

Видається з 1996 року

Засновник і видавець
Сумський національний аграрний
університет

Реєстраційне свідоцтво
КВ № 23689-13529 Р від 21.11.2018 р.

ВІСНИК СУМСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО АГРАРНОГО УНІВЕРСИТЕТУ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
Виходить 4 рази на рік.

Редакційна колегія серії

Шкромада О. І., доктор ветеринарних наук, доцент, редактор, Сумський національний аграрний університет (Україна)

Березовський А. В., доктор ветеринарних наук, професор Сумський національний аграрний університет (Україна)

Євстаф'єва В. О., доктор ветеринарних наук, професор, Полтавська державна аграрна академія (Україна)

Камбур М. Д., доктор ветеринарних наук, професор, Сумський національний аграрний університет (Україна)

Касіч В. Ю., доктор ветеринарних наук, професор Сумський національний аграрний університет (Україна)

Касяненко О. І., доктор ветеринарних наук, професор Сумський національний аграрний університет (Україна)

Нагорна Л. В., доктор ветеринарних наук, доцент Сумський національний аграрний університет (Україна)

Палій А. П., доктор ветеринарних наук, професор, ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (Україна)

Петров Р. В., доктор ветеринарних наук, професор Сумський національний аграрний університет (Україна)

Пеца-Кілб Ева, кандидат ветеринарних наук, Вроцлавський університет наук про довкілля та життя (Польща)

Ребенко Г. І., кандидат ветеринарних наук, доцент Сумський національний аграрний університет (Україна)

Сатторов Носирджон., доктор біологічних наук, доцент, Таджикська академія сільськогосподарських наук (Таджикистан)

Скляр О. І., доктор ветеринарних наук, професор Сумський національний аграрний університет (Україна)

Сурай П. Ф., доктор біологічних наук, професор (Великобританія);

Улько Л. Г., доктор ветеринарних наук, професор Сумський національний аграрний університет (Україна)

Фотіна Г. А., доктор ветеринарних наук, професор, Сумський національний аграрний університет (Україна)

Фотіна Т. І., доктор ветеринарних наук, професор, Сумський національний аграрний університет (Україна)

Серія "Ветеринарна медицина"
Випуск 1 (52), 2021

Maria Kambur, Andriy Zamazyi, Oleksandr Nechiporenko, Oleksandr Kalashnyk, Denis Matveychuk, Maksim Kalashnyk Effect of rheology of blood and haemostasis of the cows on the viability of the offspring and reproduction 3

Zhang Yu, Rebenko Halyna, Hu Jianhe, Zhang Shouping Development of a dual PCR method for detection of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* 12

Xueqin Zhao, Hanna Fotina, Lei Wang, Jianhe Hu The mechanism of antimicrobial peptide MPX against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in vitro 18

Красвський А. Й., Чекан О. М., Бондаренко І. В., Гребеник Н. П. Кордова кров та перспективи застосування її компонентів в практиці ветеринарної хірургії 25

Логвінова В. В. Оліяр А. В. Гістоархітектоніка лімфоїдних утворень слизової оболонки тонкого кишечника мускусних качок 31

Мирошніченко І. І., Жоріна Л. В. Вивчення відтворювальної здатності кролематок гібридних кросів при використанні штучного осіменіння у комплексі з гормонотерапією в умовах приватної кролеферми 38

Титух Я. В. Моніторинг різних форм маститу у господарствах Сумської області 45

Науковий журнал
«Вісник Сумського національного
аграрного університету.
Серія: ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА»
визнано фаховим виданням
Категорії «Б» в галузі ветеринарних
наук (наказ МОН України
від 24.09.2020 р. № 1188)

Науковий журнал «Вісник Сумського
національного аграрного університету»
індексується в Міжнародних
наукометричних базах Index
Scopeticus, PИHЦ

Матеріали журналу знаходяться у
вільному доступі на сайті
<https://snau.edu.ua>

Усі статті проходять процедуру
таємного рецензування. До публікації в
журналі не допускаються матеріали,
якщо є достатньо підстав вважати, що
вони є плагіатом.
Відповідальність за точність наведених
даних і цитат покладається на авторів.
Матеріали друкуються українською та
англійською мовами.
У разі цитування посилання на «Вісник
Сумського національного аграрного
університету» обов'язкове

Друкується згідно з рішенням
вченої ради
Сумського національного
аграрного університету
(Протокол № 9 від 29.03.2021 р.)
)

Адреса видавця та виготовлювача:
40021, м. Суми,
вул. Г. Кондратьєва, 160
Телефон: (0542)70-10-42
E-mail: visnyk.snau@gmail.com
<https://snau.edu.ua>

Тираж 300 пр.
Зам. № 3

© Сумський національний
аграрний університет, 2021

EFFECT OF RHEOLOGY OF BLOOD AND HAEMOSTASIS OF THE COWS ON THE VIABILITY OF THE OFFSPRING AND REPRODUCTION

Maria Kambur

Doctor of Veterinary Sciences, Professor
Sumy National Agrarian University, (Sumy, Ukraine)
ORCID: 0000-0002-4864-5292
mariia.kambur@snau.edu.ua

Andriy Zamazyi

Doctor of Veterinary Sciences, Professor
Poltava State Agrarian Academy, (Poltava, Ukraine)
ORCID: 0000-0003-3138-0424
ganavar@ukr.net

Oleksandr Nechyporenko

Doctor of Veterinary Sciences
Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)
ORCID: 0000-0002-9030-9719
oleksandr.nechyporenko@snau.edu.ua

Oleksandr Kalashnyk

PhD in Veterinary Sciences
Sumy National Agrarian University, (Sumy, Ukraine)
ORCID: 0000-0003-2354-3473
oleksandr.kalashnyk@snau.edu.ua

Denis Matveychuk

Sumy National Agrarian University, (Sumy, Ukraine)
ORCID: 0000-0003-4450-0851

Maksim Kalashnyk

Sumy National Agrarian University, (Sumy, Ukraine)
ORCID: 0000-0001-5637-2899
oleksandr.kalashnyk@snau.edu.ua

