Montanid ISA 70» фірми «SEPPIC» (Франція) має перевагу в зменшенні кількості технологічних операцій та тривалості процесу виробництва порівняно з класичним ад'ювантом, та дозволяє отримати більш стабільну емульсію [39].

Використання у складі вакцини проти гемофільозу курей гідроксиду алюмінію є давно відома ад'ювантна система [40-43], яка згідно літературних даних [44], довела свою ефективність при введенні або підшкірно (в задню частину шиї), або внутрішньом'язово (у грудний м'яз), але не ефективна при інтраназальному введенні.

Ще з кінця 80-х років минулого століття серед науковців загальна думка полягала в тому, що щеплення птиці з ревакцинацією є більш ефективним, ніж однократне [44-46]. Це твердження залишається незмінним і на даний час [2].

Розроблений нами метод використання експериментальних серій вакцини № 2 та № 3 – доза (0,5 см³), шлях введення (підшкірно, в ділянку середньої третини шиї) та кратність (дворазово в дозі з інтервалом 21 доба) довів свою ефективність. Так, зазначені експериментальні серії вакцини за антигенною активністю не поступались навіть комерційній вакцині, а рівень антитіл у птиці становив від 1:64 до 1:512.

Згідно літературних даних [2], чим вище рівень поствакцинальних антитіл, тим птиця залишається більш стійкою до збудника, навіть за контрольного інфікування. Цей факт було також підтверджено і у наших дослідах із імуногенності. Так, імуногенна активність експериментальних зразків № 2 (ад'ювант – ГОА+сапонін) і № 3 (ад'ювант – «Montanid ISA 70») становила 80-100 %, та не поступалась комерційній вакцині (група птиці № 4), де вказаний показник також був на тому ж рівні. Також, у зазначених дослідних груп птиці не відмічали клінічних симптомів захворювання та типових патологічних змін при розтині.

Слід відмітити, що реплікація збудника гемофільозу курей з патматеріалу курчат, щеплених комерційною вакциною (група № 4), та експериментальними серіями вакцини № 2 (група № 2, ад'ювант – ГОА+сапонін) і № 3 (група № 3, ад'ювант – «Montanid ISA 70») з наступним інфікуванням контрольними штамми, також не відмічена.

Ріст культур *Av. paragallinarum* на збагачених поживних середовищах виявлено лише в контрольній групі № 5 (від 3 до 5 гол. до кожного контрольного штаму) та дослідній групі № 1 (експериментальний зразок вакцини № 1 з використанням ад'юванту ГОА) – по одній особині до контрольних штамів «SS 6/20» та «SS 8/20».

Проте, необхідно зазначити, що експериментальний зразок № 3 (ад'ювант – «Montanid ISA 70») за підшкірного введення в місці ін'єкції викликав запальні реакції (гіперемія шкіри), які не зникали впродовж 2-3 тижнів, у той час як використання поєднання ГОА із сапоніном (зразок № 2) не викликало подібних ускладнень.

У науковій літературі аспекту побічних реакцій при використанні профілактичних вакцин проти гемофільозу курей приділялось багато уваги. Було висловлено припущення, що побічні реакції пов'язані з використанням у складі інактивованих вакцин ад'ювантів, або ліпополісахаридів, які присутні у клітинах *Av. paragallinarum*, або комплексу – ад'ювант/ліпополісахарид [47]. Так, Konno Y. et al. [48] довів летальність ліпополісахариду *Av. paragallinarum* на 10-добових курячих ембріонах (KE), що розвиваються, та позитивну реакцію на піроген (ендотоксини грамнегативних бактерій). Iritani Y. et al. [47] також показали, що грубо очищений екстракт полісахариду містить компонент, який є токсичним і викликає гідроперикардит після внутрішньовенної ін'єкції курчатам. Тому, за використання біологічних препаратів, які містять у своєму складі бактерії та ад'юванти, особливо мінеральну олію, слід враховувати потенційну негативну реакцію в місці ін'єкції [49].

Висновки та перспективи подальших досліджень. Аналіз розповсюдження інфекційного риніту в світі, незважаючи на помітний прогрес в діагностиці та вакцинопрофілактиці інфекційних хвороб, показав, що проблема боротьби з бактеріальними інфекціями, зокрема з інфекційним ринітом, не вирішена, та потребує постійного контролю та вдосконалення існуючих засобів специфічної профілактики, шляхом підбору відповідних епізоотично актуальних штамів.

У подальшому планується провести виробничі випробування розробленої інактивованої вакцини проти гемофільозу курей.

Список літератури

1. Blackall P. J. et al. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005. Vol. 55, Pt. 1. P. 353–362. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63357-0>.
2. Guo M. et al. The protective efficacy of an inactivated vaccine against *Avibacterium paragallinarum* field isolates. *Veterinary Sciences*. 2022. Vol. 9, No 9. P. 458. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9090458>.
3. Blackall P. J., Soriano-Vargas E. Chapter 20. Infectious coryza and related bacterial infections // *Diseases of Poultry* / Ed. D. E. Swayne. 13th ed. Ames: John Wiley & Sons, 2013. P. 859–873. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch20>.

4. Mohan K, Dziva F, Chitauru D. *Pasteurella gallinarum*: Zimbabwean experience of a versatile pathogen. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2000. Vol. 67. P. 301–305.
5. Mushin R, Bock R, Abrams M. Studies on *Pasteurella gallinarum*. *Avian Pathology*. 1977. Vol. 6. P. 415–423. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457708418250>.
6. Muhairwa A. P. et al. Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. *Veterinary Microbiology*. 2001. Vol. 78. P. 139–153. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00296-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00296-0).
7. Blackall P. J, Soriano-Vargas E. Infectious coryza and related bacterial infections // Diseases of Poultry / Ed. D. E. Swayne. 14th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2020. P. 890–906. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch20>.
8. Frederiksen W, Tønning B. Possible misidentification of *Haemophilus aphrophilus* as *Pasteurella gallinarum*. *Clin Infect Dis*. 2001. Vol. 32. P. 987–989. DOI: <https://doi.org/10.1086/319358>.
9. Ahmed K. et al. *Pasteurella gallinarum* neonatal meningitis. *Clin Microbiol Infect*. 2002. Vol. 8. P. 55–57. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00354.x>.
10. Gallardo R. A. et al. Infectious Coryza: Persistence, Genotyping, and Vaccine Testing. *Avian Diseases*. 2020. Vol. 64. P. 157–165. DOI: <https://doi.org/10.1637/0005-2086-64.2.157>.
11. Morales-Erasto, F. et al. Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in Chickens from Peru. *Avian Diseases*. 2015. Vol. 60, No1. P. 75–78. DOI: <https://doi.org/10.1637/11265-082015-ResNote.1>.
12. Crispo M, et al. Otitis and meningoencephalitis associated with infectious coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in commercial broiler chickens. *J Vet Diagn Invest*. 2018. Vol. 30, No 5. P. 784–788. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638718792964>.
13. Paudel S, Hess M, Hess C. Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Gallibacterium anatis* in Specific-Pathogen-Free Chickens Complicates Clinical Signs of Infectious Coryza, Which Can Be Prevented by Vaccination. *Avian Dis*. 2017. Vol. 61, No 1. P. 55–63. DOI: <https://doi.org/10.1637/11481-081016-reg>.
14. Crispo M. et al. Characterization of an Outbreak of Infectious Coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in Commercial Chickens in Central California. *Avian Dis*. 2019. Vol. 63. P. 486–494. DOI: <https://doi.org/10.1637/19-00081.1>.
15. Mei C. et al. Concurrent infection of *Avibacterium paragallinarum* and fowl adenovirus in layer chickens. *Poult Sci*. 2020. Vol. 99, No 12. P. 6525–6532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.033>.
16. Blackall P. J., Eaves L. E., Rogers D. G. Proposal of a New Serovar and Altered Nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume Hemagglutinin Scheme. *J. Clin. Microbiol*. 1990. Vol. 28. P. 1185–1187. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.28.6.1185-1187.1990>.
17. Kume K. et al. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol*. 1983. Vol. 17. P. 958–964. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.17.6.958-964.1983>.
18. Caballero-Garcia M. et al. Pathogenicity of *Avibacterium paragallinarum* Strains from Peru and the Selection of Candidate Strains for an Inactivated Vaccine. *Vaccines*. 2022. Vol. 10, No 7. P. 1043. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10071043>.
19. Wahyuni A. E. T. H. et al. Isolation, identification, and serotyping of *Avibacterium paragallinarum* from quails in Indonesia with typical infectious coryza disease symptoms. *Vet. World*. 2018. Vol. 11. P. 519–524. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.519-524>.
20. Blackall P. J. Antimicrobial Drug Resistance and the Occurrence of Plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*. 1988. Vol. 32. P. 742–247. DOI: <https://doi.org/10.2307/1590993>.
21. Hsu Y., Shieh H., Chen W. Antimicrobial Susceptibility, Plasmid Profiles and Haemocin Activities of *Avibacterium paragallinarum* Strains. *Vet. Microbiol*. 2007. Vol. 124. P. 209–218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.024>.
22. Luna-Galaz G. A., et al. Antimicrobial sensitivity of *Avibacterium paragallinarum* isolates from four Latin American countries. *Avian Diseases*. 2016. Vol. 60, No 3. P. 673–676. DOI: <https://doi.org/10.1637/11398-022616-resnote.1>.
23. Nhung N. T., Chansiripornchai N., Carrique-Mas J. J. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. *Frontiers in Veterinary Science*. 2017. Vol. 4. P. 126. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>.
24. Chukiatsiri K. et al. Serovar identification, antimicrobial sensitivity, and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. *Avian Dis*. 2012. Vol. 56, No 2. P. 359–364. DOI: <https://doi.org/10.1637/9881-080811-reg.1>
25. Nielsen S. S. et al. 2021. Scientific Opinion on the assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: Poultry. *EFSA Journal*. 2021. Vol. 19, No 12. P. e07114. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.7114>.
26. Huberman Y. D., Bueno D. J., Terzolo H. R. Evaluation of the protection conferred by a disinfectant against clinical disease caused by *Avibacterium paragallinarum* serovars A, B, and C from Argentina. *Avian Diseases*. 2005. Vol. 49, No 4. P. 588–591. DOI: <https://doi.org/10.1637/7374-050405r.1>.
27. Bragg R. R. Limitation of the spread and impact of infectious coryza through the use of a continuous disinfection programme. *Onderstepoort J Vet Res*. 2004. Vol. 71, No 1. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.4102/ojvr.v71i1.280>.
28. Patil V. V., Mishra D., Mane D. V. 16S ribosomal RNA sequencing and molecular serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolated from Indian field conditions. *Vet World*. 2017. Vol. 10, No 8. P. 1004–1007. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1004-1007>.
29. Ahmadi B., Nasri M. Prevalence of poultry bacterial diseases in different altitudes of Ilam province. *Veterinary Research and Biological Products*. 2018. Vol. 31, No 1. P. 87–92.
30. Nouri A. et al. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* from backyard chicken in retail markets of Karaj and Tehran cities, Iran. *Archives of Razi Institute*. 2020. Vol. 76. P. 1047–1053. DOI: <https://doi.org/10.22092/ari.2020.343173.1502>.

31. Han M. S. et al. The current epidemiological status of infectious coryza and efficacy of PoulShot Coryza in specific pathogen-free chickens. *J Vet Sci.* 2016. Vol. 30, No 17. P. 323–330. DOI: <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.3.323>.
32. Beiranvand S. et al. Novel NAD-independent *Avibacterium paragallinarum*: Isolation, characterization and molecular identification in Iran. *Vet Med Sci.* 2022. Vol. 8, No 3. P. 1157–1165. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.754>.
33. Page L. A. Haemophilus infections in chickens. I. Characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 1962. Vol. 23. P. 85–95.
34. Bragg R. R., Coetzee L., Verschoor J. A. Changes in the incidences of the different serovars of Haemophilus paragallinarum in South Africa: a possible explanation for vaccination failures. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1996. Vol. 63. P. 217–226.
35. Terzolo H. R., Sandoval V. E., Pondal F. G. Evaluation of Inactivated Infectious Coryza Vaccines in Chickens Challenged by Serovar B Strains of Haemophilus paragallinarum. *Avian Pathol.* 1997. Vol. 26. P. 365–376. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079459708419219>.
36. Xu Y. et al. Characterization of emergent *Avibacterium paragallinarum* strains and the protection conferred by infectious coryza vaccines against them in China. *Poult Sci.* 2019. Vol. 98, No 12. P. 6463–6471. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pez531>.
37. Rimler R. B. et al. A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza. *Avian Diseases.* 1975. Vol. 19. P. 318–322.
38. Coetzee L., Strydom, G. S., Rogers E. J. The value of oil-adjuvant vaccines in the control of Haemophilus paragallinarum infection (infectious coryza) in egg producing birds in South Africa. *Developments in Biological Standardisation.* 1982. Vol. 51. P. 169–180.
39. Чергинець А. І., Салій О. О., Любецький О. В. Дослідження впливу ад'ювантів на фізичні властивості інактивованої вакцини проти хвороби Ньюкасла. Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії : матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, м. Харків, 26 листопада 2020 року. Харків : Вид-во НФаУ, 2020. С. 496–497.
40. Matsumoto M., Yamamoto R. A broth bacterin against infectious coryza: immunogenicity of various preparations. *Avian Diseases.* 1971. Vol. 15. P. 109–117.
41. Kume K., Sawata A., Nakase Y. Relationship between protective activity and antigen structure of Haemophilus paragallinarum serotypes 1 and 2. *American Journal of Veterinary Research.* 1980. Vol. 41. P. 97–100.
42. Reid G. G., Blackall P. J. Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. *Avian Diseases.* 1987. Vol. 31. P. 59–63.
43. Davis R. B. et al. Efficacy studies on Haemophilus gallinarum bacterin preparations. *American Journal of Veterinary Research.* 1976. Vol. 37. P. 219–222.
44. Blackall P. J., Reid G. G. Further Efficacy Studies on Inactivated, Aluminum-Hydroxide-Adsorbed Vaccines against Infectious Coryza. *Avian Diseases.* 1987. Vol. 31. P. 527–532. DOI: <https://doi.org/10.2307/1590735>.
45. Matsumoto M., Yamamoto R. Protective quality of an aluminum hydroxideadsorbed broth bacterin against infectious coryza. *American Journal of Veterinary Research.* 1975. Vol. 36. P. 579–582.
46. Kume K., Sawata A., Nakase Y. Haemophilus infections in chickens. 3. Immunogenicity of serotypes 1 and 2 strains of Haemophilus paragallinarum. *Japanese Journal of Veterinary Science.* 1980. Vol. 42. P. 673–680. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms1939.42.673>.
47. Iritani Y., Iwaki S., Yamaguchi, T. Biological activity of crude polysaccharideextracted from two different immunotype strains of Hemophilus gallinarum in chickens. *Avian Diseases.* 1981. Vol. 25. P. 29–37.
48. Konno Y., Nakase Y. Purification of endotoxin of Haemophilus gallinarum and their biological activity. *Japanese Journal of Bacteriology.* 1977. Vol. 32. P. 212.
49. Droual R. et al. Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens. *Avian Diseases.* 1990. Vol. 34. P. 473–478.