The Results of the studies indicate that in 45.44% of cows-the initial duration of the third period of genera was more than 9 hours, and in cows of the second - third lactation only in 27.28% of animals. Morphometry indicators of a body mass of newborns calves and placenta show the conditions of growth and development of fetal, which are connected with functional activity of the fetoplacental complex and on average, the body weight of the calves of the first subgroups (animals derived from cows with the duration of the third period of genera up to six hours) proved by 20.80%-21.20% more than the calves of the fourth subgroups. Below the mass proved and placenta of calves, fourth subgroups (in 1.25 by Times – 1.18 by Times, (P < 0.05), compared to this indicator of the first subgroups of calves. Increased activity of the factors of hemostasis and rheology of blood is set in animals in which the duration of time of the third period of genera was up to 12 and more hours. Under these conditions, the viscosity of animal blood in 1.39-1.40 by Times, (P < 0.05) and 1.30-1.40 by times (P < 0.05), the content of Fibrinogen in 2,47-2,04 by Times < 0.01). The given data indirectly indicate the increase of blood viscosity, reduction of its blood flow, especially in the capillary system vessels. In our opinion, this is the cause of the birth of animals with low viability as evidenced by the coefficients of the catabolism factor, oxygenic homeostasis, samples of Mack Klur Aldrich, "immature" surfactant system. Recovery of the reproductive function of cows after calving and duration service period in animals of the first subgroups was in 1.17 – 1.14 by times shorter than in cows of the fourth subgroups

Keywords: homeostasis, rheology, hemostasis, balance, vitality

DOI: <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.1>

Introduction. In the intensification of field of livestock, the decisive role of activation of the animal reproduction functions. In order to solve this problem, you are looking for new methods of prevention of obstetric and gynecological diseases of cows, getting of viable offspring with accounting for the complex analysis of causes for violation of reproductive function of animals (Ivashkiv R. M., 2009; Yabnskyi V. A., 2000). A number of researchers, believe (Kryshforova B. V., 2007, V. A. Yabloskyi, S. P. Khomych and etc., 2006), in the system of hematopoiesis

and hemostasis (Goryainova I.A., Medvedev I.N., 2005). It is important to provide the essential in hemostasis with thrombosis, which are the first to connect to this process and manifest their extremely important function – adhesion-aggregative (V.I. Maximov, I.N. Medvedev, 2008; Walker I., 2000).

Physiological changes in the system of hemostasis during pregnancy females – is the reaction of adapting the mother's body to compensatory expenses during fetal excretion and to possible blood loss during genera (Lisovenko V. M., 2014; Zamazyi A. A., Lisovenko V. M., 2014). The factors of hemostasis

participate in the preservation of liquid with a blood regulation of the trans-cap-ion exchange, resistance to vascular walls, influence the intensity of reparative processes (Zamaziy A. A., Kambur M. D., Lisovenko V. M., 2014). A large number of studies in humane medicine are devoted to studying Issues related to features of hemostasis during pregnancy females (Anastasyeva V.G., 2006; Mazurkevych A. Y., Karpovskyy v. I., Kambur M. D., Zamyziy A. A. etc., 2008). It is proved that (Tsinko T.F, 2007; Yurchenko L.N., Chereshev V.A., Gusev E.Y. etc., 2004) In the structure of reasons of violation of current in cows, development of tribal and post-tribal complications the placenta insufficiency plays a significant role. It is accompanied by vascular spasm with impaired perfusion of vital organs, which is developed in connection with the inconsistency of possibilities of adaptive systems of the maternal organism to respond to the needs of developing fetus. This Mismatch is realized due to changes in the system of hemostasis of the ionic organism and different stupas of perfusion-diffusion insufficiency of the placenta. Result and researches of a number of authors (Opal S.M, Esmon C.T., 2003; Hoffman M, Monroe DM. Coagulation, 2007). The above-mentioned question states that the violation of blood rheology, hemostasis system during pregnancy in cows is accompanied by impaired functional condition of the Feto-placental complex, character the flow of genera and the post-birth period. And the our authors indicate that in the conditions of increasing the capacity of blood supply increases the risk of the blood - embolic complications in the double during pregnancy and 5.5 times after the Paulogs (Markin L. B., Palyga I. E., 2004). They proved that the level of factor I (Fibrinogen) is increasing, which causes an increase in self - damage products of its degradation and factors VII-X. A Number of authors believe that (Prysyazhniuk V. P., 2009; Kayumova L.H., 2009) in the blood clotting system, changes in the growth and development of the fetus occur. Most of the authors indicate a higher blood clotting potential, especially in the last months of being. There is a slight increase in platelet adhesivity, decreased blood Anticoagulation potential, inhibition of fibrinolysis, however, according to other authors of the intravascular combustion of the blood does not occur. These changes contribute to Hemostasis, preventing blood loss in the mouth and the early postoperative period. Researchers believe that when examining issues related to After generic complications in cows it is impossible to take into account Indicators of hemostasis system (Chaikina M., 2008).

They believe that most postoperative complications in cows occur on the basis of weak contractions of the muscular structures of the uterus and depend on the intensity of thrombosis in the vessels of the placental system. Therefore, changes that occur in the system of hemostasis cannot be taken into account when predicting currents or other post-tribal pathology in females (Vink J.Y., 2006; V. A. Yabloskyi, S. P. Khomych and etc., 2006,). Low fibrinolytic activity, reduced blood burn time, low prothromb in time, and time recalcification of the blood plasma in high-performance cows suggest activation of coagulation and fibrinolytic systems in females, which are borne by the fruit. A number of researchers argue that during the growth and development of fetus in the mother, in the conditions of the physiological norms, conditions are formed for the wide spread internal coagulation of blood. This condition is accompanied by the increase in the general activity of the a huating potential, which is presented by the total activities of the factors of blood coagulation, the increase of platelet functional activity at the current. Also, there is a decrease in fibrinolytic activity in the increase of PPH

(product of dehydration fibrinogen), Decrease in activity of antithrombin deficiency III. These peculiarities of the changes in the system of Hemostasis are appropriate for the normal formation of the Feto-placental complex (Kambur M. D., Zamaziy A. A., Koleschko A V., Lermontov A. Yu., Butov O. V., 2018). However, when the requirements to the body of pregnant female dominate the possibilities of protective mechanisms, there is a change in the system of Hemostasis, rheology of Blood, which violate the function of the Feto- placental complex, lead to a violation of the conditions of fetal development, flow of genera and after the birth process, influence on life - bearing of the offspring and testifies to extraordinary **Actuality** of the given problem.

Materials and Research methods.

In order to conduct the planned researches by us in the conditions of the State scientific-research business of TV and Sumy Institute APV "Sad" were formed 2 groups of animals with 22 cows each. The first group of animals included heifers, and the second group – cows 2-3 lactation, at the end of the 7th month of growth and fetal development. During the calving, we conducted monitoring of the length of the family process in cows of the first and the second group, conducted blood sampling with a subcutaneous abdominal vein. Taken into account the duration of childbirth stages and depending on these indicators, animals were divided on subgroups depending on the duration of the sequential stage of genera. Before the first subgroups the cows were treated with duration of the rotary process up to 6 hours, second – from 6 to 9 hours, third – from 9 to 12 hours and to the fourth – more than 12 hours.

In samples blood determined rheological Properties- blood clotting rate, viscosity, thrombocyte (method of ovarian), retraction of blood clot, adhesion of platelets (by the method of Blacksmith), fibrin content (by a weight method), fibrinolysis (according to M. A. Kotovschikova, B. I. Kuznitka).

Using the device coagulometer ac 3002 Ortiz in the blood of animals determined the following indicators of platelet hemostasis: prothrombin time, prothrombin index, thrombin time, activated partially THROMBOPLASTIN time (APTT), fibrinogen content, platelet count (PLT), international normalized ratio (INR), hemoglobin (NGV), Hematocrit (NST), WBC count (WBC), RBC Count (RBC), RBC sedimentation rate (ESR).

The viability of calves determined the weight of the body at birth, the mass of placenta and investigated: – Maturity of the surfactant – alveolar system for the "foaming Test" of Climents (1990) and the test we suggested for "single modification" (A.A. Zamazyi, M. D. Kambur, 2009).

Indicator of oxygenation and acid -core homeostasis determined using analyzer blood gas Easy Blood JAS, Medica, (USA). The sampling of blood samples was carried out using a vacuum container for collecting blood in special test tubes with heparin and urgent on ice delivered for research to the laboratory. Over the next 5 days after the birth of calves determined their viability by the coefficient of Katbotalism and a sample of Mckluar Aldracha.

In the performance of experimental researches the international requirements of «The European Convention for the Protection of vertebrate animals used in the experimental and other scientific purposes» (Strasbourg, France, 1986) and the corresponding law of Ukraine « On the protection of animals from brutal treatment» No 3447-IV of 21.02.2006.

The resulting digital material is processed statistically by means of a computer program with the definition of arithmetic mean (m), statistical error of Arithmetic mean (m), Probability of difference (p) between the average arithmetic two variation series

According to the authenticity Criterion (t) and according to the Student tables. The difference between the two values considered probable in the $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$.

Results of the study and their discussions.

The results of the studies testify (table 1), that the length of the family process in cows-the firstborn and the animals of the second-third lactation is significantly different. In cows within the groups. There are also differences in the current of the family process. It was determined that the duration of the first stage of the

family process in cows in the first fruits was on average $66,10 \pm 4,20$ minutes. In the cows of the first group of the first subgroups this figure was 1.22 times less, and the animals of the second subgroups was at the level of average ($65,00 \pm 4,20$ min). Along with this, the duration of the first period of animals of the first group, the third and fourth subgroups was in 1,03-1,16 by Times more ($P < 0.05$) The average duration of the first period of the animal genera of this group.

Table 1

Duration of periods of the parturition process in cows-firstborn ($M \pm m$)

Indicators	I Group				The average
	to 6 hours (n=6)	to 9 hours (n=6)	to 12 hours (n=5)	more than 12 hours (n=5)	
Duration of the first period of parturition, min.	54,00±2,00	65,00±4,20	68,40±7,8	77,00±3,50	66,10±3,75
Duration of the second period of parturition, min.	58,20±5,10	66,30±4,20	74,70±5,40	79,00±4,00	69,55±4,50
Duration of the t period of parturition, min.	352,0±10,0	560,00±8,0	620,00±10	704,00±8,2	559,0±9,0
Duration of the third period of parturition, min.	446,20±5,66 7,74	691,30±10,47 11,52	763,10±7,73 12,72	860,00±11,23 14,33	690,15±10,00 11,50
% of the total number of animals	27,30	27,30	22,72	22,72	25,01

Note: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, in a compare with the cows of the sub-groups.

In cows 2-3 lactation (table. 2) the average duration of the first period of the Rotary process was only 1.05 by times shorter than the animals of the first group. Within the second group, in cows of the first subgroups, the duration of the first period of genera proved in 1.37 by times is shorter than the average animal of this group. In cows of the second and third subgroups, the second group, the first period of genera corresponded to from $68,00 \pm 5,00$ to $64,20 \pm 5,20$ min.

It should be noted that the duration of the second period of genera in the first group of cows was on average $69,55 \pm 4,50$ min, which practically corresponds to the average lower than of second-group cows ($68,80 \pm 3,95$ min). The most significant differences we have found in the animals of each group, but in the heifers of subgroups. In cows-firstborn, the first group, the first subgroups the second period of families lasted at 1.14, in 1,28, in 1.36 by times ($P < 0.05$) less than the animals of the second, third

and fourth subgroups. Such a picture, concerning the duration of the second period of our genera is set in the animals of the second group. In these animals the first subgroups, the second period of genera lasted in 1.52 1.48 1.09 the second, third and fourth subgroups cows ($p < 0.01$). The third period of genera in first group cows lasted, on average $8,42 \pm 0,36$ hours., and the second group's cows only $7,81 \pm 0,42$ H (1.08 by Times faster). In cows of the second group, the first subgroups, the duration of the third period of genera was at 1.07 by times, in cows of the second subgroups in 1.03 and the third subgroups in 1.14 by times in shorter than in the animals of the corresponding subgroups of the first group. The body weight of calves received from the second – third cows calving was 22.6 – 22.4% higher than that of calves received from first calving cows. On average, the body weight of the calves the first subgroups proved by 20.80% -21.20% more than the calves in the fourth subgroups.