STUDY OF ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC ACTIVITY OF EXPERIMENTAL SERIES OF INACTIVATED EMULSIFIED VACCINE AGAINST CHICKEN HEMOPHILOSIS IN LABORATORY CONDITIONS

Kolesnikov A. O., Stegnyy B. T.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Worldwide, *Avibacterium paragallinarum* is the etiological agent of infectious rhinitis in poultry. Most vaccines are based on international reference strains without taking into account the current epizootic situation of hemophilosis in the respective territories. Using a mixture of inactivated *Av. paragallinarum* antigens (SS 6/20, A; SS 7/20, B; SS 8/20, C) of three serotypes (1:1:1) and (sample No 1 – AG + «aluminum hydroxide»; No 2 – AG + «aluminum hydroxide + saponin»; No 3 – AG + «Montanide ISA 70») obtained experimental samples of the domestic inactivated vaccine against chicken rhinitis. The antigenic and immunogenic activity of the inactivated trivalent vaccine on chickens was established. A commercial vaccine registered on the territory of Ukraine was used as a comparison. Vaccination of birds was carried out twice in a dose of 0.5 cm³ with an interval of 21 days, subcutaneously, in the area of the middle third of the neck. The investigated experimental samples No 2 and No 3 are not inferior to the commercial vaccine in terms of antigenic activity; antibody levels range from 1:64 to 1:512. The immunogenic activity of these samples is 80–100% compared to the commercial vaccine (poultry group 4), the immunogenic activity of which is at the same level. Replication of the causative agent of *Haemophilus* infection in chickens from the paternal material

of chickens vaccinated with a commercial vaccine (group 4) and experimental vaccines №2 (group 2, adjuvant – «aluminum hydroxide + saponin») and №3 (group 3, adjuvant – «Montanid ISA 70») and infected with control strains of the pathogen was not noted

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*, poultry

УДК 619:616.98:578.82/.83[IPNV]:597.552.51

DOI 10.36016/VM-2023-109-16

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕПРОДУКЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ (IPNV) В УМОВАХ *IN VITRO*

Рудь Ю. П.^{1,2}, Залоїло О. В.¹, Грициняк І. І.¹, Буцацький Л. П.^{1,2}

¹ Інститут рибного господарства Національної академії аграрних наук України, Київ, Україна, e-mail: rudziknew@ukr.net

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Метою роботи було вивчити репродукцію нових емерджентних ізолятів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) в умовах *in vitro* для визначення вірулентних властивостей. В роботі досліджували нові ізоляти IPNV, виділені у форелевих господарствах України упродовж 2021-2022 років. При роботі з вірусом використовували культуру клітин RTG-2, на якій визначали інфекційний титр вірусу та прояв ознак ЦПД. Інфекційний титр виділених ізолятів в культурі клітин RTG-2 коливався в межах від $1,1 \times 10^3$ до $1,0 \times 10^7$ TCID₅₀/мл. Виділені ізоляти IPNV спричиняли низький ($\leq 25\%$), помірний ($\leq 50\%$) та високий ($\geq 70\%$) рівні смертності у малька лососевих. На основі біологічних властивостей та показників інфекційного титру досліджувані ізоляти VN11, VN18 та VN29 були визначені як низьковірулентні, а ізоляти VN20, VN30, VN32 і VN39 віднесено до високовірулентних. Серед високовірулентних ізолятів, VN32 мав найвищий титр $1,0 \times 10^7$ TCID₅₀/мл та спричиняв смертність у райдужної форелі, середня вага якої становила 100 г. Виділений від палії ізолят вірусу IPNV мав інфекційний титр $1,58 \times 10^6$ TCID₅₀/мл, а смертність малька коливалась в межах 15-25%. Кількість виявлених ізолятів та їх культуральні властивості свідчать про біорізноманіття ізолятів і штамів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в Україні. Скільки нововиявлених ізолятів вірусу належать до того чи іншого штаму треба ще визначити. Для цього буде проведено дослідження нуклеотидної послідовності гена, що кодує капсидний білок VP2, на основі якого також буде можливість визначити вірулентність за змінами в амінокислотах

Ключові слова: культура клітин, інфекційний титр, Salmonidae

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу (*Infectious pancreatic necrosis virus* або IPNV) спричиняє висококонтагіозне інфекційне захворювання у лососевих (Salmonidae). Вірус належить до роду *Aquabirnavirus*, родина Birnaviridae. Віріони IPNV мають ікосаедричний капсид діаметром близько 65 нм, в середині якого розміщено два сегменти дволанцюгової РНК (А і В) розміром 3100 і 2784 пари нуклеотидів (п.н.) відповідно [1].

В Україні захворювання інфекційний панкреатичний некроз зустрічається у палії (*Salvelinus fontinalis*), струмкової форелі (*Salmo trutta*) та райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) [2-4]. Через значний економічний вплив вірусу на галузь аквакультури, великі зусилля в усьому світі приділяють контролю захворювання за допомогою різних підходів: рання діагностика та оцінка біологічних ризиків, контроль торгівлі об'єктами аквакультури, скринінг природних популяцій та вивчення генотипів вірусу і розробка вакцин [1].

Забезпечення біологічної безпеки та біологічного захисту рибництва в Україні є пріоритетним напрямом досліджень Інституту рибного господарства НААН. Тому в умовах актуальної проблеми щодо емерджентних захворювань в аквакультурі, ми обрали за мету наших досліджень вивчити репродукцію нових ізолятів IPNV в умовах *in vitro* для визначення вірулентних властивостей ізолятів, виділених у форелевих господарствах України упродовж 2021-2022 років.

Матеріали та методи. При роботі з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу в умовах *in vitro* використовували культуру клітин RTG-2 (Rainbow Trout Gonad Tissue, ECACC 90102529). Клітин RTG-2 культивували на поживному середовищі DME/F-12-HEPES (Euroclone, ЕСМ0095L) з додаванням 10-% інактивованої ембріональної телячої сироватки NBCS (Gibco, 16010-167) та розчину антибіотиків та антимікотика (HyClone, SV30079.01). Клітини культивували у вигляді моношарових культур у пластикових флаконах Cellstar (Greiner Bio-One, 690160) площею 25 см² при температурі 15°C з інтервалом субкультивування 6-7 днів. Для визначення інфекційного титру вірусу використовували 96-луночні планшети Cellstar (Greiner Bio-One, 655180) з 24-годинною культурою клітин [3]. Підрахунок інфекційного титру ізолятів вірусу проводили за загальноприйнятим методом [5]. В роботі використовували ізоляти вірусу IPNV, виділені у період з 2021 по 2022 рік, а саме VN11 (Харківська обл.), VN18 (Волинська обл.), VN20 (Закарпатська обл.), VN29 (Рівненська обл.), VN30 і VN32 (Волинська обл.), VN39 (Львівська обл.) та контрольний штам вірусу VN1 (штам «Карпати» [6], Чернівецька обл.). Упродовж експерименту проводили щоденну перевірку стану дослідних та контрольних планшетів з метою виявлення ознак цитопатичної дії (ЦПД) вірусу на клітини.

Результати досліджень та їх обговорення. Упродовж періоду з 2021 по 2022 рік нами було виділено 7 ізолятів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу зі спеціалізованих рибогосподарських підприємств. У переважній більшості випадків спалахи захворювання фіксували у малька райдужної форелі. Смертність риби сягала від 20 до 70 %, що значною мірою впливало на функціонування підприємств. Три з семи ізолятів вірусу було виявлено у малька форелі, який вирощувався з імпортованої заплідненої ікри, а два ізоляти було ідентифіковано як повторні спалахи на господарствах, на яких дане захворювання відмічалось раніше. Ще два ізоляти вірусу було виявлено на господарствах, на яких використовується власний рибопосадковий матеріал, що може свідчити про хронічне інфікування плідників або потрапляння вірусу через систему водопостачання з відкритих джерел.

За результатами проведених досліджень можна стверджувати, що на території досліджуваних нами господарств циркулюють штами вірусу IPNV з різними культуральними властивостями. Так титр виділених ізолятів в культурі клітин RTG-2, яка є однією з найбільш чутливих до даного вірусу, коливався в межах від 1,1x10³ до 1,0x10⁷ TCID₅₀/мл (таблиця). Така різноманітність у властивостях виявлених ізолятів вірусу IPNV може свідчити про циркуляцію як ослаблених штамів вірусу, так і надходження нових більш вірулентних форм вірусу з імпортованим рибопосадковим матеріалом. Низький (≤25 %) або помірний (≤50 %) рівень смертності риби на господарстві характеризував виділений ізолят вірусу як низьковірулентний та з низьким титром вірусу в культурі клітин. До таких ізолятів можна віднести віруси, виявлені в Харківській (VN11), Волинській (VN18) на Рівненській (VN29) областях. Послаблення вірулентних властивостей вірусу може відбуватися за рахунок довготривалої персистенції вірусу на господарствах, зміни властивостей віронів (мутації) та вироблення імунітету у хазяїна [7].

Таблиця — Титр вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в культурі клітин RTG-2

Ізолят	Рік виділення	Область виділення вірусу	Хазяїн	Вага риби, г	Титр вірусу, TCID ₅₀ /мл
VN1	2013	Чернівецька	Райдужна форель	1-2	3,6x10 ⁴
VN11	2021	Харківська	Райдужна форель	4-5	7,2x10 ⁴
VN18	2021	Волинська	Райдужна форель	2-4	2,8x10 ³
VN20	2021	Закарпатська	Райдужна форель	2-3	2,4x10 ⁶
VN29	2022	Рівненська	Райдужна форель	4-5	1,1x10 ³
VN30	2022	Волинська	Палія	2-4	1,58x10 ⁶
VN32	2022	Волинська	Райдужна форель	100	1,0x10 ⁷
VN38	2022	Львівська	Райдужна форель	1-2	2,1x10 ⁶

До високовірулентних ізолятів вірусу, які спричиняли високу смертність мальків форелі і палії та мали високий титр в культурі клітин, можна віднести ізоляти VN20, VN30, VN32 та VN38, виділені у Волинській, Закарпатській та Львівській областях. Серед виявлених високовірулентних ізолятів вірусу були ті, що ймовірно завезли разом з імпортованою

заплідненою ікрою на господарство, так і ті, що могли потрапити через систему водопостачання або внутрішню торгівлю рибопосадковим матеріалом. Підвищення вірулентності вірусу може також відбуватися за рахунок мутацій, наприклад реасортації сегментів РНК, на господарствах з інтенсивним виробництвом та обігом рибопосадкового матеріалу [8].

Слід зазначити, що ізолят VN32 мав найвищий інфекційний титр в культурі клітин RTG-2. Даний ізолят було виділено від райдужної форелі, середня вага якої становила 100 г. З огляду на помірну смертність (40 %) і наважку інфікованої риби на господарстві, можна стверджувати, що у ізолята змінилися властивості у бік підвищення його патогенності. Також слід зауважити, що вірус IPNV (VN30) було діагностовано у палії, об'єкті аквакультури, який зараз стає все більш популярним, в першу чергу через стійкість до вірусних захворювань. Смертність палії коливалась в межах 15-25 %, а от титр вірусу в культурі клітин був високим і становив $1,58 \times 10^6$ TCID₅₀/мл. Випадок з палією також може свідчити про зміну вірулентних властивостей вірусу, до того ж це один з перших випадків діагностики IPNV у палії в Україні.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В Україні нині циркулює щонайменше один штам вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, це штам Spajapur (Sp) (серогрупа A2). У Європі окрім широко поширеного штаму Sp, циркулюють також штами West Vuxton (WB) та Abild (Ab), які теоретично можуть потрапити на спеціалізовані господарства України разом з рибопосадковим матеріалом. Очевидно, що різний рівень інфекційного титру ізолятів вірусу в культурі клітин та смертність, яку вони спричиняють на господарствах, свідчать про біорізноманіття ізолятів і штамів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в Україні. Скільки нововиявлених ізолятів вірусу належать до того чи іншого штаму треба ще визначити. Для цього буде проведено дослідження нуклеотидної послідовності гена, що кодує капсидний білок VP2, на основі якого також буде можливість визначити вірулентність за змінами в амінокислотах. Генетична інформація щодо нових ізолятів вірусу дозволить проводити прогнозування ризиків нових спалахів інфекційного панкреатичного некрозу на форелевих господарствах, що є важливим у контексті продовольчої безпеки країни.

Список літератури

1. Бучацький Л. П., Рудь Ю. П., Пастиря А. С. Бірнаввіруси : монографія. Київ : ДІАБ, 2022. 211с.
2. Matvienko N. M., Rud Yu. P., Buchatskiy L. P. Replication of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in different cell lines and in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Arch. Polish. Fish.* 2014. Vol. 22. P. 127–133. DOI: <https://doi.org/10.2478/aopf-2014-0012>.
3. Rud Y. P., Maistrenko M. I., Buchatskiy L. P. (2015). Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) in West Ukraine. *Virologia Sinica*. 2015. Vol. 30, No 3. P. 231–233. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3513-z>.
4. Rud Yu. et al. Experimental infection of brown trout (*Salmo trutta*), zebrafish (*Danio rerio*), and swan mussel (*Anodonta cygnea*) with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Agricultural Science and Practice*. 2020. Vol. 7, No 3. P. 31–39. DOI: <https://doi.org/10.15407/agrisp7.03.031>.
5. Lei C. et al. On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. *Virologia Sinica*. 2021. Vol. 36, No 1. P. 141–144. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9020094>.
6. Рудь Ю. П., Майстренко М. І. Штам вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» (IPNV «Карпати»), для отримання вакцини проти інфекційного некрозу підшлункової залози лососевих : патент України на корисну модель №88693; заявл.06.11.2013; опубл. 25.03.2014, Бюл. № 6.
7. Dorazo C. P. The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: what is known and what should be known. *Pathogens*. 2020. Vol. 9, No 2. P. 94. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9020094>.
8. Tapia D. et al. Infectious pancreatic necrosis virus in salmonids: Molecular epidemiology and host response to infection. *Rev Aquac.* 2022. Vol. 14. P. 751–769. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12623>.

STUDY OF *IN VITRO* REPRODUCTION OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV)

Rud Yu. P.^{1,2}, Zoloto O. V.¹, Hrytsyniak I. I.¹, Buchatskiy L. P.^{1,2}

¹ Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

The aim of the work was to study the *in vitro* reproduction of new emergent isolates of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in purpose to determine virulence properties. The new strains of IPNV isolated from trout farms in Ukraine during 2021-2022 were investigated. For this purpose, RTG-2 cell line was used, on which the infectious titer of the virus and the manifestation of CPE signs were determined. The infectious titer of selected isolates in RTG-2 cell line ranged from 1.1×10^3 to 1.0×10^7 TCID₅₀/ml. Isolated IPNV strains caused low ($\leq 25\%$), moderate ($\leq 50\%$) and high ($\geq 70\%$) mortality rates in trout fry. Based on biological properties and indicators of infectious titer, the investigated isolates VN11, VN18 and VN29 were determined as with low

virulence, and isolates VN20, VN30, VN32 and VN39 were classified as highly virulent. Among the highly virulent isolates, VN32 had the highest titer of 1.0×10^7 TCID₅₀/ml and caused mortality in rainbow trout with an average weight of 100 g. The IPNV strain isolated from the brook trout had an infectious titer of 1.58×10^6 TCID₅₀/ml and caused fry mortality ranged from 15 to 25 %. The number of detected isolates and their cultural properties testify to the biodiversity of strains for the Infectious pancreatic necrosis virus in Ukraine. How many newly discovered isolates of the IPNV belong to one or another genotype remains to be determined. For this, a study of the nucleotide sequence of the gene encoding the capsid protein VP2 will be conducted, on the basis of which it will also be possible to determine virulence by changes in amino acids sequences

Keywords: cell culture, infectious titer, Salmonidae

6. ІМУНОЛОГІЯ ТА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ

УДК 619:616.993.19:612.1:636.4.082.35

DOI 10.36016/VM-2023-109-17

МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В КРОВІ ПОРОСЯТ, ХВОРИХ НА ЕЙМЕРІОЗ І БАЛАНТИДІОЗ

Богач О. М., Коваленко Л. В., Палій А. П.

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна*

Богач М. В.

*Одеська дослідна станція Національного наукового центру «Інститут експериментальної і
клінічної ветеринарної медицини», Одеса, Україна, e-mail: bogach_nv@ukr.net*

Метою роботи було вивчити зміни в морфологічних та біохімічних показниках крові поросят 50-добового віку спонтанно інвазованих еймеріями і балантидіями. Сформовано дослідну групу тварин спонтанно інвазованих еймеріями і балантидіями і контрольну (n=5) — не інвазовані. Для дослідження фекалій на наявність еймерій застосовували метод Макмастера в модифікації Raynaud, балантидій — нативного мазка. Визначали зміни морфологічних і біохімічних показників крові за змішаного перебігу еймеріозу і балантидіозу. У крові інвазованих еймеріями і балантидіями поросят встановили зменшення вмісту гемоглобіну на 10,4 %, кількості еритроцитів на 17,0 %. Одночасно зросла кількість лейкоцитів на 22 %. У лейкограмі збільшувався відсотковий вміст еозинофілів на 40,0 %, паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів на 26,3 % і 2,1 % відповідно. Кількість моноцитів збільшилась на 35,3 %, що вказує на появу в організмі тварин вогнища запалення. Збільшення лейкоцитарного індексу інтоксикації на 11,1 % свідчить про тяжкість запального процесу. У інвазованих поросят реєстрували зменшення вмісту загального білку на 6,5 % за рахунок суттєвого зменшення вмісту альбумінів на 28,3 %. Підвищення концентрації ЦІК на 23,5 %, активності ферментів АлАТ і АсАТ на 75,4 % і 35,9 % відповідно підтверджує розвиток патологічного процесу та виникнення супутніх структурно-функціональних змін у внутрішніх органах поросят. За змішаного перебігу еймеріозу і балантидіозу у поросят 50-добового віку спостерігається лейкоцитоз і еозинофілія, збільшення числа паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, лімфопенія та моноцитоз. Зміни показників вказують на загострення запального процесу в організмі інвазованих поросят та токсичний вплив в місцях паразитування — тонкий і товстий відділи кишечника. У біохімічному складі сироватки крові поросят із розвитком хвороби наявне зменшення вмісту загального білку та альбумінів, що пов'язане із порушенням білоксинтезуючої функції печінки, а підвищення β-глобулінів свідчить про пригнічення імунної відповіді на інвазію. Підвищення активності ферментів АлАТ і АсАТ вказує на розвиток дистрофічних процесів в печінці, яка відіграє першочергову роль у нейтралізації токсинів, що утворюються в організмі тварин. Збільшення концентрації ЦІК вказує на поступовий розвиток імунної відповіді на перебіг хвороби

Ключові слова: змішаний перебіг, імунна відповідь

Аналіз сучасного стану свинарства свідчить про те, що важливими перешкодами на шляху розвитку цієї галузі є інвазійні захворювання. Серед них значну роль відіграють кишкові протозоози, зокрема еймеріоз та балантидіоз — захворювання, які широко поширені як на території України, так і за її межами [1–3].