Table 2

Duration of periods of the rotary process in cows of the second-third lactation ($M \pm m$)

Indicators	II Group				The average
	to 6 h (n=8)	to 9 h (n=8)	to 12 h (n=3)	More than 12 hours (n=3)	
Duration of the first period of parturition, min.	46,00±4,00	68,00±5,00	64,20±5,20	73,00±4,00	62,8±4,50
Duration of the second period of parturition, min.	54,00±3,00	59,20±4,10	79,80±5,20	82,20±3,40	68,8±3,40
Duration of the t period of parturition, min.	324,00±6,00	540,00±5,00	604,20±8,10	696,00±8,00	541,05±6,30
Duration of the third period of parturition, min.	424,00±14,33 7,07	661,20±14,70 11,02	748,20±12,40 12,47	851,20±9,40 14,19	671,15±10,02 11,19
% of the total number of animals	36,36	36,36	13,64	13,64	25,00
n	8	8	3	3	22,0

Note: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, in the compare with the cows of the subgroups.

The mass below proved and placenta of calves, fourth subgroups (in 1.25 by times – 1.18 by Times, ($P < 0.05$), compared with this indicator of the calves Pershix Rup. Appearance of placenta of newborn calves is also different. In terms of the duration of the third period of genera up to six hours, the vascular system is clearly defined in placenta (Fig 1).

At the same time, at extension of the third period of genera more than 12 hours the placenta has no clear picture of blood vessels, there are areas of inflammation, stagnation of blood (Fig. 2).



Fig 1. Appearance of placenta of newborn calves, the first subgroups.

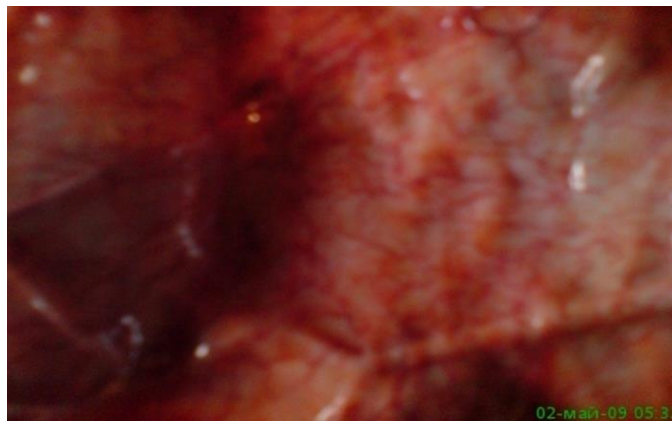


Fig. 2. Appearance of placenta of newborn calves received from cows with duration of the third period of genera more than 12 hours.

It is necessary to specify (table. 3) that in cows of both groups the blood viscosity increased according to the length of the family process. In cows that have 2-4 subgroups, the first group, blood viscosity proved probably more than the cows of the first subgroups (in 1.09, in 1.39 and 1.40 by Times, ($p < 0.05$)). In The research animals of the second group, second, third, and fourth subgroups, blood viscosity, also was the larger given indicator of the cows of the first subgroups in 1.07, 1.30 and 1.40 by

times ($P < 0.05$). Apart from this, it should not be noted that in the research animals of the first group, all sub-groups of blood viscosity were respectively in 1.03, at 1.05, in 1.10 and in 1.04 more than in the research cows of the second group. In our opinion, this indicator demonstrates the receipt of blood to the fetus from the maternal body of cows – the firstborn is slower than in cows of the second-third lactation.

Table 3

Properties of blood cows depending on the duration of the sequential stage of parturition ($M \pm m$)

Groups of animals/ n	Indicators					
	Blood viscosity, gr.	Blood coagulation rate, min.	Fibrinolysis, min.	Thrombophase, st.	Retraction Blood clot, %	Adhesion of platelets, %
First group cows						
I subgroup, n=6	5,02±0,16	402,00±5,00	5,02±0,76	4,14±0,12	48,30±1,20	39,24±1,32
II subgroup, n=6	5,48±0,24	386,00±4,00	5,90±0,54	4,86±0,10	48,40±1,50	40,22±1,54
III subgroup, n=5	6,92±0,26	354,00±5,00	6,30±0,40	5,60±0,05	51,20±1,44	40,68±1,46
IV subgroup, n=5	7,02±0,18	338,00±6,00	6,60±0,30	5,50±0,10	52,50±13,00	41,20±1,38
Second group cows						
I subgroup, n=8	4,88±0,14	414,00±5,00	4,80±0,50	4,00±0,15	48,20±2,02	38,40±2,02
II subgroup, n=8	5,24±0,26	394,00±4,00	5,70±0,62	4,00±0,08	49,10±1,96	38,80±1,96
III subgroup, n=3	6,32±0,22	376,00±4,00	6,20±0,48	4,20±0,10	50,40±1,34	39,60±1,20
IV subgroup, n=3	6,78±0,24	354,00±6,00	6,50±0,50	4,50±0,12	51,20±1,52	40,20±1,34

Note: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, in the comparison with the cows of the subgroups.

In research animals of the first group, the first subgroup, the speed of blood coagulation had the highest figure. In animals of the second-fourth subgroups, the first group, This process accelerated in 1.04, in 1.14 and in 1.19 by times ($P < 0.05$), and in the animals corresponding subgroups, the second group in 1.05,

in 1.10 and in 1.17 by times ($P < 0.05$) compared to the animals the first subgroups

Blood viscosity has the same dynamics with fibrinolysis. In the cows of the second, third and fourth subgroups, Fibrinolysis took place longer than the first subgroups in the animals in 1.18,

1.25, in 1.31 and in 1.19, in 1.29, in 1.35 by times ($P < 0.05$). The retractor was much higher than the resuscitation of blood clots and adhesion of platelets in cows in which the third period of genera lasted over 9 hours.

The results of the studies are shown in the table 4 shows that in the body of cows-firstborn. The activation of the factors of hemostasis is more active during the carrying of the fetus.

The results of the studies are shown in the table 4 shows that in the body of cows-firstborn. The activation of the factors of hemostasis is more active during the carrying of the fetus.

Thrombin time, is also an important indicator of blood clotting speed: the obtained data show that this indicator is shorter in the cows of the first group at 1.03, at 1.08, in 1.12 ($p < 0.05$), in 1.05 by times compared to the animals of the relevant subgroups, the second group.

Significant influence on blood viscosity, and accordingly on its movement on vessels has the content of fibrinogen. Increasing the length of the rotary process in cows is accompanied by an increase in blood fibrinogen. Thus, its blood content in the first subgroups of cows appeared in the 2,47-2,04 by Times ($p < 0.01$) less than those of the fourth subgroup animals.

Table 4

Results of the cows hemostasis with different duration of the third period of partuition ($M \pm m$)

Indicators	Hours			
	to 6 h (I subgroup,)	to 9 h (II subgroup)	to 12 h (III subgroup)	More than 12 hours (IV subgroup)
Prothrombin time, Sec	26,47±2,24	25,73±0,63	25,25±1,66	25,33±0,98
	27,20±1,40	26,10±0,70	27,90±2,30	26,96±0,94
Prothrombin Index, %	42,53±4,78	42,03±3,96	33,67±2,11	33,37±1,24
	44,40±2,20	43,08±2,84	36,96±1,24	35,42±2,02
Internationally Normalised ratio (INR), %	1,95±0,17	1,96±0,04	2,24±0,13	1,80±0,09
	1,98±0,22	2,02±0,14	2,28±0,16	2,20±0,10
Thrombin time, Sec	38,83±2,60	38,10±0,85	36,57±4,95	35,73±1,00
	39,94±2,40	40,96±0,73	40,82±3,16	37,46±2,23
Active partially Thrombin time, Sec	41,10±3,12	39,47±1,36	35,93±4,11	34,80±1,40
	42,40±2,20	41,04±1,94	36,42±2,12	35,94±2,12
Fibrinogen, gr/l	2,32±0,37	2,44±0,19	4,37±0,10	5,74±0,41
	2,02±0,	8,28±0,24	4,02±0,22	4,12±0,33

Note: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, in comparison with the cows of the first subgroups: numerator-cow-the firstborn; denominator – second-third lactation cows

These data indirectly indicate the increase of blood viscosity, reduction of its blood flow, especially in the capillary system vessels that cause placental insufficiency and adversely affects the growth and development of the fetus, and accordingly Birth of animals with low viability.

The data is obtained regarding erythrocytic and leukocyte

in cows with different childbirth duration (table 5) allow to assert activity of these processes in the organism of animals in the process of fetal bearing. However, the number of leukocytes and red blood cells in the blood of the first and second group cows is significantly different, which in our opinion indicates different levels of protective mechanisms of the body.

Table 5

Erythrocytic and leukocytic indicators for cows with different duration of general ($M \pm m$)

Indicators	Hours			
	Up to 6 hours (first subgroup)	Up to 9 hours (second subgroup)	Up to 12 hours (third subgroup)	More than 12 hours (fourth subgroup)
Leukocytes, g/L	14,60±0,35	18,50±1,98	16,80±2,10	17,33±2,10
	12,20±0,40	17,30±2,20	15,20±2,00	15,40±1,90
Erythrocyte sedimentation rate, mm/h	2,02±0,14	2,04±0,12	2,00±0,10	2,00±0,10
	2,42±0,22	2,20±0,10	2,18±0,12	2,02±0,14
RBCs, t/L	6,85±0,26	6,53±0,29	6,54±0,32	6,45±0,51
	6,96±0,34	6,88±0,18	6,92±0,22	7,02±0,24
Content hb, G/L	111,33±1,33	110,33±4,58	111,00±1,65	106,33±0,88
	118,20±2,00	116,30±3,20	115,40±2,20	110,00±2,00
Hematocrit, %	27,33±2,03	26,00±3,44	25,00±1,47	25,00±1,53
	26,32±2,02	25,00±2,00	26,02±1,92	26,00±1,50

Note: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, in comparison with the animals of the first subgroups; Numerator-and group, cow-firstborn; denominator- II group, cows of the second-third lactation.

It should be noted that regardless of the group in the cows with a continuation of the duration of the family process, the number of blood cells is reduced, which we associate with exhaustion of the processes of leukocyte and erythrocytic. The duration of the genitive process of the cow influenced the oxygen homeostasis of newborn calves (table 6).

Elongation of the family process for more than 9 hours in the cows of the third and fourth subgroups has a negative impact on the parameters of the oxygenic homeostasis of newborns. In newborn animals the pH of data was found at 2,30-2,85% and 1.04-2,53% less than the calves of the first subgroups, first and second group. This in our opinion demonstrates the acidotic displacement.

The partial pressure of CO₂ in the calf blood received from the cows of the second, third and fourth subgroups, the first group, was in 1.23, at 1.60, in 1.59 by times ($P < 0.01$), and in the calves corresponding subgroups, the second group in 1.18, at 1.57, in 1.56 by Times more ($P < 0.01$) than the calves of the first subgroups.

Such dynamics we have established and according to the index of blood carbon dioxide. In favor of our opinion, that lengthening the family process in cows causes an actangent shift in the body of the fetus, and is manifested in indicators of the oxygenic Newborns' homeostasis show data on the presence of animal blood.

Table 6

Oxygenic Homeostasis of newborn calves (M±m)

Calf groups/ n	Indicators					
	pH	PCO ₂ , mmHg	BE _s , mmol/L	BE ect, mmol/L	TCO ₂ , %	HCO ₃
First group calves:						
I subgroup, n=6	7,372±0,08	45,80±0,94	1,88±0,12	2,02±0,22	27,94±0,54	27,56±1,02±
II subgroup, n=6	7,264±0,06	56,60±0,80	1,36±0,16	1,84±0,18	32,06±0,96	27,94±0,96
III subgroup, n=5	7,206±0,11	73,40±0,75	1,86±0,18	0,52±0,08	32,16±0,78	28,36±0,82
IV subgroup, n=5	7,168±0,16	72,90±0,60	2,86±0,08	0,78±0,12	33,08±0,94	22,92±0,78
Second group calves:						
I subgroup, n=8	7,384±0,08	44,90±0,40	1,94±0,12	2,24±0,26	26,84±0,76	27,08±0,76
II subgroup, n=8	7,356±0,12	52,80±0,52	1,52±0,16	2,02±0,18	31,96±0,82	27,54±0,84
III subgroup, n=3	7,308±0,10	70,40±0,64	0,96±0,13	1,06±0,16	32,08±0,94	27,96±0,92
IV subgroup, n=3	7,202±0,12	71,20±0,36	1,78±0,16	0,54±0,08	32,12±0,72	29,06±0,68

Note: p<0,05; p<0,01; p<0,001, in comparison with calves before the first subgroups.

Thus, the first-to-fourth subgroups calves had a negative designation in the newborns' 1st and 3rd group. In calves of corresponding subgroups, the second group was also 0,96 ± 0,13 and - 1,78 ± 0,16 mmol/L.