Внутрішні паразити дуже поширені у свиней, тому кожному виробнику важливо знати про їх присутність і пов'язані з ними втрати, які вони можуть спричинити. На величину втрат впливає декілька факторів, найважливішими з яких є вид ендопаразитів, утримання, годівля, географічне розташування та порода тварин [4, 5].

Шлунково-кишкові паразити є основною причиною зниження продуктивності свиней. Вони впливають на продуктивність, безпосередньо конкуруючи за поживні речовини, необхідні для оптимального росту та розмноження. Крім того, ці паразити можуть викликати пошкодження тканин (ураження), що призводить до вибракування органів під час перевірки м'яса, поганої конверсії корму, діареї та зневоднення або навіть смерті тварин [6].

Еймеріози свиней завдають значних економічних збитків, які зумовлені зниженням продуктивності тварин, відставанням у рості та розвитку, зниженням резистентності, високим рівнем летальності в молодняку. Відсоток летальності значно зростає за одночасного зараження тварин еймеріями, бактеріями та гельмінтами. *Eimeria* spp. у свиней розглядається деякими авторами як індикатор гігієнічного статусу ферми — що нижчий рівень гігієни, то частіше зустрічається *Eimeria* [7, 8].

Еймеріоз є однією з найчастіших причин діареї у поросят. Результати міжнародних, в основному західноєвропейських досліджень, показали, що еймеріоз присутній на 75–76 % свиноферм, а 40–100 % поросят на фермі можуть бути інфіковані незалежно від гігієнічних умов [9].

Балантидіоз, що викликається *Balantidium coli* (син. *Neobalantidium coli* або *B. coli*), є забутою паразитарною інфекцією зооозного значення, що уражає різних хазяїв, включаючи домашніх свиней, які є основним резервуаром [10].

Основними епідеміологічними факторами передачі паразита є тісний контакт між тваринами, відсутність базової інфраструктури санітарії (водопостачання, водовідведення) і гігієни. Інвазія *Balantidium coli* може бути безсимптомною і симптоматичною, яка може бути хронічною (з періодичною діареєю) або гострою (дизентерійна форма, яка може бути небезпечною для життя) [11].

Ендопаразитизм свиней свідчить про гетерогенність залучених видів паразитів та їх патогенності [12, 13]. Крім того, інвазовані свині, як правило, більш сприйнятливі до інфекційних і неінфекційних захворювань, які підривають стан їхнього здоров'я та добробуту [14]. Придбання вільних від паразитів свиней у поєднанні з належною гігієною може мінімізувати початковий інфекційний тиск і подальше зараження стада до мінімуму [15].

За еймеріозу свиней, у відповідь на проникнення паразитів в епітеліальні клітини кишкового каналу, організм реагує змінами крові. При цьому реєструється еозінофілія, лейкоцитоз із зрушенням нейтрофільного ядра вліво, знижується кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну [16]. У сироватці крові за еймеріозу свиней відмічається зниження вмісту загального білка за рахунок альбумінів та збільшення вмісту глобулінів, переважно, за рахунок гамма-глобулінів [17].

Метаболіти балантидій, надходять у ворітну вену та печінку. У результаті цього у клітинах печінки розвивається жирова інфільтрація та зерниста дистрофія [18]. Порушення функції кровотворних органів характеризується еритропенією. Це пов'язано з пригніченням кісткового гемопоєзу та розпадом еритроцитів під впливом токсинів. У крові знижується рівень гемоглобіну, число еритроцитів і збільшується кількість лейкоцитів, бета- та гамма-глобулінів. Відзначається зменшення рівня резервної лужності, цукру, неорганічного фосфору, кальцію, загального білка за рахунок альбумінової фракції [19, 20].

На сьогоднішній день окремі питання патогенезу змішаного перебігу еймеріозу і балантидіозу свиней висвітлено недостатньо.

Мета роботи: вивчити зміни в морфологічних та біохімічних показниках крові поросят 50-добового віку спонтанно інвазованих еймеріями і балантидіями.

Матеріали та методи. Діагноз на еймеріоз та балантидіоз у свиней ґрунтується на анамнестичних, епізоотологічних даних, клінічних ознаках, патологоанатомічних змінах та результатах капрологічних досліджень свіжого матеріалу.

Зразки фекалій поросят 50-добового віку збирали безпосередньо із прямої кишки або з підлоги відразу після дефекації. Були взяті проби від 3 до 5 поросят у посліді та об'єднані. Фекалії було проаналізовано за допомогою методу Макмастера. Зразки досліджували при 100-кратному збільшенні. Зразки неспорувльованих ооцист змішували з 2,5 % розчином дихромату калію та зберігали в чашках Петрі при 25 °С, щоб викликати споруляцію.

Для дослідження фекалій на наявність балантидій застосовували метод нативного мазка: 3-4 краплі ізотонічного розчину наносили на предметне скло та підігрівали до 37,5 °С. Потім за

допомогою сірника або дерев'яної палички брали пробу свіжих фекалій і розтирали на склі в ізотонічному розчині. Покривали покривним склом та мікроскопували. Підраховували балантидій у 20 полях зору мікроскопа, що дозволяло судити про інтенсивність інвазії. Встановлено, що наявність у полі зору до 2 балантидій говорить про слабку інвазію, 5–8 — початок захворювання.

Кров для морфологічних і біохімічних досліджень відбирали з вушної вени. Було сформовано дослідну групу тварин спонтанно інвазованих еймеріями і балантидіями (n=5) і контрольну (n=5) — не інвазовані. Кров для досліджень відбирали вранці до годівлі із дотримання правил асептики та антисептики у скляні пробірки ємністю 3 мл. Одразу після відбору проби крові стабілізувалися антикоагулянтом — гепарином (500 ОД/10 мл).

У крові визначали: кількість еритроцитів і лейкоцитів підрахунком у лічильній камері сітки Горяєва; диференційний підрахунок лейкоцитів шляхом мікроскопії мазків крові, фарбованих за Романовським-Гімза; концентрацію гемоглобіну — гемоглобінціанідним методом (з ацетонціангідрином); вміст загального білку за біуретовою реакцією, а фракційний склад білків — шляхом електрофорезу на пластинках із поліакриламідного гелю і фотометрії на апараті розшифрування фореграм АРФ-1. Спектрофотометричним методом у сироватці крові досліджували активність аспартат-амінотрансферази (АсАТ) та аланін-амінотрансферази (АлАТ) за методом Райтмана й Френкеля в модифікації К. Г. Калетанакі.

Для визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) готували дві пробірки. В контрольну вносили 0,3 мл боратного буферу і 0,15 мл досліджуваної сироватки крові, ретельно перемішували вміст пробірки і переносили 0,22 мл у дослідну пробірку з додаванням 2 мл поліетиленгліколю. Ретельно перемішували, інкубували протягом 1 години за кімнатної температури та здійснювали фотометрію. Вираховували різницю показників оптичної густини і результат перемножували на 1000 та одержували вміст ЦІК у 100 мл сироватки крові [21].

Результати досліджень. У крові інвазованих еймеріями і балантидіями поросят встановили вірогідне (p<0,001) зменшення вмісту гемоглобіну на 10,4 % (91,9±0,5 г/л), порівняно з показниками клінічно здорових тварин контрольної групи (102,6±0,2 г/л) (табл. 1).

Таблиця 1 — Морфологічні показники крові поросят 50-добового віку за змішаного перебігу еймеріозу і балантидіозу (n=5, M±m)

Показники	Групи тварин		% до контролю
	дослідна	контрольна	
Гемоглобін, г/л	91,9±0,5***	102,6±0,2	-10,4
Еритроцити, Т/л	3,9±0,2**	4,7±0,1	-17,0
Лейкоцити, Г/л	17,2±0,5***	14,1±0,2	+22,0
Лейкограма, %:			
Базофіли	—	—	—
Еозинофіли	0,7±0,1*	0,5±0,1	+40,0
Нейтрофіли:			
Юні	—	—	—
Паличкоядерні	2,4±0,8*	1,9±0,5	+26,3
Сегментоядерні	33,3±1,0*	32,6±2,2	+2,1
Лімфоцити	54,4±1,5*	58,2±2,9	-5,3
Моноцити	9,2±0,1*	6,8±0,3	+35,3
ЛІІІ	1,20	1,08	+11,1

Примітки: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001 — порівняно до контролю.

Реєстрували зменшення кількості еритроцитів на 17,0 % (p<0,01) з 4,7±0,1 Т/л у контрольній групі проти 3,9±0,2 Т/л у інвазованих поросят. Одночасно у крові достовірно (p<0,001) зростала кількість лейкоцитів на 22 % (17,2±0,5 Г/л) проти 14,1±0,2 Г/л у поросят контрольної групи.

У лейкограмі збільшувався відсотковий вміст еозинофілів на 40,0 % з 0,5±0,1 % у контрольній групі проти 0,7±0,1 % (p<0,05) у інвазованих поросят. Також реєстрували вірогідне

($p < 0,05$) збільшення паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів на 26,3 % і 2,1 % відповідно.

Кількість лімфоцитів у дослідній групі поросят вірогідно ($p < 0,05$) зменшилась на 5,3 % і становила $54,4 \pm 1,5$ % проти $58,2 \pm 2,9$ % у клінічно здорових тварин. Кількість моноцитів вірогідно ($p < 0,05$) збільшилась на 35,3 % ($9,2 \pm 0,1$ %), порівняно з показниками у поросят з контрольної групи $6,8 \pm 0,3$ %, що вказує на появу в організмі тварин вогнища запалення.

Лейкоцитарний індекс інтоксикації у клінічно здорових поросят з контрольної групи становив 1,08 ум. од., а у поросят з дослідної групи, які інвазовані еймеріями і балантидіями був на рівні — 1,20 ум. од., що на 11,1 % більше. Це свідчить про тяжкість запального процесу в організмі тварини.

За результатами проведених досліджень встановлено, що за змішаного перебігу еймеріозу і балантидіозу поросят 50-добового віку відбуваються певні зміни біохімічних показників сироватки крові (табл. 2).

Таблиця 2 — Біохімічні та імунологічні показники сироватки крові поросят 50-добового віку за змішаного перебігу еймеріозу і балантидіозу ($n=5$, $M \pm m$)

Показники	Групи тварин		% до контролю
	дослідна	контрольна	
Загальний білок, г/л	$66,5 \pm 0,5^{**}$	$71,1 \pm 1,2$	-6,5
Альбуміни, г/л	$26,1 \pm 0,2^{***}$	$36,4 \pm 0,4$	-28,3
Глобуліни, г/л	$40,4 \pm 1,1^{***}$	$34,7 \pm 0,9$	+16,4
α -глобуліни, г/л	$11,9 \pm 0,2^{**}$	$10,2 \pm 0,5$	+16,7
β -глобуліни, г/л	$14,6 \pm 0,6^{**}$	$12,1 \pm 0,4$	+20,7
γ -глобуліни, г/л	$13,9 \pm 0,2^{***}$	$12,4 \pm 0,2$	+12,1
A/G коефіцієнт	0,64	1,04	-38,5
АлАТ, Од/л	$92,6 \pm 3,4^{***}$	$52,8 \pm 2,6$	+75,4
АсАТ, Од/л	$89,2 \pm 2,0^{***}$	$67,1 \pm 2,5$	+32,9
ЦІК, мг/см ³	$0,21 \pm 0,01^*$	$0,17 \pm 0,02$	+23,5

Примітки: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ — порівняно до контролю.

У інвазованих поросят реєстрували вірогідне ($p < 0,01$) зменшення вмісту загального білку на 6,5 % до $66,5 \pm 0,5$ г/л проти $71,1 \pm 1,2$ г/л у клінічно здорових поросят, що відбулося за рахунок суттєвого зменшення вмісту альбумінів на 28,3 % ($26,1 \pm 0,2$ г/л, ($p < 0,001$)), порівняно з показниками у поросят з контрольної групи — $36,4 \pm 0,4$ г/л.

Водночас у дослідній групі поросят встановили вірогідне підвищення рівнів β -, та γ -глобулінів, що пов'язане з активізацією протистояння організму тварин у відповідь на розвиток протозоїв в певний період перебігу хвороби.

Вміст β -глобулінів у неінвазованих поросят становив $12,1 \pm 0,4$ г/л, а в поросят, уражених еймеріями і балантидіями — $14,6 \pm 0,6$ г/см³, що на 20,7 % перевищує контрольний показник ($p < 0,05$).

В дослідній групі поросят встановлено суттєве ($p < 0,001$) збільшення γ -глобулінів на 12,1 % ($13,9 \pm 0,2$ г/л), порівняно з показниками контрольної групи ($12,4 \pm 0,2$ г/л).

Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт у дослідній групі поросят склав 1,04, тоді як у інвазованих поросят він був лише 0,64, що на 38,5 % менше. Зменшення коефіцієнту вказує на низький рівень альбуміну в сироватці крові інвазованих поросят.

Ферменти АлАТ та АсАТ локалізуються у більшості органів та систем. При пошкодженні тканини активність даних ферментів у сироватці крові підвищується. У інвазованих поросят реєстрували вірогідне ($p < 0,001$) підвищення активності ферментів АлАТ і АсАТ на 75,4 % і 35,9 % відповідно, з $52,8 \pm 2,6$ Од/л і $67,1 \pm 2,5$ Од/л у контролі до $92,6 \pm 3,4$ Од/л і $89,2 \pm 2,0$ Од/л у дослідній групі. Зазначені зміни активності ферментів підтверджують розвиток патологічного процесу та виникнення супутніх структурно-функціональних змін у внутрішніх органах поросят.

У інвазованих поросят реєстрували підвищення концентрації ЦІК на 23,5 % до $0,21 \pm 0,01$ мг/см³ ($p < 0,05$), проти $0,17 \pm 0,02$ мг/см³ у контрольній групі тварин.

Висновки: 1. За змішаного перебігу еймеріозу і балантидіозу у поросят 50-добового віку у морфологічному складі крові спостерігається підвищення лейкоцитів і еозинофілія, збільшення

числа паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, лімфопенія та моноцитоз. Зміни показників вказують на загострення запального процесу в організмі інвазованих поросят та токсичний вплив в місцях паразитування — тонкий і товстий відділи кишечника.

2. У біохімічному складі сироватки крові поросят із розвитком хвороби наявне зменшення вмісту загального білку та альбумінів, що пов'язане із порушенням білоксинтезуючої функції печінки, а підвищення β -глобулінів свідчить про пригнічення імунної відповіді на інвазію. Підвищення активності ферментів АЛАТ і АсАТ вказує на розвиток дистрофічних процесів в печінці, яка відіграє першочергову роль у нейтралізації токсинів, що утворюються в організмі тварин. Збільшення концентрації ЦІК вказує на поступовий розвиток імунної відповіді на перебіг хвороби.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні морфологічних і біохімічних показників крові свиней старших вікових груп за хронічного перебігу балантидіозу.