On the negative impact of lengthening of the family process on the viability of the newborn calves (table 7), evidence of

"maturity" of the surfactant-alveolar lung system. Lengthening of the family process in cows of third-fourth subgroups, both groups, lowered the "maturity" of the newborn calves lungs and shows a violation of the organism's provision with oxygen.

Table 7

"Maturity" of the surfactant-alveolar system of newborn calves for "foam test" and "one expiratory test" (%)

Calf groups	"Foam Test"				"One exhalation test"			
	Negative		Positive		Negative		Positive	
	n	%	n	%	n	%	n	%
First group calves								
I subgroup, n=6	4	66,67	2	33,33	3	50,00	3	50,00
II subgroup, n=6	4	66,67	2	33,33	3	50,00	3	50,00
III subgroup, n=5	3	60,00	2	40,00	3	60,00	2	40,00
IV subgroup, n=5	3	60,00	2	40,00	1	20,00	4	80,00
Second group calves								
I subgroup, n=8	7	87,50	1	12,5	5	62,50	3	37,50
II subgroup, n=8	8	100,00	-	0	6	75,00	2	25,00
III subgroup, n=3	2	66,67	1	33,33	2	66,67	1	33,33
IV subgroup, n=3	2	66,67	1	33,33	1	33,33	2	66,67
Total	3	71,77	11	28,23	24	52,19	20	47,82

Note: p<0,05; p<0,01; p<0,001, in comparison with calves of the first subgroups.

Thus, by both tests, the positive characteristic is 40% of newborn calves, third subgroups, the first group and 50% of the calves of the third subgroups. Considerably fewer calves with "immature" MF are born in cows 2-3 lactation (animals of the Second research group).

Sample Indicators Mac Klyr Oldrich (table.8) newborn calves of third group – The fourth subgroups show violations of the fetal growth and development process, and consequently the viability of newborn animals.

Calves, that are derived from cows in which the generic

process continues higher physiological rate, on the first day of birth (Animals of the third-fourth subgroups) test Mac Klur Oldrichwasserving 1,10-1.15 by times faster than calves received from the cows of the first subgroups, the first group. At calves from the second group's cows, the first subgroups, the fisolution resorption process lasted at 1.03, in 1.05 and 1.15 by times (P < 0.05) longer than the calves of the second-fourth subgroups. At 3 and 4 days of living in calves of the third-fourth sub-group, the MCP Aldrich is less than the calves received from the first subgroups.

Table 8

Sample indicators Mack Klur Aldrich calves (M±m, min)

Calf groups	Test Mac Klur Aldrich on		
	1st day	3d day	5th Day
First group calves			
- I subgroup, n=6	57,60±0,80	58,20±1,00	58,60±0,90
- II subgroup, n=6	56,40±0,90	57,60±1,20	58,20±1,00
- III subgroup, n=5	52,20±1,10	52,40±0,90	52,80±1,00
- IV subgroup, n=5	50,30±0,70	50,50 ±0,90	50,40±0,80
Second group calves			
- I subgroup, n=8	60,20±1,02	61,60±1,10	62,10±0,90
- II subgroup, n=8	58,40±1,10	59,30±0,80	60,00±1,00
- III subgroup, n=3	57,60±0,80	58,00±1,04	57,80±0,60
- IV subgroup, n=3	52,40±0,80	52,60 ±0,90	52,20±0,80

Note: P < 0.05; P < 0.01; P < 0,001, compared to calves before the first subgroups.

In our opinion, this is also an indicator of fetal underdevelopment, associated with the conditions of formation of fetoplacental complex and providing the fetus with nutrients and Oxygen. On interrelation of prenatal fetal development and one hundred of new born calves (table 9) indicators of catabolism coefficient are showed.

The calves of the first subgroups present the figure from the first to the fifth day of life decreases in 1,10-1.11 by Times ($P < 0.05$), What testifies to the anabolism processes in the organism of others. In calves of the third and fourth subgroups, the coefficient of catabolism on the third day is practically identical to the indicator of the first day. That is, in the body of animal data for the third day, the first of the process of catabolism is preserved,

and on the fifth day this coefficient It turns out only in 1,05-1.04 by Times less, This indicator of the first day of life of calves.

In our opinion, this is also an indirect indicator of the conditions of growth and development of the fetus, which in the higher degree depends on the efficiency of the functioning of the blood fetus system, matching DNA and nutrients and oxygen. You must specify the following. The duration of the family process of cows was reflected on restoration of the reproduction function of cows after calving (table 10). Thus, the violation of the third period of genera resulted in a delay of the litter of 4 cows of the first group (18.18%) And in one animal of the second group (4.35%). Ill with endometritis 18.18% of cows-the firstborn and 9.10% of the cows of the second-third lactation.

Table 9

The coefficient of catabolism of newborns and neonate period of calves(M±m)

Calf groups	The coefficient of catabolism		
	1st day	3d day	5th Day
First group calves			
- I subgroup, n=6	0,990±0,15	0,972±0,22	0,904±0,12
- II subgroup, n=6	0,996±0,18	0,986±0,18	0,916±0,18
- III subgroup, n=5	1,020±0,16	1,010±0,25	0,090±0,22
- IV subgroup, n=5	1,030±0,20	1,010 ±0,20	0,986±0,20
Second group calves			
- I subgroup, n=8	0,980±0,22	0,970±0,20	0,980±0,15
- II subgroup, n=8	0,996±0,30	0,980±0,15	0,960±0,20
- III subgroup, n=3	1,040±0,20	1,030±0,20	0,996±0,18
- IV subgroup, n=3	1,036±0,18	1,024 ±0,10	0,998±0,24

Note: $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0,001$, compared to calves before the first sub-groups.

The duration of allocation of elements in the research animals of the first group ranged and found itself in cows of the second subgroups in 1.11, by Times, the third subgroups in 1.28, the fourth subgroups in 1.32 by times longer than the animals of the first subgroups ($P < 0.05$). The animals of the second group within the subgroup are set as follows: In cows the first subgroups duration The fourth subgroups ($P < 0.05$). At the same time, the comparison of the time of isolation of the elements in cows of the first and second group, within the subgroups, testifies, however that in cows of the first group the process took place in 1.04, in

1.17, in 1.13 and in 1.10 by Times longer ($P < 0.05$). We set a similar dynamics regarding the yellow body lysis. On average lysis of yellow bodies in the first group's cows took up $24,6 \pm 2,00$ days, which is 1.11 by times longer than the second group's cows. The above-mentioned processes influenced the time of the first cows insemination. The first group of cows the process took place on average $88,00 \pm 2,00$ day after calving and was on $8,00 \pm 1,00$ days longer than in cows of the second group. Effective insemination of first-group cows on average, took place in 1.10 by times ($P < 0.05$) later than the second group cows.

Table 10

Indicators of reproductive function of cows after calving (M±m), days

Groups of Animals	Litter delay, goal	Ill at endometritis, goal	Duration of allocation of lohy	Yellow Body Lysis	Time from calving to first insemination	Service-Period
First group calves						
I підгрупа, n=6	-	-	19,06±1,20	21,40±1,20	81,00±2,0	103,00±4,0
II підгрупа, n=6	-	1	21,20±2,30	23,80±1,06	86,00±1,0	116,00±2,0
-III підгрупа, n=5	2	1	24,40±2,20	26,20±1,10	92,00±3,0	120,00±2,0
IV підгрупа, n=5	2	2	25,10±4,05	27,00±1,00	93,00±2,0	121,00±2,0
Second group cows						
I підгрупа, n=8	-	-	18,40±2,40	20,10±2,05	78,00±2,0	98,00±1,0
II підгрупа, n=8	-	-	18,10±2,35	20,90±2,00	79,00±1,0	100,00±1,0
III підгрупа, n=3	-	1	21,60±3,10	22,40±1,20	81,00±3,0	108,00±3,0
IV підгрупа, n=3	1	1	22,80±2,40	25,60±1,40	86,00±2,0	112,00±2,0

Conclusions.

1. In 45.44% of first-born cows the duration of the third period of genera was more than 9 hours, and in cows of the second – the third lactation only 27.28% of animals.

2. The body weight of calves received from the second-third calving cows was 22.6 – 22.4% more than the calves received from first calving cows. On average, the body weight of the calves the first subgroups proved by 20.80%-21.20% more than the calves in the fourth subgroups. Below the mass proved and placenta of calves, fourth subgroups (in 1.25 by Times – 1.18 by Times, ($P < 0.05$), compared to this indicator of the first subgroups of calves.

3. In cows-2-4 subgroups, the first group, blood viscosity proved probably more than the cows of the first subgroups (in 1.09, in 1.39 and 1.40 by Times, ($P < 0.05$), and in the research animals of the second group, second, third and fourth subgroups blood viscosity was greater Of the first subgroups cows (1.07, 1.30 and 1.40 in by Times, ($P < 0.05$).

4. Increasing length of the rotary process in cows is accompanied by an increase in fibrinogen content in the blood in 2,47-2,04 by times ($p < 0.01$).

5. The increase in length of the genitive process in cows causes an actangent displacement in the fetus and manifests it-

self in the indicators of oxygenic homeostasis, maturity of the surfactant lung system, and the decreased viability level of the newborn calves.

6. Duration of the family process negatively plunged to

restore the reproductive function of the cows after the calving and service – period in animals of the first subgroups was in 1.17 – 1.14 by times shorter than in the cows of the fourth subgroups.

References:

1. Ivashkiv, R.M., Kidla, I.M., Dubinyak L. (2009). Estimation of the status of reproduction of high-performance cows according to the results of obstetric clinical examination. *Scientific Bulletin of the Lviv State Academy of Veterinary Medicine. S. Gzhitsky*, 11, 2, 84 – 90.
2. Yabnskyi, V. A. (2000). Problems of reproduction of animals at the turn of of XXI century. *Scientific Herald of the National Agrarian University*, 22, 16 – 21.
3. Kryshchuk, B.V., Lemeschenko, V.V., Zmyslia, Zh.G. (2007). Biological bases of veterinary neonatology. "Terra Tavrika", 368.
4. Yabloskyi, V. A., Khomych, S. P., Kalinowski, G. M., Haruta, G.M., Kharenko, M. I., Zavijuha, V. I., Lyubetskoy V. (2006). Veterinary obstetrics, gynecologists and biotechnology of reproduction of animals with the basics of andrology. Tutorial. Vinnitca.: Newbook, 592.
5. Goryainova I.A., Medvedev I.N., S.Y. (2005). Thrombocytic dysfunctions in newborn calves. M., 130.
6. Maximov, V.I., Medvedev, I.N. (2008). Evaluation of platelet functions of calves and piglets in early ontogenesis, 11, 50-54.
7. Walker I. (2000). Thrombophilia in pregnancy. *J Clin. Pathol* / I. Walker, – 580 pp.
8. Lisovenko, V. M. (2014). Coagulogram blood cows at the end of the second in the early third period of tivity. *Physiology of animals*, 6, 35, 27-29.
9. Zamazyi, A. A., Lisovenko, V. M. (2014). Thrombotic hemostasis of cows in the second period of the tiality. *Physiology of animals*, 1, 34, 25-27. DOI: <https://doi.org/10.32819/2018.63009>
10. Zamazyi, A. A., Kambur, M. D., Lisovenko, V. M. (2014). Physiological properties of blood of the cows of the titic. *Physiology of animals*, 1, 34, 25-27. DOI: <https://doi.org/10.31890/vtpp.2019.04.17>
11. Anastasyeva V.G. (2006). Delayed fetal development - Novosibirsk, 161 pp.
12. Mazurkevych, A. Y., Karpovskyy, V. I., Kambur, M. D., Zamyziy, A. A. (2008). Physiology of animals. Tutorial. Vinnitca: New book, 424.
13. Tsinko, T.F., Romanovsky, V.E. (2007). Blood is an indicator of health. Phoenix, 192
14. Yurchenko L.N., Chereshev, V.A., Gusev, E.Y. (2004). Systemic inflammation and hemostasis system in obstetric pathology. Ekaterinburg: URO RAS, 200
15. Prysyzhniuk, V. P. (2009). State of maternal-fetal circulation and correction of its disorders with the delay in fetal growth: Dis. Candidate Med. Sciences: K., 206
16. Opal S.M, Esmo C.T. (2003). Bench-to-bedside review: functional relations hips between coagulation and their nateimmun eresponse and the irrespective role sinthepathogene sis of sepsis. *Crit Care* 7(1), 23-38.
17. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation (2007): A modern view of hemostasis. *Hemato Oncol Clin North Am.*, 21(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2006.11.004>
18. Markin, L. B., Palyga, I. E. (2004). Technology of help in chronic prenatal hypoxia. *Practical medicine*, 3, 24 – 27. DOI: 10.1161/circresaha.110.221259
19. Prysyzhniuk V. P. (2009). State of maternal-fetal circulation and correction of its disorders with the delay in fetal growth: Dis. Candidate Med. Sciences: K., 206.
20. Kayumova L.H., (2009). Hemostasis in physiological and complicated gestosis of pregnancy. *Med. Almanac*, 4, 63-66.
21. Chaikina M. (2008). Pritic miscarriage: developmental factors and features of therapy. *Medical aspects of a woman's health*, 5 (14), 10-12.
22. Vink, J.Y., Poggi, S.H. (2006). Amniotic fluid in dexand birth weight: istherearelalation ship in diabetics with poorglucemic control. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 195 (3), 848 – 850. doi: 10.1016/s0002-9378(00)70343-7.
23. Vereina N.K., Sinityn S.P., Chulkov V.S. (2012). Dynamics of hemostasis indicators in physiologically occurring pregnancy. *Clinical laboratory diagnostics*, 2, 43-45.
24. Kambur, M. D., Zamazyi, A. A., Koleschko, A V., Lermontov, A. Yu., Butov, O. V. (2018). Properties of blood cows during the period of their being, their influence on reproductive function of animals and viability of newborn calves. Budapest, Vengryya. *Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences*, VI (17), Issue: 157, 26-29.
25. Glagoleva T.I., Zavalishina, S.Yu. (2017). Aggregative Activity of Basis Regular Blood Elements and Vascular Disaggregating Control oven It in Calves of Milk-vegetable Nutrition. *Annual Research s Revier in Biology*, 12 (6), 1-7. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/33767>
26. Tkacheva, E. S., Zavalishina, S.Yu. (2018). Physiological features of platelet aggregation in newborn piglets. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 9, 5, 36-42 DOI: [10.31588/2413-4201-1883-239-3-61-68](https://doi.org/10.31588/2413-4201-1883-239-3-61-68)
27. Kambur, M. D., Zamazii, A. A., Ostapenko, S. V. (2016). Dynamics of hemostasis indicators in cows in dry period. *Biology of animals*, 18, 4, 149-154.