Список літератури

1. Yevstafieva V. O., Kovalenko V. O. Associative Clinical Course of Coccidiosis in the Mixed Invasions of the Digestive Tract of Pigs. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2019. Vol. 7, iss. 1. P. 21–24. DOI: <https://doi.org/10.32819/2019.71004>.
2. Lindsay D. S., Neiger R., Hildreth M. Porcine enteritis associated with *Eimeria spinosa* Henry, 1931 infection. *Journal of Parasitology*. 2002. Vol. 88, No 6. P. 1262–1263. DOI: [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1262:peawes\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1262:peawes]2.0.co;2).
3. Schuster F. L., Ramirez-Avila L. Current world status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2008. Vol. 21, iss. 4. P. 626–638. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00021-08>.
4. Roepstorff A. et al. Helminth parasites in pigs: New challenges in pig production and current research highlights. *Veterinary Parasitology*. 2011. Vol. 180, iss. 1-2. P. 72–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.029>.
5. Zakir Abadura S. et al. Transmission dynamics of cryptosporidium in calves and children from southwestern Ethiopia. *Journal of Veterinary Physiology and Pathology*. 2022. Vol. 1, iss. 1. P. 26–36. URL: <https://jvpp.rovedar.com/index.php/JVPP/article/view/4>.
6. Kochanowski M. et al. Occurrence of intestinal parasites in pigs in Poland — the influence of factors related to the production system. *Journal of Veterinary Research*. 2017. Vol. 61, iss. 4. P. 459–466. DOI: <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0053>.
7. Karamon J., Ziomko I., Cencek T. Prevalence of *Isospora suis* and *Eimeria* spp. in suckling piglets and sows in Poland. *Veterinary Parasitology*. 2007. Vol. 147, iss. 1–2. P. 171–175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.029>.
8. Ózsvári L. Production impact of parasitisms and coccidiosis in swine. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. 2018. Vol. 7, iss. 5. P. 217–222. DOI: <https://doi.org/10.15406/jdvar.2018.07.00214>.
9. Kipper M. et al. Meta-analysis of the effects of endoparasites on pig performance. *Veterinary Parasitology*. 2011. Vol. 181, iss. 2-4. P. 316–320. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.029>.
10. Paul T. R. et al. Balantidiasis, a zoonotic protozoal infection of cattle and domestic pigs. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 2019. Vol. 17, iss. 1. P. 31–37. DOI: <https://doi.org/10.33109/bjvmij19fam1>.
11. Ponce-Gordo F., García-Rodríguez J. J. *Balantioides coli*. *Research in Veterinary Science*. 2021. Vol. 135. P. 424–431. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.028>.
12. Roepstorff A. et al. Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: prevalence and geographical distribution. *Veterinary Parasitology*. 1998. Vol. 76, iss. 4. P. 305–319. DOI: [https://www.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00223-9](https://www.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00223-9).
13. Schubnell F. et al. Occurrence, clinical involvement and zoonotic potential of endoparasites infecting Swiss pigs. *Parasitology International*. 2016. Vol. 65, iss. 6. P. 618–624. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.parint.2016.09.005>.
14. Brewer M. T., Greve J. H. Internal parasites: Helminths. In *Diseases of Swine*, 11th ed.; Zimmerman J. J. et al. Eds. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2019. P. 1028–1040. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch67>.
15. Joachim A. et al. Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. *Veterinary Parasitology*. 2001. Vol. 96, iss. 2. P. 135–146. DOI: [https://www.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00431-3](https://www.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00431-3).
16. Литаров А. В., Ладогубец Е. В. Влияние эймериозной инвазии на гематологические показатели крови у поросят. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини : зб. наук. пр.* 2009. Вип. 20, Ч. 2, Т. 2. С. 150–153.
17. Данко М. М. Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові поросят за експериментального ізоспорозу. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького*. 2011. Т. 13, № 2(1). С. 67–72. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2011_13_2\(1\)_15](http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2011_13_2(1)_15).
18. Kravchenko N. A. et al. The peculiarities of *Balantidia* parasitism in Humans and Anamals (literature review). Educational Establishment «Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University», Vitebsk. *Vestnik VGMU*. 2015. Vol. 14, iss. 6. P. 15–24. URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/53876516.pdf>.
19. Garcia L. S. *Balantidium coli*. Emerging protozoan pathogens. ed. N. A. Khan. New York : Taylor & Francis, 2008. P. 353–366.

20. Ferry T. et al. Severe peritonitis due to *Balantidium coli* acquired in France. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004. Vol. 23. P. 393–395. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1126-4>.
21. Влізла В. В. та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / за ред. В. В. Влізла. Львів: Сполом: 2012. 764 с. URL: <https://www.inenbiol.com/index.php/63-diyalnist/publikacii/knyhy/349-laboratorni-metody-doslidzhen-u-biologii-tvarynnystvi-ta-veterynarnii-medytyni>

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN THE BLOOD OF PIGLETS SUFFERING FROM EIMERIOSIS AND BALANTIDIOSIS

Bohach O. M., Kovalenko L. V., Paliy A. P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Bogach M. V.

Odesa Research Station of the National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Odessa, Ukraine

The purpose of the work was to study changes in the morphological and biochemical parameters of the blood of 50-day-old piglets spontaneously infested with *Eimeria* and *Balantidia*. An experimental group of animals spontaneously infested with *Eimeria* and *Balantidia* and a control group ($n=5$) not infested were formed. To examine feces for the presence of *Eimeria*, the McMaster method in Raynaud's modification, *Balantidia* - native smear was used. Changes in morphological and biochemical indicators of blood during the mixed course of eimeriosis and balantidiosis were determined. In the blood of piglets infected with *Eimeria* and *Balantidia*, a decrease in the hemoglobin content by 10.4% and the number of erythrocytes by 17.0% was established. At the same time, the number of leukocytes increased by 22%. In the leukogram, the percentage of eosinophils increased by 40.0%, rod- and segmented-nuclear neutrophils by 26.3% and 2.1%, respectively. The number of monocytes increased by 35.3%, which indicates the appearance of foci of inflammation in the animal's body. An increase in the leukocyte index of intoxication by 11.1% indicates the severity of the inflammatory process. In infected piglets, a decrease in total protein content by 6.5% due to a significant decrease in albumin content by 28.3% was recorded. An increase in the concentration of CIC by 23.5%, the activity of the enzymes AIAT and AsAT by 75.4% and 35.9%, respectively, confirms the development of the pathological process and the occurrence of accompanying structural and functional changes in the internal organs of piglets. During the mixed course of eimeriosis and balantidiosis in 50-day-old piglets, leukocytosis and eosinophilia, an increase in the number of rod-shaped and segmented neutrophils, lymphopenia and monocytosis are observed. Changes in indicators indicate an exacerbation of the inflammatory process in the body of infected piglets and a toxic effect in the places of parasitism - the small and large intestines. In the biochemical composition of the blood serum of piglets with the development of the disease, there is a decrease in the content of total protein and albumins, which is associated with a violation of the biloxintizing function of the liver, and an increase in β -globulins indicates a suppression of the immune response to invasion. An increase in the activity of AIAT and AsAT enzymes indicates the development of dystrophic processes in the liver, which plays a primary role in the neutralization of toxins produced in the body of animals. An increase in the concentration of CIC indicates the gradual development of the immune response to the course of the disease.

Keywords: mixed course, immune response

7. ПАРАЗИТОЛОГІЯ

УДК 619:616.993/.995:636.8(477.54)

DOI 10.36016/VM-2023-109-18

ПОШИРЕННЯ ЕКТО- ТА ЕНДОПАРАЗИТІВ У КОТІВ ХАРКІВСЬКОГО РЕГІОНУ

Кіптенко А. В., Дунаєв Ю. К.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна

Богач М. В., Богач Д. М.

Одеська дослідна станція Національного наукового центру «Інститут експериментальної і
клінічної ветеринарної медицини», Одеса, Україна, e-mail: bogach_nv@ukr.net

Метою роботи було вперше визначити поширення різних екто- та ендopаразитів шлунково-кишкового тракту, що заражають кішок міської та сільської популяції Харківського регіону. Дослідження на екто- та ендopаразити були проведені у 177 котів міської популяції, з яких 112 котів були домашні і 65 тварин безпритульних та 98 котів сільської популяції Харківського регіону в період з березня по липень 2023 року. Були зібрані дані про місцезнаходження, вік та стать тварин і додатково (у разі приватних тварин) про протипаразитарну обробку. У 275 обстежених котів було виявлено 5 різних екто- і ендopаразитів з поширеністю від 7,1 % до 32,3 %. *Stenocephalides felis* реєстрували у 7,1 % домашніх, 29,2 % безпритульних котів міської популяції та 18,4 % котів сільської популяції. Інвазованість вушними кліщами *Otodectes cynotis* була найвищою у безпритульних котів (32,3 %), тоді як у котів з сільської популяції показник інвазованості був меншим на 9,9 %, а у домашніх тварин з міської популяції — на 14,4 %. У безпритульних котів міської популяції найбільше реєстрували яйця гельмінтів *Toxascaris leonina* (29,2 %) і *Uncinaria stenocephala* (18,5 %). Екстенсивність *Toxascaris leonina* серед домашніх котів міської і сільської популяції була майже на однаковому рівні — 18,8 % та 19,4 % відповідно. *Taenia taeniaeformis* реєстрували у безпритульних котів з міської (3,1 %) та сільської популяції (6,1 %). Яйця тенід у домашніх кішок міської популяції не були виявлені. Загальна інвазованість енто- і ектопаразитами домашніх котів міської популяції склала 52,7 %, котів сільської популяції — 77,6 %, тоді як інвазованість безпритульних котів становила 100 %

Ключові слова: блохи, кліщі, гельмінти

Останнім часом на території міст і селищ України значно зростає популяція безпритульних собак та котів, що є надзвичайно небезпечним для людини. Безпритульні собаки і коти, які не піддаються обстеженню і лікуванню, є джерелом різних збудників кишкових гельмінтів: цестод, насамперед дипілідій, імагінальних тенід (теній, ехінококів); нематод (токсокар, анкілостоматид, трихурисів) [1].

Хвороби свійських тварин, пов'язані з блохами, становлять понад 50 % дерматологічних випадків. Більше того, *Stenocephalides felis felis* вже протягом двох десятиліть проявляє стійкість до звичайних інсектицидів. Тому правильна ідентифікація видів необхідна для заходів контролю та генетичних висновків [2].

Stenocephalides felis felis є одним з найбільш важливих ектопаразитів собак і кішок у всьому світі через його географічне поширення, подвійну паразитологічну дію як інвазійного агента та переносника хвороб, економічних втрат та набутої стійкості до звичайних інсектицидів. *S. felis felis* краще пристосовується, ніж *S. canis*, оскільки заражає більше видів-хазяїв і тому приживається на більших значних територіях [3].

Коти можуть бути заражені декількома видами ектопаразитів, зокрема *Stenocephalides felis* і *Otodectes cynotis*, які викликають дерматит і інвазію вух відповідно [4]. Вушний кліщ *O. cynotis* є найчастішим етіологічним агентом зовнішнього отиту у кішок та собак [5, 6].

Ендopаразитарні інфекції часто зустрічаються у кішок. Багато хто з цих паразитів викликають зоонози, а кішки можуть бути джерелом забруднення навколишнього середовища,

яке може призвести до поширення інфекції на сприйнятливих тварин і, в деяких випадках, на людей. Загальна поширеність ендopазитів у північній Італії становила 50,4 %, при цьому було виявлено 11 різних паразитів. Паразити із зоонозним потенціалом були виявлені у 49,6 % кішок [7].

У Єгипті у кішок було виявлено декілька паразитів, *Toxocara cati* (30,0 %), *Toxascaris leonina* (22,4 %), анкілостоми (8,4 %), теніїди (4,2 %), *Strongyloides* spp. (2,1 %), *Physaloptera* spp. (2,1 %), *Alaria* spp. (1,4 %) і *Dipylidium caninum* (0,7 %) [8].

Taenia taeniaeformis — глобально поширена цестода, яка використовує котятчих як остаточних і гризунів як проміжних хазяїв [9]. Стрічковий гельмінт *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) уражає переважно кішок і інших тварин родини котятчих і має значне поширення. Вид був зареєстрований у більш ніж 45 родів ссавців, або як метацестоци, або як дорослі особини [10]. При дослідженні кішок у Польщі, у дев'яти (13,4 %) реєстрували наявність *T. taeniaeformis* та у однієї кішки *T. hydatigena* (1,5 %). У однієї з кішок *E. multilocularis* та *T. taeniaeformis* були виявлені разом [11].

Мета цього дослідження полягала в тому, щоб вперше визначити поширення різних екто- та ендopазитів шлунково-кишкового тракту, що заражають кішок міської та сільської популяції Харківського регіону.

Матеріали і методи. Дослідження на екто- та ендopазити були проведені у 177 котів міської популяції, з яких 112 котів були домашні і 65 тварин безпритульних, та 98 котів сільської популяції Харківського регіону в період з березня по липень 2023 року. Були зібрані дані про місцезнаходження, вік та стать тварин і додатково (у разі приватних тварин) про протипаразитарну обробку.

Популяцію бліх видів *Ctenocephalides felis* на тілі кішок оцінювали за їх кількістю на п'яти анатомічних ділянках: 1 — серединної дорсальної лінії (*linea dorsalis medianum*), 2 — сідничного горба (*tuberis chiadicum*), 3 — лівої бічної частини (*pars lateralis sinister*), 4 — правої бічної частини (*pars lateralis dexter*), 5 — пахвинної ділянки (*regioin guinalis*). Виділення бліх з тіла тварин проводили шляхом розчісування їх пластиком дрібнозубим спеціальним гребінцем на кожній анатомічній ділянці. Зібраних комах фіксували у 70 % етилового спирті. Ідентифікацію видів виділених паразитичних комах встановлювали за допомогою стереомікроскопа (5–20 × об'єктивів, ВХ41, Olympus, Австралія) за морфологічними таксономічними ознаками згідно з визначником [12].

Діагноз інвазії *Otodectes cynotis* підтверджували візуалізацією живих кліщів за допомогою отоскопічного дослідження або мікроскопічного дослідження зразків мазків із слухових проходів. Для виявлення *Otodectes cynotis* здійснювали клінічний огляд тварин, який передбачав визначення загального стану шерстного покриву і шкіри, а також вушної раковини та зовнішнього слухового проходу за допомогою отоскопії та пальпації. Отологічне обстеження дозволяло виявити такі ознаки отиту, як вушні виділення, неприємний запах, еритему, набряк, лущення, екскоріації, алопецію, виразки вушної раковини та шкіри біля входу до зовнішнього слухового проходу. При огляді враховували зовнішній вигляд вушної раковини, наявність та локалізацію або відсутність виділень, їх колір, запах, кількість. Також відмічали наявність свербежу або нахилу голови. Пальпуючи вушний канал, звертали увагу на наявність больового рефлексу та проліферативних змін — фіброзу та кальцифікації [13].

Зразки фекалій зберігали при 5 °С та досліджували протягом 48 годин. Кожен зразок спочатку досліджували макроскопічно на наявність дорослих паразитів або проглоттид стрічкових черв'яків. Прямі вологі мазки фекалій із розчином Люголя і без нього досліджували під мікроскопом. Потім кожен зразок обробляли флотацією в розчині сахарози та нітрату натрію (360 г цукру + 540 г нітрату натрію в 1000 мл води, питома вага = 1,35 при 20 °С), осадженням у воді та з використанням методу Бермана.

Дослідження фекалій на *Taenia taeniaeformis* проводили за методом Фюллеборна з метою виявлення сегментів або яєць теній. Досліджували свіжі фекалії, оскільки членики теній швидко розповзаються. Для видової ідентифікації проводили дослідження морфології проглоттид теній [14]. Кішка вважалася позитивною, якщо хоча б один із цих елементів був присутній у зразку фекалій.

Результати досліджень. Протягом періоду дослідження у 275 обстежених котів з Харківського регіону було виявлено 5 різних екто- і ендopаразитів з поширеністю від 7,1 % до 32,3 % (табл. 1).

Таблиця 1 — Поширення екто- та ендopаразитів у котів Харківського регіону

Збудник	Міська популяція, n=177				Сільська популяція, n=98	
	домашні, n=112		безпритульні, n=65		Ін-но	ЕІ, %
	Ін-но	ЕІ, %	Ін-но	ЕІ, %		
<i>Ctenocephalides felis</i>	8	7,1	19	29,2	18	18,4
<i>Otodectes cynotis</i>	20	17,9	21	32,3	22	22,4
<i>Toxascaris leonina</i>	21	18,8	19	29,2	19	19,4
<i>Uncinaria stenocephala</i>	10	8,9	12	18,5	11	11,2
<i>Taenia taeniaeformis</i>	–	–	2	3,1	6	6,1

Із 112 домашніх котів міської популяції *Ctenocephalides felis* реєстрували лише у 8 (7,1 %) тварин, тоді як серед безпритульних інвазованість блохами склала 29,2 %. З числа досліджених котів сільської популяції показник інвазованості становив 18,4 %.

Інвазованість вушними кліщами *Otodectes cynotis* була найвищою у безпритульних котів і склала 32,3 %, тоді як у котів з сільської популяції показник інвазованості був меншим на 9,9 %, а у домашніх тварин з міської популяції — на 14,4 %.

Яйця гельмінтів *Toxascaris leonina* і *Uncinaria stenocephala* найбільше реєстрували у безпритульних котів міської популяції. Екстенсивність інвазії склала 29,2 % та 18,5 % відповідно. Слід зазначити, що екстенсивність *Toxascaris leonina* серед домашніх котів міської і сільської популяції була майже на однаковому рівні і склала 18,8 % та 19,4 % відповідно.

Поширення *Taenia taeniaeformis* у нашому дослідженні склала 3,1 % у безпритульних котів з міської популяції і 6,1 % у котів із сільської популяції. Незважаючи на низьку поширеність, ця інвазія не рідкість у котів. Яйця теніїд (включаючи рід *Taenia*) у домашніх кішок міської популяції не були виявлені.

Незважаючи на відносно невеликий розмір вибірки та обмеження нашого дослідження, результати цього обстеження підтверджують, що екто- та ендopаразитози, більшість з яких мають зоонозний потенціал, найбільш поширені серед безпритульних котів Харківського регіону, тоді як цестода *Taenia taeniaeformis* — переважно у котів з сільської місцевості.

Висновок. Загальна інвазованість енто- і ектопаразитами домашніх котів міської популяції склала 52,7 %, котів сільської популяції — 77,6 %, тоді як інвазованість безпритульних котів становила 100 %.

Перспективи подальших досліджень полягають у з'ясуванні поширення екто- та ендopаразитів котів в залежності від віку тварин та впливу моно- і змішаної інвазії на показники крові.

Список літератури

1. Пономаренко В. Я., Федорова О. В., Булавина В. С. Паразитози безпритульних собак — небезпека для здоров'я людини. *Ветеринарна медицина України*. 2009. № 12. С. 14–17. URL: <https://lib.dsau.dp.ua/book/62121>.
2. El-Gazzar L. M. et al. Insecticide resistance in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Econ. Entomol.* 1986. Vol. 79, iss. 1. P. 132–134. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/79.1.132>.
3. Linardi P. M., Costa Santos J. L. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2012. Vol. 21, iss. 4. P. 345–354. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000400002>.
4. Taenzler J., de Vos C., Roepke R. K. A. Efficacy of fluralaner plus moxidectin (Bravecto® Plus spot-on solution for cats) against *Otodectes cynotis* infestations in cats. *Parasites Vectors*. 2018. Vol. 11. P. 595 DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3167-z>.
5. Bosco A. et al. Efficacy of fluralaner spot-on solution for the treatment of *Ctenocephalides felis* and *Otodectes cynotis* mixed infestation in naturally infested cats. *BMC Vet. Res.* 2019. Vol. 15. P. 28. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1775-2>.
6. Silva J. T. et al. Prevalence and clinical aspects of *Otodectes cynotis* infestation in dogs and cats in the Semi-arid region of Paraíba, Brazil. *Acta Sci. Vet.* 2020. Vol. 48. Pub. 1725. URL: <https://www.ufrgs.br/actavet/48/PUB%201725.pdf>.

7. Spada E., et al. Prevalence of faecal-borne parasites in colony stray cats in northern Italy. *J. Feline. Med. Surg.* 2013. Vol. 15, iss. 8. P. 672–677. DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X12473467>.
8. Abbas I. et al. Gastrointestinal parasites of cats in Egypt: high prevalence high zoonotic risk. *BMC. Vet. Res.* 2022. Vol. 18, iss. 1. P. 420. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03520-0>.
9. Jia W. et al. Mitochondrial genes and genomes support a cryptic species of tapeworm within *Taenia taeniaeformis*. *Acta Trop.* 2012. Vol. 123, iss. 3. P. 154–163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.006>.
10. Gibson, D.I., Bray, R.A., Harris, E.A. (Compilers). Host–Parasite Database of the Natural History Museum, London. 2005. URL: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/>.
11. Karamon J. et al. First report of *Echinococcus multilocularis* in cats in Poland: a monitoring study in cats and dogs from a rural area and animal shelter in a highly endemic region. *Parasit Vectors.* 2019. Vol. 12, iss. 1. P. 313. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3573-x>.
12. Wall R., Shearer D. *Veterinary ectoparasites: biology, pathology and control*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2001. P. 1–242. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470690505>.
13. Манжос О. Ф., Лаврінченко І. В. Особливості клінічного перебігу отодектозу домашніх м'ясоїдних. *Вісник Білоцерківського державного аграрного університету: зб. наук. праць*. 2009. Вип. 60. Ч. 2. С. 71–73.
14. Довгий Ю. Ю. та ін. Паразитарні хвороби м'ясоїдних тварин. Гельмінтози. Житомир : Полісся, 2014. 216 с. URL: http://ir.polissiauniver.edu.ua/bitstream/123456789/3590/1/Parazitarni_khvorobi_myasoyidnih_tvarin_2014.pdf.

DISTRIBUTION OF ECTO- AND ENDOPARASITES IN CATS OF KHARKIV REGION

Kiptenko A. V., Dunaev Yu. K.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

Bogach M. V., Bohach D. M.

Odesa Research Station of the National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Odessa, Ukraine

The purpose of the work was to determine the distribution of various ecto- and endoparasites of the gastrointestinal tract that infect cats of the urban and rural populations of the Kharkiv region for the first time. Studies on ecto- and endoparasites were conducted in 177 cats of the urban population, of which 112 were domestic cats and 65 homeless animals and 98 cats of the rural population of the Kharkiv region in the period from March to July 2023. Data were collected on the location, age and sex of the animals and additionally (in the case of private animals) on anti-parasitic treatment. In 275 examined cats, 5 different ecto- and endoparasites were detected with prevalence ranging from 7.1% to 32.3%. *Ctenocephalides felis* was registered in 7.1% of domestic cats, 29.2% of homeless cats of the urban populations and 18.4% of cats of the rural populations. Infestation with *Otodectes cynotis* ear mites was highest in stray cats (32.3%), while cats from the rural populations had a lower infestation rate of 9.9% and pets from the urban populations — 14.4%. In homeless cats of the urban populations, eggs of helminths *Toxascaris leonina* (29.2%) and *Uncinaria stenocephala* (18.5%) were recorded the most. The prevalence of *Toxascaris leonina* in domestic cats of urban and rural populations was almost at the same level — 18.8% and 19.4%, respectively. *Taenia taeniaeformis* was recorded in stray cats from urban (3.1%) and rural (6.1%) populations. *Taenia* eggs were not detected in domestic cats of the urban populations. The total infestation endo- and ectoparasites of domestic cats in the urban populations was 52.7%, in the rural populations — 77.6%, while the infestation of homeless cats was 100%

Keywords: fleas, ticks, helminths

УДК 619:616.993.19:615.283.921:636.52/.58.082.35

DOI 10.36016/VM-2023-109-19

ЕФЕКТИВНІСТЬ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ НІКАМАКС® ЗА ШТУЧНОГО ІНФІКУВАННЯ КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ КОКЦИДІЯМИ РОДУ *EIMERIA*

Стецько Т. І., Остап'юк А. Ю., Музика В. П., Періг Ж. М., Коцюмбас І. Я.

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, Львів, Україна, e-mail: stetskot@ukr.net

Метою роботи було вивчити ефективність комбінованої кормової добавки НІКАМАКС® (порошок для перорального застосування), виробництва ТОВ “АТ Біофарм” (Україна), активними фармацевтичними інгредієнтами якої є нікарбазин та мадураміцин амонію, за кокидіозу домашньої птиці (курчат-бройлерів), штучно інфікованої кокидіями роду *Eimeria*. Курчата, залучені до експерименту зі штучним зараженням кокидіозом, були розділені на

групи в день вилуплення (одна дослідна група і дві контрольні групи). Птиці дослідної групи (група ІЛ) і першої контрольної групи (група ІНЛ) інокулювали на 14 день життя спорозонні ооцисти *Eimeria acervulina*, *Eimeria necatrix* і *Eimeria tenella*. Для інокуляції курчат-бройлерів використовували ооцисти еймерій, отримані з місцевих бройлерних ферм. Ідентифікацію збудників кокцидіозу проводили за видовою та морфологічною особливостями ооцист еймерій. Кожне курча з групи ІЛ і групи ІНЛ отримало per os а з водою в загальному 100000 *E. acervulina*, 10000 *E. necatrix* і 10000 споруюваних ооцист *E. tenella*. Птиці групи ІЛ кормову добавку НІКАМАКС® застосовували з кормом з 1 дня життя у дозі 0,5 г на 1 кг корму. Групі ІНЛ кормову добавку НІКАМАКС® не застосовували. Курчата, яких не інокулювали і не лікували, склали другу контрольну групу (група ННЛ). Основними критеріями демонстрації ефективності кормової добавки НІКАМАКС® були: показник ураження кишечника; кількість ооцист в фекаліях; смертність та захворюваність птиці, пов'язані з кокцидіозом. Додатковими показниками ефективності кормової добавки були: середній показник живої маси; середньодобовий приріст живої маси птиці; середньодобове споживання корму, співвідношення кількості спожитого корму до приросту; дані моніторингу стану здоров'я птиці упродовж експерименту. Підрахунок кількості ооцист у фекаліях курчат проводили до інокуляції (0 день), на 7, 14 і 21 день після інокуляції. Для підрахунку кількості ооцист еймерій у фекаліях використовували методику якісних досліджень за Фюллеборном та кількісних досліджень за Мак Мастером. Для оцінки ступеня ураження кишечника робили забій та розтин 5 курчат з кожної групи на 7, 14 і 21 день після інокуляції. Ураження кишечника курчат кокцидіозом оцінювали за шкалою від 0 до 4 балів за методом Джонсона та Рейда: 0 — відсутність ураження, 1 — дуже легке, 2 — легке, 3 — помірне і 4 — важке. Курчат зважували перед інокуляцією (0 день) та на 7, 14 і 21 день після інокуляції. Середньодобовий рівень споживання кормів визначали за періоди від 0 до 7 дня, від 7 до 14 дня, від 14 до 21 дня і від 0 до 21 дня після інокуляції. Стан здоров'я усієї птиці, включеної у дослідження, підлягав постійному моніторингу лікарем ветеринарної медицини. Інтенсивність інвазії у групі ІЛ на 7 день після інокуляції становив 3140 ооцист/г калу і знизився до 2210 ооцист/г калу (у 1,42 раза) на 14 день. На 21 добу експерименту виділення ооцист еймерій у курчат, яким застосовували кормову добавку НІКАМАКС® зменшилося до 100 ооцист/г калу. У той же час, показник інтенсивності інвазії в групі ІНЛ з 7 до 21 дня після інокуляції зріс утричі — з 3760 до 11400 ооцист/г калу. Зменшення кількості ооцист в калі курчат групи ІЛ пов'язане з придушенням процесу шизогонії кокцидіостатиком, що призводило до меншого пошкодження кишечника, порівняно з інфікованим, але не пролікованим контролем. Якщо, показники ураження кишечника курчат у групах ІЛ і ІНЛ на 7 день після інокуляції *Eimeria* spp. були майже однаковими, то на 14 день ураженість кишечника курчат групи ІНЛ зростала, а курчат групи ІЛ зменшувалася. На 21 день після інокуляції позитивний вплив кормової добавки НІКАМАКС® на ступінь ураженості збільшується (середня оцінка — 0,7 балів). Тоді, як в інфікованої птиці групи ІНЛ, ураженість кишечника залишалася на високому рівні (середня оцінка — 2,4 бали). Високий рівень смертності (53,3 %) за період експерименту фіксували серед курчат групи ІНЛ. Водночас, застосування кормової добавки НІКАМАКС® суттєво зменшило смертність серед курчат групи ІЛ (10 % за дослідний період). Поступово зменшувалася і захворюваність птиці у цій групі — на 21 день експерименту клінічні ознаки кокцидіозу спостерігали лише в одного бройлера. Додавання курчатам-бройлерам до корму кормової добавки НІКАМАКС® сприяло збільшенню приростів живої маси птиці, інфікованої *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix* (група ІЛ), а також зниженню коефіцієнту конверсії корму, порівняно з групою інфікованої птиці (ІНЛ), якій кормову добавку не застосовували. Узагальнена оцінка первинних та допоміжних показників ефективності, отриманих в дослідженні за штучного інфікування *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix*, свідчить, що кормова добавка НІКАМАКС®, виробництва ТОВ «АТ «Біофарм», є ефективним кокцидіостатиком для профілактики та лікування кокцидіозу в курчат-бройлерів, викликаних кокцидіями роду *Eimeria*

Ключові слова: нікарбазин, мадурамицин амонію

При інтенсивному веденні птахівництва свійська птиця піддається впливу різних факторів стресу, які підвищують її сприйнятливості до різних захворювань, у тому числі, протозойних. Кокцидіоз є однією з найбільш поширених та згубних хвороб курей, викликаних найпростішими

роду *Eimeria*. Існує кілька видів еймерій, які викликають кокцидіоз курей, а саме: *Eimeria tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. praecox*, *E. acervulina*, *E. mitis* та *E. maxima* [1]. Ці найпростіші заселяють сліпу кишку та прилеглі до неї тканини кишкового тракту, що викликає важке захворювання, яке проявляється кровотечею, високим рівнем захворюваності та смертності птиці, низькими приростами маси тіла, виснаженням та іншими симптомами, характерними для кокцидіозу курей [2].

Кокцидіоз має найбільший негативний економічний вплив на ведення птахівництва у світі, через зниження продуктивності птиці (загибелі молодняку, зниження темпів росту та зниження конверсії корму) та витрати на лікування і профілактику [3]. Підраховали, що щорічні глобальні витрати світових комерційних виробників курятини на боротьбу з кокцидіозом курей становлять близько 10 мільярдів фунтів стерлінгів у цінах 2016 року, що еквівалентно 0,16 фунтів стерлінгів за товарну курку [4].

Промислове виробництво м'яса бройлерів немислиме без застосування антикокцидійних засобів [5, 6]. Незважаючи на впровадження імунологічних, біотехнологічних та генетичних методів, ефективна боротьба з кокцидіозом птиці загалом залежить від профілактичного застосування кокцидіостатиків з кормом [7-9]. Вони поділяються на дві категорії: поліефірні іонофори, такі як мадураміцин, які виробляються шляхом ферментації, і синтетичні речовини, такі як нікарбазин, які виробляються шляхом хімічного синтезу [10]. На жаль, набуття стійкості еймерій до кокцидіостатиків є великою проблемою, що обмежує їх використання [11-14].

Нікарбазин — продукт хімічного синтезу, який застосовується як кокцидіостатик для курчат-бройлерів, віком не старше 28 днів у діапазоні доз 100–125 мг нікарбазину/кг повнораціонного корму з періодом каренції 5 діб [15].

Мадураміцин амонію — поліефірний іонофорний антибіотик, який отримують шляхом ферментації актиноміцету *Actinotadura yumaensis*. Як кокцидіостатик застосовується курчатам-бройлерам з кормом у дозі від 5 до 6 мг мадураміцину амонію на кг повнораціонного комбікорму з періодом каренції 5 діб [16].

Одним зі шляхів подовження терміну ефективного використання антикокцидійних засобів є застосування комбінованих кокцидіостатиків з різними механізмами дії [17, 18]. Мадураміцин, як і інші іонофори, порушує нормальний транспорт одновалентних іонів Na^+ і K^+ через мембрану спорозоїтів і трофозоїтів, що призводить до подальшої загибелі паразитів [19]. Крім того, іонофори можуть значно підвищувати внутрішньоклітинну концентрацію Na^+ у спорозоїтах, таким чином, посилюючи активність Na^+ - K^+ -АТФази та використання АТФ [20]. Нікарбазин, як синтетичний засіб, інгібує енергетичний метаболізм в організмі еймерій на стадії шизонта шляхом інгібування сукцинатдегідрогенази і накопичення внутрішньоклітинного кальцію [21].

Застосування комбінацій поліефірних іонофорів та синтетичних антикокцидійних речовин може знижувати потенційну токсичність кокцидіостатика, покращувати його ефективність у результаті синергічної взаємодії проти різних стадій життєвого циклу найпростіших роду *Eimeria*, збільшити діапазон видового спектру антиемеріозної активності та знизити ймовірність розвитку антикокцидійної стійкості [22, 23].

Мета роботи: вивчити ефективність комбінованої кормової добавки НІКАМАКС® (порошок для перорального застосування), виробництва ТОВ «АТ Біофарм» (Україна), активними фармацевтичними інгредієнтами якої є нікарбазин та мадураміцин амонію, за кокцидіозу птиці (курчат-бройлерів), штучно інфікованої кокцидіями роду *Eimeria*.

Матеріали і методи. Ефективність кормової добавки НІКАМАКС® вивчали за штучного зараження курчат-бройлерів трьома видами еймерій: *Eimeria acervulina*, *Eimeria necatrix* і *Eimeria tenella*.

Курчата, залучені до експерименту зі штучним зараженням кокцидіозом, були розділені на групи в день вилуплення — одна дослідна група (у подальшому група ІЛ) і дві контрольні групи. Птиці дослідної групи і першої контрольної групи (у подальшому група ІНЛ) інокулювали на 14 день експерименту спорозоїти ооцисти *Eimeria acervulina*, *Eimeria necatrix* і *Eimeria tenella*.

Для інокуляції курчат-бройлерів використовували ооцисти еймерій, отримані з місцевих бройлерних ферм. Для накопичення та спорювання ооцист еймерій зібрані фекалії вміщували в посудину, додавали воду у співвідношенні 1:10 та ретельно перемішували. Отриману суспензію переносили у центрифужні пробірки та центрифугували упродовж 5 хвилин за 1700 об/хв.

Надосадову рідину зливали, осад переносили у інші пробірки і знову центрифугували впродовж 5 хвилин за 1700 об/хв. Повторно надосадову рідину зливали, до осаду додавали насичений розчин нітрату амонію та відстоювали упродовж 30 хвилин. Ооцисти збирали з поверхні розчину шприцом, після чого відмивали водою. Зібрану масу ооцист переносили у чашки Петрі, суспензію ооцист змішували з рівною частиною 4 % двохромовокислого калію, таким чином, отримуючи 2 % концентрацію.

Отриману суспензію збагачували повітрям за допомогою піпетки Пастера протягом 5 секунд двічі на день. Для запобігання висихання ооцист до суспензії регулярно доливали воду до попереднього рівня. За кімнатної температури споруляція триває, залежно від виду кокцидій, від 5 до 13 діб. Ооцисти зберігали в темному місці за температури 10 °С. За таких умов ооцисти зберігають свої інвазійні властивості до 12 місяців.

Для експериментального зараження кокцидіозом кожне курча з груп ІЛ і ІНЛ отримало *per os* з водою в загальному 100000 *E. acervulina*, 10000 *E. necatrix* і 10000 споруваних ооцист *E. tenella*. Курчатам групи ІЛ кормову добавку НІКАМАКС® застосовували з кормом з першого дня життя в дозі 0,5 г на 1 кг корму, або 3,75 мг мадураміцину амонію і 40 г нікарбазину на 1 кг корму. Курчатам групи ІНЛ кормову добавку не застосовували. Курчата, яких не інокулювали і не лікували, склали другу контрольну групу (ННЛ).

Корм і питну воду птиці надавали *ad libitum*. Годували курчат повнораціонними комбікормами для відповідного віку птиці (стартер, гровер), які містили 22 % і 20 % сирого протеїну, 3100 і 3200 ккал/кг обмінної енергії, відповідно. З першого до 21-го дня життя курчатам згодовували комбікорм-стартер, з 21-го по 35-й день — комбікорм-гровер. Лікувальний корм аналізували на відповідний вміст мадураміцину і нікарбазину та гомогенність (однорідність розподілу кормової добавки в кормі).

З 12-го дня життя курчат утримували в клініці Інституту. Приміщення, де утримувалася піддослідна птиця, було сухим, опалюваним, забезпеченим освітленням і вентиляцією. Перед посадкою курчат приміщення звільняли від пилу, залишків корму, посліду, мили стіни та стелю, після чого проводили дезінфекцію, після якої приміщення закривали на 48 годин, потім провітрювали і просушували. Температура повітря в приміщенні під час посадки птиці була 28-30 °С. З 21-го дня життя курчат температуру в приміщенні поступово знижували до 20 °С.

Кожну групу птиці утримували в окремому загоні на підлозі з глибокою підстилкою (подрібнена тирса із смереки). Щоб уникнути потенційного перехресного зараження, курчат другої контрольної групи (ННЛ), які не були інокульовані, утримували в окремому від інокульованих груп приміщенні.

Ідентифікацію збудників кокцидіозу проводили за видовими та морфологічними особливостями ооцист еймерій.

Основними критеріями ефективності кормової добавки НІКАМАКС® були: показник ураження кишечника; кількість ооцист в фекаліях; смертність та захворюваність птиці, пов'язані з кокцидіозом. Додатковими критеріями ефективності кормової добавки були: середній показник живої маси; середньодобовий приріст живої маси птиці; середньодобове споживання корму, співвідношення кількості спожитого корму до приросту; дані моніторингу стану здоров'я птиці упродовж експерименту.

Клініко-діагностичне дослідження курчат-бройлерів проводилося лікарем ветеринарної медицини, згідно з методичними рекомендаціями з діагностики, лікування та профілактики еймеріозу курей [24].

Підрахунок кількості ооцистів у фекаліях курчат проводили до інокуляції (0 день), на 7, 14 і 21 день після інокуляції. Для підрахунку кількості ооцист еймерій у фекаліях використовували методику якісних досліджень за Фюллеборном та кількісних досліджень за Мак Мастером.

Для оцінки ступеня ураження кишечника робили забій та розтин п'яти курчат з кожної групи на 7, 14 і 21 день після інокуляції. Ураження кишечника курчат кокцидіозом оцінювали за шкалою від 0 до 4 балів за методом Джонсона та Рейда [25]: 0 — відсутність ураження, 1 — дуже легке, 2 — легке, 3 — помірне і 4 — важке. При розтині оцінювали ураження різних сегментів кишечника: дванадцятипалої кишки, верхнього і нижнього відділу середнього кишечника, прямої та сліпої кишок. Курчат зважували перед інокуляцією (0 день) та на 7, 14 і 21 день після інокуляції. Середньодобовий рівень споживання кормів визначали за періоди від 0 до 7 дня, від 7 до 14 дня, від 14 до 21 дня і від 0 до 21 дня після інокуляції. Стан здоров'я усієї

птиці, залученої до дослідження, підлягав постійному моніторингу лікарем ветеринарної медицини. Щодня оглядати послід курчат на наявність крові. Упродовж клінічного експерименту фіксували побічні ефекти та негативні явища (за наявності).

Кожний загін з птицею вважався експериментальною одиницею. Результати тестувань статистично аналізувалися з рівнем вірогідності 5 % ($p < 0,05$). Початкові, проміжні і кінцеві результати тестувань групи ІЛ (дослідна) порівнювали з групою ІНЛ (І контрольна). Були узагальнені початкові, проміжні та кінцеві результати тестувань групи ННЛ (ІІ контрольна), але вони не піддавалися статистичному аналізу.

Результати роботи. Захворювання на еймеріоз у курчат-бройлерів проходило як у гострій (клінічній), так і у підгострій (субклінічній) формах.

За клінічно вираженого гострого перебігу захворювання спостерігали загальне пригнічення курчат, птиця здебільшого лежала, збившись у купки, неохоче пересувалася, пір'я було скуйовджене, гребінець та шкіра — бліді, апетит був знижений, виявляли діарею з домішками слизу та крові.

Клінічні ознаки за субклінічного перебігу були менш вираженими. Курчата були пригніченими, виснаженими, відставали у рості та розвитку. Періодично з'являлася діарея, в основному без домішок крові.

Результати дослідження ефективності кормової добавки НІКАМАКС® при застосуванні для профілактики кокцидіозів у курчат-бройлерів, викликаних асоціацією еймерій *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix*, наведені у таблицях 1-5.

Таблиця 1 — Кількість ооцист *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix* у фекаліях курчат-бройлерів, ооцист/г калу

Групи	День відбору зразків щодо інокуляції			
	0	7	14	21
ННЛ	0	0	< 30	< 50
ІНЛ	0	3760	8750	11400
ІЛ	0	3140	2210	< 100
Достовірність різниці між ІЛ і ІНЛ	-		$p < 0,05$	$p < 0,05$

У першу чергу, ефективність кормової добавки оцінювали за її здатністю пригнічувати утворення ооцист. Показник інтенсивності інвазії (ІІ) в групі ІНЛ з 7 до 21 дня після інокуляції птиці асоціацією еймерій *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix* зріс утричі (з 3760 до 11400 ооцист/г калу, відповідно). У той же час, у групі ІЛ він становив 3140 ооцист/г калу на 7 день і знизився до 2210 ооцист/г калу (у 1,42 раза) на 14 день після інокуляції. На 21 добу експерименту виділення ооцист еймерій у курчат, яким застосовували кормову добавку НІКАМАКС® зменшилося у середньому до 100 ооцист/г калу, що є свідченням ефективності цього кокцидіостатика, як засобу профілактики розвитку кокцидіозу в курчат-бройлерів.

Зменшення показника кількості ооцист в калі курчат дослідної групи пов'язане з придушенням процесу шизогонії кокцидіостатиком, що призводить до меншої ураженості кишечника в птиці, порівняно з інфікованим, але не пролікованим контролем (табл. 2).

Таблиця 2 — Оцінка ураження кишечника курчат, інфікованих *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix*, середній бал, n=5

Групи	День відбору зразків щодо інокуляції		
	7	14	21
ННЛ	0	0	0
ІНЛ	1,8	2,4	2,4
ІЛ	1,7	1,5	0,7
Достовірність різниці між ІЛ і ІНЛ	-	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Інокуляція ооцистами еймерій спричинила помітні зміни в кишечнику інфікованих курчат. Оцінка ураження кишечника курчат у групах ІЛ і ІНЛ на 7 день після інокуляції асоціацією еймерій були майже однаковими. На 14 день ураженість кишечника курчат групи ІНЛ зростала, а курчат групи ІЛ зменшувалася. На 21 день після інокуляції позитивний вплив кормової

Розділ 7. Паразитологія

добавки НІКАМАКС® на ступінь ураженості збільшувався (середня оцінка — 0,7 балів). Тоді, як в інфікованої птиці, якій не додавали до корму НІКАМАКС® (ІНЛ), ступінь ураженості кишечника залишався на високому рівні (середня оцінка — 2,4 бали).

Таблиця 3 — Смертність і захворюваність курчат-бройлерів, інфікованих *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix*, n=30

Групи	Смертність		Смертність, пов'язана з кокцидіозом, %	Захворюваність, пов'язана з кокцидіозом (скуповжене пір'я, діарея з кров'ю та без крові)		
	Загалом	Пов'язана з кокцидіозом		0-7	7-14	14-21
Дні після інокуляції	0-21	0-21	0-21	0-7	7-14	14-21
ННЛ	2	0	0	2	0	0
ІНЛ	18	16	53,3	12	14	12
ІЛ	4	3	10	7	4	1

Спостерігали високий рівень смертності від кокцидіозу, спричиненого асоціацією еймерій *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix*, серед курчат групи ІНЛ (53,3 %) за період експерименту. Та птиця, що залишилася живою, продовжувала хворіти на кокцидіоз до кінця дослідного періоду. Застосування кормової добавки НІКАМАКС® суттєво зменшило смертність серед курчат групи ІЛ (10 % за дослідний період). Поступово зменшувалася і захворюваність. На кінець експерименту (21 день) клінічні ознаки кокцидіозу спостерігали лише в одного бройлера.

Таблиця 4 — Середня жива маса та середньодобовий приріст курчат за інфікування *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix*

Групи	Середня жива маса, г				Середньодобовий приріст, г			
	День зважування				За період			
	0	7	14	21	0-7	7-14	14-21	0-21
ННЛ	441	900	1424	2147	65	75	103	81,2
ІНЛ	436	768	1186	1730	47	60	78	61,7
ІЛ	440	810	1264	1912	53	65	93	70,1

Таблиця 5 — Споживання кормів та конверсія корму за інфікування курчат *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix*

Групи	Споживання корму, г на голову птиці за добу				Співвідношення кількості спожитого корму до середньодобового приросту			
	За період				За період			
	0-7	7-14	14-21	0-21	0-7	7-14	14-21	0-21
ННЛ	86	128	173	129,0	1,32	1,70	1,68	1,59
ІНЛ	68	105	150	107,8	1,45	1,75	1,92	1,75
ІЛ	70	108	160	112,7	1,32	1,66	1,72	1,61

Згідно з даними, наведеними у таблицях 4 і 5, додавання курчатам-бройлерам до корму кормової добавки НІКАМАКС® сприяло збільшенню приростів живої маси птиці, інфікованої асоціацією *E. acervulina*, *E. tenella* і *E. necatrix* (група ІЛ), а також зниженню коефіцієнту конверсії корму, порівняно з групою інфікованої птиці (ІНЛ), якій кормову добавку не застосовували.

Отже, застосування кормової добавки НІКАМАКС® забезпечувало курчат-бройлерів, хворих на кокцидіоз, поживними та метаболічними перевагами над курчатами, яким цей кокцидіостатик не застосовували. Економічна користь від кормової добавки включала покращення конверсії корму, підвищення приростів живої маси птиці і зниження її захворюваності та смертності.

Висновки. Результати проведених досліджень продемонстрували, що кормова добавка НІКАМАКС® при додаванні до корму в дозі 0,5 г на 1 кг корму, або 3,75 мг мадураміцину амонію і 40 г нікарбазину на 1 кг корму, була ефективною у попередженні клінічного прояву кокцидіозу в

курчат-бройлерів, штучно заражених кокцидіями роду *Eimeria*. Застосування кормової добавки сприяло зменшенню усіх основних показників ефективності (оцінка ураження кишечника; кількість ооцист в фекаліях; смертність та захворюваність птиці, пов'язані з кокцидіозом). Комбінації нікарбазину і мадураміцину значно зменшувала екскрецію ооцист з фекаліями курчат-бройлерів, інфікованих різними видами *Eimeria*. Під впливом кормової добавки НІКАМАКС® суттєво знижувалася ураженість кишечника птиці. Це вказує на те, що мадураміцин і нікарбазин захищають його цілісність, а, отже, і його абсорбційну здатність. Смертність та захворюваність курчат-бройлерів були значно меншими в групі птиці, якій до складу корму вводили кормову добавку НІКАМАКС®, ніж у групі інфікованої еймеріями птиці, якій кормову добавку не застосовували.

Додаткові показники ефективності продемонстрували, що за присутності еймеріозної інфекції додавання до корму кормової добавки НІКАМАКС® сприяло збільшенню приростів курчат-бройлерів та зниженню коефіцієнту конверсії корму, у порівнянні з інфікованою птицею, якій не застосовували добавки для профілактики кокцидіозу.

Узагальнена оцінка основних та додаткових показників ефективності, отриманих в дослідженні за штучного інфікування еймеріями, демонструє, що кормова добавка НІКАМАКС®, виробництва ТОВ «АТ «Біофарм», є ефективним кокцидіостатичним засобом профілактики та лікування кокцидіозу в курчат-бройлерів, викликаних різними видами *Eimeria*.

Перспективи подальших досліджень. Ефективність кормової добавки НІКАМАКС®, виробництва ТОВ «АТ «Біофарм», вивчатиметься за штучного зараження курчат-бройлерів окремими видами еймерій, які здатні викликати клінічно виражений кокцидіоз у птиці, а також за природного інфікування кокцидіями роду *Eimeria*.

Список літератури

1. McDougald L. R. Protozoal infections. Diseases of Poultry / Saif, Y.M. et al. (Eds.). Twelfth ed. Blackwell Publishing, 2008. P. 1067–1085.
2. Muthamilselvan T., et al. Herbal remedies for coccidiosis control: A review of plants, Compounds, and Anticoccidial Actions. *Natural Products for Infectious Diseases*. 2016. Vol. 2016. Article ID 2657981. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/2657981>.
3. Shirley M. W., Smith A. L., Tomley F. M. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Advances in parasitology*. 2005. Vol. 60. P. 285–330. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60005-X).
4. Blake D. P. et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet Res*. 2020. Vol. 51. P. 115. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00837-2>.
5. Blake D. P., Tomley F. M. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in Parasitology*. 2014. Vol. 30. P. 12–19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.003>.
6. Williams R. B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*. 1999. Vol. 29. P. 1209–1229. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00086-7).
7. Maharana B. R., Tewari A. K. Control of poultry coccidiosis: changing trends. *J. Parasit. Dis*. 2011. Vol. 35, No 1. P. 10–17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12639-011-0034-7>.
8. Witcombe D. M., Smith N. C. Strategies for anti-coccidial prophylaxis. *Parasitol*. 2014. Vol. 141, No 11. P. 1379–1389. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182014000195>.
9. McDougald L. R., Reid W. M. Coccidiosis. In: *Diseases of Poultry* / Calnek B. W. (ed.). 9th edition. New Delhi, India : Affiliated East West Press Pvt. Ltd., 1994.
10. Ryley J. F., Betts M. J. Chemotherapy of chicken coccidiosis. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*. 1973. Vol. 11. P. 221–293. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-017\(84\)90106-7](https://doi.org/10.1016/S0044-017(84)90106-7).
11. Chapman H. D. Drug resistance in avian coccidia (a review). *Veterinary Parasitology*. 1984. Vol. 15. P. 11–27. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(84\)90106-7](https://doi.org/10.1016/0304-4017(84)90106-7).
12. Chapman H. D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology*. 1997. Vol. 26. P. 221–244. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079459708419208>.
13. Bafundo K. W., Jeffers T. K. Selection for Resistance to Monensin, Nicarbazine, and the Monensin Plus Nicarbazine Combination. *Poult. Sci*. 1990. Vol. 69. P. 1485–1490. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0691485>.
14. Abbas R. Z. et al. Options for integrated strategies for the control of avian coccidiosis. *Int. J. Agric. Biol*. 2012. Vol. 14. P. 1014–1020. URL: https://www.fspublishers.org/published_papers/3693_.pdf.
15. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Koffogran (nicarbazine) as a feed additive for chickens for fattening. *EFSA Journal*. 2010. Vol. 8, No 3. Article ID 1551. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1551>.
16. Scientific Opinion on safety and efficacy of Cygro® 10G (maduramicin ammonium) for chickens for fattening. *EFSA Journal*. 2011. Vol. 9, No 1. Article ID 1952. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1952>.
17. Chapman H. D. Studies on the sensitivity of field isolates of *Eimeria maxima* to combinations of anticoccidial drugs. *Avian Pathology*. 1980. Vol. 9. P. 67–76. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079458008418387>.

18. Long P. L., Johnson K., Mackenzie M. E. Anticoccidial activity of combinations of narasin and nicarbazin. *Poultry Science*. 1988. Vol. 67. P. 248–252. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0670248>.
19. Noack S., Chapman H. D., Selzer P. M. Anticoccidial drugs of the livestock industry. *Parasitol. Res.* 2019. Vol. 118. P. 2009–2026. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06343-5>.
20. Wang Z. et al. Influence of monensin on cation influx and Na⁺-K⁺-ATPase activity of *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *Journal of parasitology*. 2006. Vol. 92, No 5. P. 1092–1096. DOI: <https://doi.org/10.1645/GE-783R.1>.
21. McDougald L. R., Galloway R. B. *Eimeria tenella*: Anticoccidial drug activity in cell cultures. *Exp. Parasitol.* 1973. Vol. 34. P. 189–196. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(73\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(73)90078-7).
22. Chapman H. D., Rathinam T. Focused review: The role of drug combinations for the control of coccidiosis in commercially reared chickens. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2022. Vol. 18. P. 32–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2022.01.001>.
23. Chapman H. D., Jeffers T. K. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2014. Vol. 4. P. 214–217.
24. Гірковий А. Ю. та ін. Методичні рекомендації з діагностики, лікування та профілактики еймеріозу курей : затверджено науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України. протокол № 1 від 19 грудня 2013 р. 2014. 32 с.
25. Johnson J., Reid W. M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitology*. 1970. Vol. 28, No 1. P. 30-36. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(70\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(70)90063-9).

EFFICIENCY OF FEED ADDITIVE NIKAMAX® FOR ARTIFICIAL INFECTION OF BROILER CHICKENS WITH *EIMERIA* SPP.

Stetsko T. I., Ostapiuk A. Yu., Muzyka V. P., Perig Zh. M., Kotsyumbas I. Ya.

State Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Lviv, Ukraine

The aim of the work was to study the effectiveness of the combined feed additive NIKAMAX® (powder for oral use), produced by JSC Biopharm (Ukraine), the active pharmaceutical ingredients of which are nicarbazine and maduramycin ammonium, for coccidiosis in poultry (broiler chickens) artificially infected with coccidia genus *Eimeria*. Chickens included in the experiment with artificial infection with coccidiosis were divided into groups on the day of hatching (one experimental group and two control groups). Poultry of the experimental group (group IT) and the first control group (group INT) were inoculated with spore-bearing oocysts of *Eimeria acervulina*, *Eimeria necatrix* and *Eimeria tenella* on the 14th day of life. *Eimeria* oocysts obtained from local broiler farms were used to inoculate broiler chickens. Identification of coccidiosis pathogens was carried out according to species and morphological indexes of *Eimeria* oocysts. Each chicken of the group IT and the group INT received per os with water a total of 100000 *E. acervulina*, 10000 *E. necatrix* and 10000 *E. tenella* sporulated oocysts. For group IT feed additive NIKAMAX® was used with feed from the 1st day of life at a dose of 0.5 g per 1 kg of feed. This feed additive was not administered for the group INT. Chickens, which were not inoculated and not treated, made up the second control group (group NNT). The primary criteria for demonstrating the effectiveness of the feed additive NIKAMAX® were: intestinal damage index; number of oocysts in feces; poultry mortality and morbidity associated with coccidiosis. Additional indicators of the effectiveness of the feed additive were: average live weight; average daily increase in live weight of poultry; average daily feed consumption, the ratio of the amount of feed consumed to growth; data of bird health monitoring during the experiment. Counting of the number of oocysts in chicken feces was performed before inoculation (0 day), 7, 14 and 21 days after inoculation. To count the number of *Eimeria* oocysts in feces, the methodology of qualitative studies by Fülleborn and quantitative studies by McMaster was used. To assess the degree of intestinal damage, 5 chickens from each group were slaughtered and dissected on 7, 14 and 21 days after inoculation. Intestinal lesions of chickens with coccidiosis were evaluated on a scale from 0 to 4 points according to the Johnson and Reid method: 0 — no lesion, 1 — very mild, 2 — mild, 3 — moderate, and 4 — severe. Chickens were weighed before inoculation (day 0) and on days 7, 14 and 21 after inoculation. The average daily level of feed consumption was determined for the periods from 0 to 7 days, from 7 to 14 days, from 14 to 21 days and from 0 to 21 days after inoculation. The state of health of all birds included in the study was subject to constant monitoring by a veterinarian. The intensity of invasion in the group IT on the 7th day after inoculation was 3140 oocysts/g of feces and decreased to 2210 oocysts/g of feces (1.42 times) on the 14th day. On the 21st day of the experiment, the excretion of *Eimeria* oocysts in chickens treated with the feed additive NIKAMAX® decreased to 100 oocysts/g of feces. At the same time, the intensity of invasion in the group INT increased three times from 7 to 21 days after inoculation - from 3760 to 11400 oocysts/g of feces. The decrease in the number of oocysts in the feces of chickens of the group IT is associated with the suppression of the schizogony process by the coccidiostat, what led to less damage of the intestine, compared with the infected but untreated control. If, the indicators of the chickens intestinal damage in the groups IT and INT on the 7th day after inoculation with *Eimeria* spp. were almost the same, then on the 14th day, the damage of the chickens intestine of the group INT increased, while that of chickens of the group IT decreased. On the 21st day after inoculation, the positive effect of feed additive NIKAMAX® on the degree of damage increases (average score — 0.7 points). Then, as in the infected bird of the group INT, the degree of intestinal damage remained at a high level (average score — 2.4 points). A high mortality rate (53.3%) during the experimental period was recorded

among chickens of the group INT. At the same time, the use of feed additive NIKAMAX® significantly reduced mortality among chickens of the group IT (10% during the experimental period). The morbidity of poultry in this group also gradually decreased on the 21st day of the experiment, clinical signs of coccidiosis were observed in only one broiler. Addition of feed additive NIKAMAX® to broiler chickens increased the live weight gains of poultry infected with *E. acervulina*, *E. tenella* and *E. necatrix* (group IT), as well as reduced the feed conversion ratio, compared to the group of infected birds (group INT) which feed additive was not used. The generalized assessment of the primary and secondary efficiency indicators obtained in the study for artificial infection of *E. acervulina*, *E. tenella* and *E. necatrix* shows that the feed additive NIKAMAX®, manufactured by JSC Biopharm, is an effective coccidiostat for the prevention and treatment of coccidiosis in broiler chickens caused by coccidia of the genus *Eimeria*

Keywords: nicarbazine, maduramycin ammonium

8. ІСТОРІЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ НАУКИ

УДК 619(092)[Kudriavtsev H. O.]

DOI 10.36016/VM-2023-109-20

ВНЕСОК ПРОФЕСОРА ГЕОРГІЯ ОЛЕКСІЙОВИЧА КУДРЯВЦЕВА У СТАНОВЛЕННЯ ТА РОЗВИТОК ВЕТЕРИНАРНОЇ НАУКИ В УКРАЇНІ

Бусол В. О., Коваленко Л. В., Возк Д. В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: larbuko@gmail.com

У статті наведено етапи життєвого шляху, напрями та результати наукових досліджень другого директора ННЦ «ІЕКВМ» (1924–1926 рр.), доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента Академії наук Узбецької РСР Георгія Олексійовича Кудрявцева у контексті його внеску в становлення та розвиток ветеринарної науки в Україні

Ключові слова: історія науки, лейкозологія, репресії

Упродовж 100-річної історії Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» видано декілька історичних видань і статей, присвячених історії установи та її видатним особистостям [1–3]. У той же час життєвий шлях і науковий доробок Георгія Олексійовича Кудрявцева, одного з директорів Інституту, доктора ветеринарних наук, професора висвітлено недостатньо.

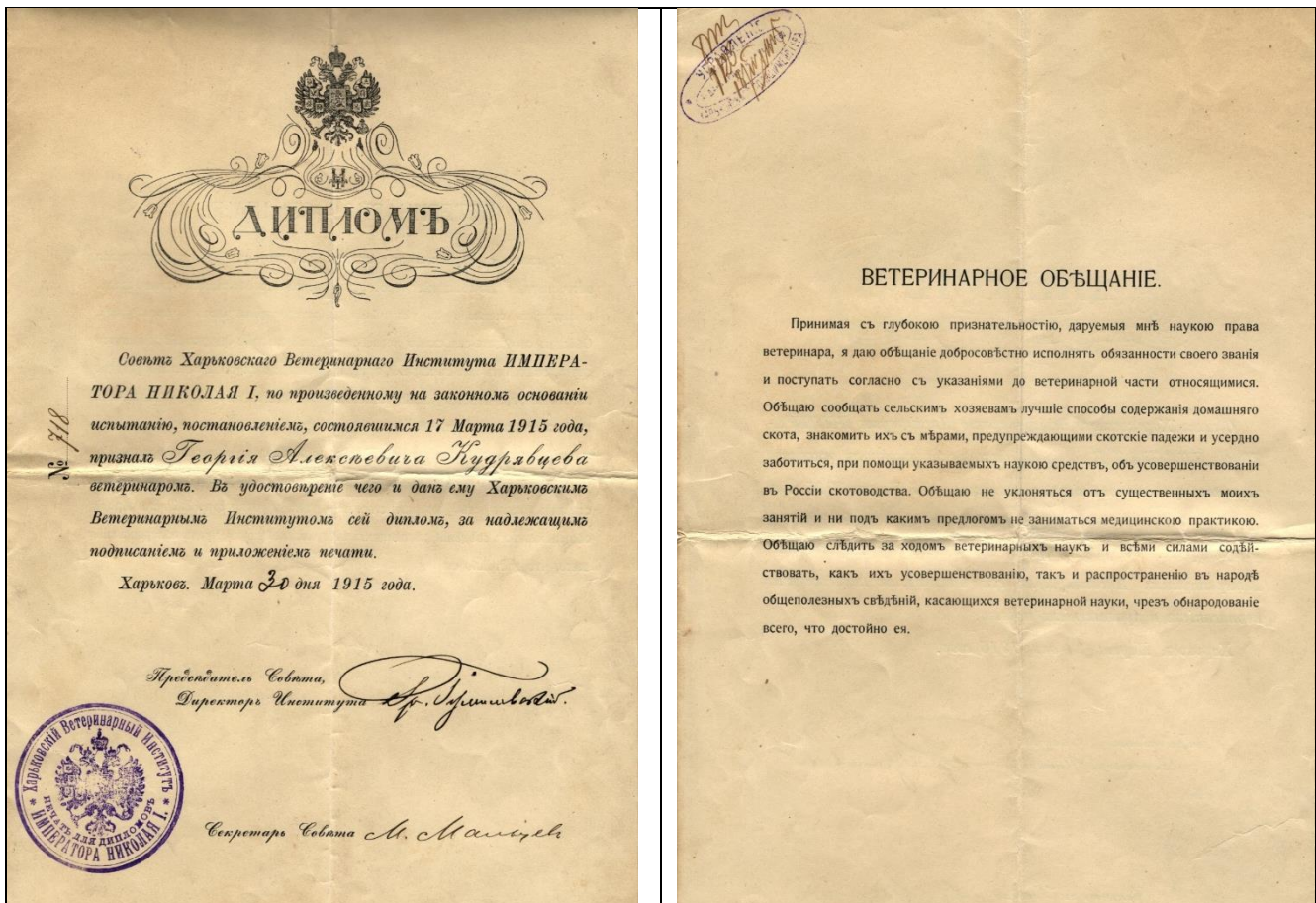
В основу цього наукового дослідження основних етапів наукової діяльності професора Г. О. Кудрявцева лягли матеріали його автобіографії написаної ним наприкінці 40-х років минулого століття, а також нечисленні літературні та інтернет-джерела [2, 4–8].

Як вказано в автобіографії, Кудрявцев Георгій Олексійович народився 23 квітня 1891 року на Кубані в сім'ї сільського священника. У 1915 році закінчив Харківський ветеринарний інститут, про що отримав представлений тут диплом. Рада директорів ХВІ рекомендувала його для роботи в бактеріологічній станції (м. Харків) для наукових досліджень щодо розробки та виготовлення вакцин і лікувальних сироваток. Одночасно з цим, під керівництвом професора Д. Ф. Конєва він розпочав дослідження щодо атенуації збудника сапу коней *Bac. mallei*, які були перервані через призов до лав діючої армії.

У 1918 році, після демобілізації, за конкурсом Георгій Олексійович був обраний на посаду асистента Харківського ветеринарного інституту для роботи у бактеріологічній станції. Під керівництвом професорів Д. Ф. Конєва та О. В. Дедюліна ним було налагоджено виробництво малеїну в значних обсягах. «Одночасно з цим» — пише у своїй автобіографії Георгій Олексійович — «мною було налагоджено виготовлення компонентів для РСК при сапі для всієї України, з одного боку ця реакція була введена в широку практику діагностики сапу, а з другого — досягнута її уніфікація на виробництві». У результаті цих експериментальних досліджень Г. О. Кудрявцевим теоретично обґрунтована цінність системи вищевказаних препаратів, викладена ним у циклі робіт: «Малеїн Інституту наукової і практичної ветеринарії УССР»; «До питання про сутність реакції зв'язування комплементу при сапі»; «До питання про вміст холестерину у сироватках коней, які дають чи не дають зв'язування комплементу з сапними антигенами» та інші. При цьому, остання з вищенаведених була переведена на чеську та опублікована в працях Вищої ветеринарної школи в Брно.



**Професор Г. О. Кудрявцев,
1970 р.**



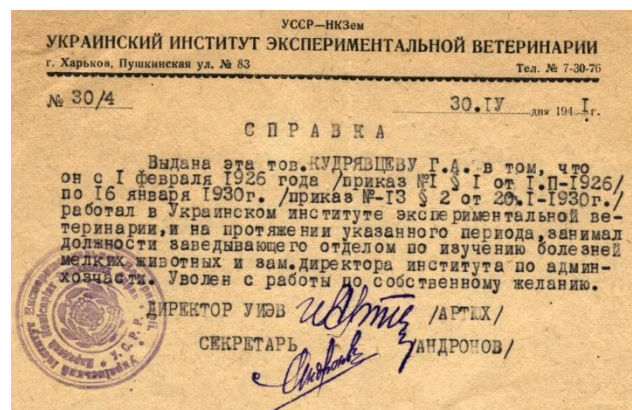
Диплом ветеринарного лікаря Г. О. Кудрявцева, 1915 р.

Упродовж 1924–1926 років Г. О. Кудрявцев виконував обов’язки директора Українського інституту наукової і практичної ветеринарії [2] Як свідчать матеріали автобіографії, у цей час ним була доведена доцільність об’єднання бактеріологічної станції та очолюваної ним установи «в один потужний інститут всеукраїнського значення». У результаті чого в наступні роки таке об’єднання було проведено та здійснено відповідне спеціальне будівництво лабораторій та інших приміщень. Далі він пише: «Цей інститут існує в м. Харкові і на цей час як Український державний інститут експериментальної ветеринарії та відомий в СРСР і за кордоном багатьма своїми видатними роботами особливо в галузі вивчення сапу, інфекційної анемії, хвороб птиці та ін.».

З 1924 по 1928 рік наукові дослідження Г. О. Кудрявцева були спрямовані на вивчення місцевого імунітету, розробку додаткових методів діагностики сибірки. У результаті було встановлено наявність гуморального імунітету в коней, імунізованих бактерійним білком збудника сибірки, що дозволило розробити оригінальну методику отримання гіперімунної сироватки, розроблена техніка реакції преципітації для виявлення антигену збудника в реакції преципітації (реакція Асколі), яка широко використовувалась для досліджень експортної тваринницької сировини.

Як свідчать дані представленої тут довідки, у 1928–1930 роках Георгій Олексійович працював заступником директора з господарсько-адміністративної частини та завідувачем відділу з вивчення хвороб дрібних домашніх тварин та птиці.

Як писав сам Г. О. Кудрявцев, ним вперше в Україні було встановлено таке інфекційне захворювання птиці як пулороз, надзвичайно



Довідка про роботу в УІЕВ, 1941 р.

поширене на той час, у співавторстві з іншими науковцями він вивчав інші захворювання дрібних домашніх тварин і птиці та розробляв заходи боротьби з ними, займався питаннями щодо «зараженості яєць мікробами».

У 1927–1928 роках Г. О. Кудрявцев за Наказом Наркомзему України був відряджений до Німеччини та Чехословаччини для вивчення системи вищої освіти та наукових досліджень у галузі ветеринарії. За цей час, зокрема, в Інституті державної охорони здоров'я та гігієнічному інституті Берлінського університету освоїв методику вирощування анаеробних культур, взяв участь у порівняльному дослідженні вакцин проти сибірки Пастера та Ценковського.

Різнопланову наукову та адміністративно-господарську роботу Г. О. Кудрявцев поєднує з громадською діяльністю. Так, упродовж декількох років (1922–1929 рр.) він був членом Вченої ради при ветеринарному управлінні Наркомзему УРСР, членом Всеукраїнської комісії з вивчення піроплазмозів та їх переносників, був завідувачем навчальною частиною курсів з підвищення кваліфікації ветеринарних лікарів, організованих при Інституті наукової і практичної ветеринарії.

На рубежі 1929–1930 років за сімейними обставинами Г. О. Кудрявцев переїжджає до м. Вороніж, де обіймає посади завідувача кафедри мікробіології Воронізького зооветінституту та відділу мікробіології Воронізького дослідного ветеринарного інституту.

У 1930 році Георгій Олексійович потрапляє під жорна репресій радянської влади щодо ветеринарів, як науковців та практичних фахівців, за справу, сфабрикованою ГПУ УРСР про «Всеукраїнську контрреволюційну організацію ветеринарів та бактеріологів». Вона «діяла» впродовж 1921–1925 рр., а її керівником був названий директор Інституту наукової та практичної ветеринарії, професор М. Д. Агаллі [4]. За матеріалами справи, до ядра цієї «контрреволюційної організації» входило 6 науковців інституту з 17 учасників, яких звинувачували в організації «бактеріологічного шкодочинства» проти радянської влади. Георгій Олексійович був віднесений до складу харківського активу організації. Також його абсурдно звинуватили у зв'язках з «білоемігрантами» під час його поїздки до Чехословаччини, нібито для отримання вказівок щодо проведення «бактеріологічної війни». Г. О. Кудрявцев був засуджений до 10 років таборів [4].

За спогадами самого професора Г. О. Кудрявцева, ув'язнення він відбував у таборі в селищі Тайляк Самаркандської області Узбекистану, де зібрали науковців-ветеринарів з усього Радянського Союзу. Там були побудовані та обладнані лабораторні приміщення, де ув'язнені проводили наукові дослідження щодо інфекційних хвороб тварин, поширених на цій території, зокрема сибірки та хвороб овець. І до сьогодні там функціонує Науково-дослідний інститут ветеринарії [5].

В ув'язненні Г. О. Кудрявцев перебував до 1936 року. Згодом він був реабілітований [1].

З 1936 по 1950 рік Георгій Олексійович займався педагогічною та науковою діяльністю у м. Самарканд (Узбекистан), яка була спрямована на вивчення інфекційних хвороб овець, зокрема вперше описаного ним колібацильозу (колібактеріозу) молодняку овець. Він розробив формолвакцину проти цього захворювання та написав монографію за матеріалами досліджень. Вона була прийнята як докторська дисертація, яку Георгій Олексійович успішно захистив 4 травня 1941 р. у Харківському ветеринарному інституті.

Учене звання професора Георгію Олексійовичу присуджено у 1942 р., звання Заслуженого діяча науки Узбецької РСР присвоєно в 1945 р., у 1947 р. він був обраний членом-кореспондентом Академії наук Узбецької РСР [6]. Нагороджений орденом «Знак пошани» та медалями [7].

У 1950 році професор Г. О. Кудрявцев повертається в Україну — переїжджає до м. Біла Церква Київської області, де очолює кафедру епізоотології Білоцерківського сільськогосподарського інституту (БЦСГІ). Напрямами його наукової діяльності стали вивчення інфекційного атрофічного риніту свиней, ящуру, туберкульозу тварин, а також з 1965 року лейкозу великої рогатої худоби — на той час нового для України захворювання з невизначеною етіологією [7]. У 1965 р. завідувач кафедри епізоотології БЦСГІ М. Н. Доронін та професор цієї кафедри Г. О. Кудрявцев запропонували Головному управлінню ветеринарії МСГ УРСР проект програми науково-дослідних робіт з вивчення лейкозу великої рогатої худоби як інфекційної хвороби та перспективності успішної боротьби з ним [8].

Розуміючи перспективність і значимість всебічного вивчення цього захворювання, Георгій Олексійович захопив цією ідеєю одного зі співавторів цієї статті, В. О. Бусола, свого аспіранта, що й визначило його науковий шлях.



**Професор Г. О. Кудрявцев з аспірантом
В. О. Бусолом за обговоренням
дисертаційної роботи, 1967 р.**

Ще хотілось би відзначити, що він вільно володів українською, писав нею наукові статті та рекомендації.

Помер Г. О. Кудрявцев 22 вересня 1974 р., похований у м. Білій Церкві.

Сорок чотири роки, більше, ніж половину свого життя, професор Г. О. Кудрявцев присвятив розвитку ветеринарної науки та освіти України, займаючись найбільш актуальними у свій час питаннями епізоотології, інфекційної патології, створенням засобів захисту тварин. Застосовуючи свій талант організатора, він став одним з фундаторів школи ветеринарної лейкозології в Україні, а його ім'я назавжди вписано в історію ветеринарної науки як Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», так і нашої держави в цілому.

Список літератури

1. Служение ветеринарной науке (страницы истории ИЭКВМ. 1922–2001 гг.) / под ред. акад. УААН, д. вет. н., проф. П. П. Фукс и д. вет. н. А. Н. Головки. Харьков: Золотые страницы, 2001. 363 с.
2. Стегний Б. Т. и др. ННЦ «ИЭКВМ» — 90 лет на передовом рубеже ветеринарной науки: история создания института, этапы его развития и научно-исследовательская деятельность // Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» на передовом рубеже ветеринарной науки: страницы истории, настоящее и перспективы развития (к 90-летию со дня основания) / под ред. д-ра вет. наук, проф., акад. НААН и РАСХН, Засл. деят. науки и техники Украины Б. Т. Стегния. Киев: СТ-Друк, 2013. С. 3–56.
3. Стегний Б. Т., Коваленко Л. В., Вовк Д. В. ННЦ «ИЭКВМ» — 95 років на передовому рубежі забезпечення біологічної та продовольчої безпеки України. *Ветеринарна медицина*: міжвід. темат. наук. зб. 2018. Вип. 104. С. 5–18.
4. Стегний Б. Т., Красников Г. А., Королёв А. Г. К истории института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН (Время репрессий 1030–1938 гг.). *Ветеринарна медицина*: міжвід. темат. наук. зб. 2004. Вип. 83. С. 227–236.
5. Veterinariya ilmiy-tadqiqot instituti. URL: <https://maps.app.goo.gl/nX2nzc9KM851tRrQ8>.
6. До 130-річчя з дня народження Кудрявцева Георгія Олексійовича. URL: https://btsau.edu.ua/sites/default/files/news/JPGpictures/museum/130_kudruavcev.pdf.
7. Ляшенко О. Т. Кудрявцев Георгій Олексійович (1891–1974) // Вчені у галузі ветеринарної медицини. Київ: Аграрна наука, 2001. Кн. 6. С. 171–172.
8. Бусол В. О. Українська наукова школа ветеринарної лейкозології: становлення, розвиток, майбутнє. *Ветеринарна медицина*: міжвід. темат. наук. зб. 2004. Вип. 83. С. 227–236.

CONTRIBUTION OF PROFESSOR HEORHII OLEKSIIOVYCH KUDRIAVTSEV TO THE FORMATION AND DEVELOPMENT OF VETERINARY SCIENCE IN UKRAINE

Busol V. O., Kovalenko L. V., Vovk D. V.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

The article describes the stages of life, directions and results of scientific research of the second director of the NSC “IECVM” (1924–1926), doctor of veterinary sciences, professor, corresponding member of the Academy of Sciences of the Uzbek SSR Heorhii Oleksiiovych Kudriavtsev in the context of his contribution to the formation and development of veterinary science in Ukraine

Keywords: *history of science, leukology, repression*

ЗМІСТ

1. ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ ТА БІОЗАХИСТУ. ЕМЕРДЖЕНТНІ ІНФЕКЦІЇ

<i>Ткаченко С. В., Стегній Б. Т., Рула О. М., Музика Д. В.</i> ЦИРКУЛЯЦІЯ НЕТИПОВИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ГРИПУ ПІДТИПУ H13 СЕРЕД ДИКИХ ВОДОПЛАВНИХ ПТАХІВ	5
--	---

2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

<i>Рудова Н. Г., Солодянкін О. С.</i> БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ОСНОВНИХ ГЕНІВ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ (GAG, ENV, POL)	11
---	----

<i>Завгородній А. І., Білушко В. В., Позмогова С. А., Калашник М. В., Бусол В. О.</i> ПРОБЛЕМИ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ	15
---	----

<i>Лиманська О. Ю.</i> ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ВІДКРИТИХ РАМОК ЗЧИТУВАННЯ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ Е СВИНІ ГЕНОТИПУ 3	19
---	----

<i>Балак О. К., Лиманська О. Ю.</i> СТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ ПРОТЕЇНІВ ВІДКРИТИХ РАМОК ЗЧИТУВАННЯ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ	26
---	----

<i>Балак О. К., Лиманська О. Ю.</i> ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ГЕНІВ ТА ПРОТЕЇНІВ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ	35
---	----

<i>Рубан В. О., Северин Р. В., Гонтарь А. М., Грінченко Д. В., Гарагуля Г. І., Баско С. О., Глущенко Я. В.</i> НОЗОЛОГІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ІНФЕКЦІЙ З РЕСПІРАТОРНИМ СИНДРОМОМ ТА З УРАЖЕННЯМ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ У КОТІВ У М. КРИВИЙ РІГ	43
--	----

3. ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

<i>Корнєйков О. М., Олешко А. Ю., Перфілова С. І., Горбатенко С. К.</i> ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІЧНОГО ПРОЯВУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В УКРАЇНІ	50
--	----

<i>Полюшко Д. П., Стегній Б. Т., Марченко Н. В., Болотін В. І.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ІЗОЛЯТІВ <i>LISTERIA</i> <i>MONOCYTOGENES</i> , ВИДІЛЕНИХ ВІД РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН В УКРАЇНІ	53
--	----

<i>Горбатенко С. К., Рудова Н. Г., Корнєйкова О. Б., Стегній М. Ю., Коваленко Л. В., Кузнецова О. В., Мягких Н. В.</i> ВИВЧЕННЯ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ТА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ ЗБУДНИКІВ ІМУНОДЕФІЦИТУ І СПУМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ	61
---	----

4. ЯКІСТЬ І БЕЗПЕЧНІСТЬ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА. ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНА ЕКСПЕРТИЗА. ВЕТЕРИНАРНА ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ТОКСИКОЛОГІЯ

- Музика Н. М., Майборода О. В., Ечкенко Р. В., Рула О. М.*
БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МОНИТОРИНГ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ
ПТИЦІ (КУРИ, ІНДИКИ) ТА КОМБІКОРМІВ ДЛЯ ЇХ ГОДІВЛІ В УКРАЇНІ 67
- Дубін Р. А., Палій А. П., Тодоров М. І., Коренєва Ж. Б.*
ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОДИНАМІКИ СПОЛУКИ ТРИАЗОЛІНОВОГО
РЯДУ ПРИ ВИРОЩУВАННІ ПЕРЕПЕЛІВ 72
- Кошевой В. І., Науменко С. В., Сергієнко В. Р.*
ОЦІНКА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ ЯК
ПОТЕНЦІЙНИХ ЗАСОБІВ КОРЕКЦІЇ ПАТОЛОГІЇ СТАТЕВОЇ СИСТЕМИ ТВАРИН 77

5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

- Колесников А. О., Стегній Б. Т.*
ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННОЇ ТА ІМУНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ СЕРІЙ ІНАКТИВОВАНОЇ ЕМУЛЬСОВАНОЇ
ВАКЦИНИ ПРОТИ ГЕМОФІЛЬОЗУ КУРЕЙ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ 82
- Рудь Ю. П., Залоїло О. В., Грициняк І. І., Буцацький Л. П.*
ДОСЛІДЖЕННЯ РЕПРОДУКЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО
ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ (IPNV) В УМОВАХ *IN VITRO* 91

6. ІМУНОЛОГІЯ ТА КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ

- Богач О. М., Коваленко Л. В., Палій А. П., Богач М. В.*
МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В КРОВІ
ПОРΟΣЯТ, ХВОРИХ НА ЕЙМЕРІОЗ І БАЛАНТИДИОЗ 95

7. ПАРАЗИТОЛОГІЯ

- Кіптенко А. В., Дунаєв Ю. К., Богач М. В., Богач Д. М.*
ПОШИРЕННЯ ЕКТО- ТА ЕНДОПАРАЗИТІВ
У КОТІВ ХАРКІВСЬКОГО РЕГІОНУ 101
- Стецько Т. І., Остап'юк А. Ю., Музика В. П., Періг Ж. М., Коцюмбас І. Я.*
ЕФЕКТИВНІСТЬ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ НІКАМАКС® ЗА ШТУЧНОГО
ІНФІКУВАННЯ КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ КОКЦИДІЯМИ РОДУ *EIMERIA* 104

8. ІСТОРІЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ НАУКИ

- Бусол В. О., Коваленко Л. В., Вовк Д. В.*
ВНЕСОК ПРОФЕСОРА ГЕОРГІЯ ОЛЕКСІЙОВИЧА КУДРЯВЦЕВА
У СТАНОВЛЕННЯ ТА РОЗВИТОК ВЕТЕРИНАРНОЇ НАУКИ В УКРАЇНІ 113

CONTENTS

1. PROBLEMS OF BIOSAFETY AND BIOSECURITY. EMERGENT INFECTIONS

<i>Tkachenko S. V., Stegnyy B. T., Rula O. M., Muzyka D. V.</i> CIRCULATION OF ABNORMAL ISOLATES OF H13 SUBTYPE INFLUENZA VIRUS AMONG WILD WATER BIRDS	5
--	---

2. VETERINARY VIROLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Rudova N. G., Solodiankin O. S.</i> BIOINFORMATICS ANALYSIS OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS MAIN GENES (GAG, ENV, POL) SEQUENCES	11
--	----

<i>Zavgorodniy A. I., Bilushko V. V., Pozmogova S. A., Kalashnyk M. V., Busol V. O.</i> PROBLEMS IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS	15
---	----

<i>Lymanska O. Yu.</i> CHARACTERIZATION OF SWINE HEPATITIS E VIRUS GENOTYPE 3 OPEN READING FRAMES	19
---	----

<i>Balak O. K., Lymanska O. Yu.</i> STRUCTURAL ANALYSIS OF OPEN READING FRAMES OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS PROTEINS	26
--	----

<i>Balak O. K., Lymanska O. Yu.</i> CHARACTERIZATION OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS GENES AND PROTEINS	35
--	----

<i>Ruban V. O., Severyn R. V., Gontar' A. M., Grinchenko D. V., Garagulya H. I., Basko S. O., Glushchenko Y. V.</i> NOSOLOGICAL PROFILE OF INFECTIONS WITH RESPIRATORY SYNDROME AND INFECTION OF LYMPHOID ORGANS IN CATS IN KRYVIY RIH.....	43
---	----

3. EPIZOOTOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

<i>Kornieikov O. M., Oleshko A. Yu., Perfilova S. I., Gorbatenko S. K.</i> CHARACTERISTICS OF CLINICAL MANIFESTATION OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS IN UKRAINE.....	50
---	----

<i>Poliushko D. P., Stegnyy B. T., Marchenko N. V., Bolotin V. I.</i> MOLECULAR GENETIC STUDIES OF <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ISOLATES FROM DIFFERENT ANIMAL SPECIES IN UKRAINE	53
--	----

<i>Gorbatenko S. K., Rudova N. G., Kornieikova O. B., Stegnyy M. Yu., Kovalenko L. V., Kuznetsova O. V., Miahkykh N. V.</i> STUDY THE DISTRIBUTION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FIELD ISOLATES OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY AND SPUMAVIRUS INFECTION PATHOGENS	61
--	----

4. QUALITY AND SAFETY OF ANIMAL PRODUCTIONS. VETERINARY AND SANITARY EXPERTISE. VETERINARY PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

Muzyka N. M., Maiboroda O. V., Echkenko R. V., Rula O. M.
BACTERIOLOGICAL MONITORING OF POULTRY (CHICKENS,
TURKEYS) AND COMPOUND FEED FOR THEIR DIET IN UKRAINE 67

Dubin R. A., Paliy A. P., Todorov M. I., Koreneva Zh. B.
STUDY OF PHARMACODYNAMICS OF TRIAZOLINE
COMPOUNDS IN QUAIL GROWING 72

Koshevoy V. I., Naumenko S. V., Serhienko V. R.
ASSESSMENT OF ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF METAL
NANOPARTICLES AS POTENTIAL MEANS FOR THE CORRECTION
OF PATHOLOGIES ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM IN ANIMALS 77

5. BIOTECHNOLOGY

Kolesnikov A. O., Stegnyy B. T.
STUDY OF ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC ACTIVITY OF EXPERIMENTAL
SERIES OF INACTIVATED EMULSIFIED VACCINE AGAINST CHICKEN
HEMOPHILOSIS IN LABORATORY CONDITIONS 82

Rud Yu. P., Zaloilo O. V., Hrytsynyak I. I., Buchatskyi L. P.
STUDY OF *IN VITRO* REPRODUCTION OF INFECTIOUS
PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV) 91

6. IMMUNOLOGY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY

Bohach O. M., Kovalenko L. V., Paliy A. P., Bogach M. V.
MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN THE BLOOD
OF PIGLETS SUFFERING FROM EIMERIOSIS AND BALANTIDIOSIS 95

7. PARASITOLOGY

Kiptenko A. V., Dunaev Yu. K., Bogach M. V., Bohach D. M.
DISTRIBUTION OF ECTO- AND ENDOPARASITES
IN CATS OF KHARKIV REGION 101

Stetsko T. I., Ostapiuk A. Yu., Muzyka V. P., Perig Zh. M., Kotsyumbas I. Ya.
EFFICIENCY OF FEED ADDITIVE NIKAMAX® FOR ARTIFICIAL
INFECTION OF BROILER CHICKENS WITH *EIMERIA* SPP. 104

8. HISTORY OF VETERINARY SCIENCE

Busol V. O., Kovalenko L. V., Vovk D. V.
CONTRIBUTION OF PROFESSOR HEORHII OLEKSIIOVYCH
KUDRIAVTSEV TO THE FORMATION AND DEVELOPMENT
OF VETERINARY SCIENCE IN UKRAINE 113