Камбур М. Д., д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна),

Замазій А. А., д.вет.н., професор, Полтавська державна аграрна академія (Полтава, Україна)

Нечипоренко, д.вет.н., доцент, Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна)

Калашник О. М., к.вет.н., доцент, Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна)

Матвейчук Д. аспірант, Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна)

Калашник М. аспірант, Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна)

Вплив реології крові та гемостазу корів на життєздатність приплоду та розмноження

Результати проведених досліджень свідчать, що у 45,44 % корів - первісток тривалість третього періоду родів була більше 9 годин, а у корів другої – третьої лактації лише у 27,28 % тварин. Морфометричні показники маси тіла новонароджених телят та плаценти свідчать про умови росту та розвитку плоду, які пов'язані з функціональною активністю фето-плацентарного комплексу і проявляються у телят після народження. У середньому, маса тіла телят перших підгруп (тварини отримані від корів з тривалістю третього періоду родів до шести годин) виявилась на 20,80 % - 21,20 % більше, ніж у телят четвертих підгруп. Нижче за масою виявилась і плацента телят, четвертих підгруп (в 1,25 рази – 1,18 рази, ($p < 0,05$), у порівнянні з даним показником телят перших підгруп. Підвищення активності факторів гемостазу та реології крові встановлена у тварин у яких тривалість часу третього періоду родів становила до 12 та більше годин. За цих умов підвищується в'язкість крові тварин в 1,39 - 1,40 рази, ($p < 0,05$) та в 1,30 - 1,40 рази ($p < 0,05$), вміст фібриногену в 2,47-2,04 рази ($p < 0,01$). Наведені дані опосередковано свідчать про підвищення в'язкості крові, зниження його кровотоку, особливо по судинам капілярної системи. На нашу думку, це є причиною народження тварин з низькою життєздатністю про що свідчать показники коефіцієнту катаболізму, оксигенового гемостазу, проби Мак Клюр Олдріча, «незріла» сурфактантна система легень. Відновлення репродуктивної функції корів після отелу і тривалість сервіс – період у тварин перших підгруп була в 1,17 – 1,14 рази коротше, ніж у корів четвертих підгруп.

Ключові слова: гемостаз, реологія, гемостаз, баланс, життєздатність

DEVELOPMENT OF A DUAL PCR METHOD FOR DETECTION OF PASTEURELLA MULTOCIDA AND HAEMOPHILUS PARASUIS

Zhang Yu

Veterinary Medicine Student of the Joint Master's Degree Program
Henan Institute of Science and Technology of China and Sumy National Agrarian University of Ukraine
ORCID: 0000-0002-4848-8063
3131438211@qq.com

Rebenko Halyna

PhD in Veterinary Sciences, Associated Professor
Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)
ORCID: 0000-0002-1884-4901
rebenko.halina@gmail.com

Hu Jianhe

Professor
Henan Institute of Science and Technology (Henan, China)
ORCID: 0000-0002-6768-0851
xxjianhe@126.com

Zhang Shouping

PhD
Henan Institute of Science and Technology (Henan, China)
ORCID: 0000-0003-1774-1924

Pasteurella multocida and *Haemophilus parasuis* are the main pathogens of porcine respiratory disease syndrome, and often are the common pathogens of porcine pulmonary disease in collectivized pig farms. It has brought great influence on the pig industry and seriously hampered the healthy development of pigs. Therefore, the rapid detection method for *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* is the key to its successful prevention and control. In the process of diagnosis, we need to conduct laboratory tests for confirming of preliminary diagnosis, that can be made based on the history, clinical symptoms, pathological changes of necropsy and epidemiological characteristics of the disease. Traditional diagnostic techniques, such as bacterial isolation and immunological test, are time-consuming and laborious, and are not suitable for rapid clinical diagnosis, nor for large-scale epidemiological investigation. Therefore, it is necessary to establish an accurate and rapid method to identify the two common respiratory pathogens in pigs.

In this paper, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* were used as research objects to establish a dual PCR detection method. The main research contents are as follows: A dual PCR assay was established to detect *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* simultaneously. By using *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* specific primers, and adjusting primer concentration and annealing temperature, a dual PCR method for detecting *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* was established.

The rapid detection method for *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* established in this study has high specificity and sensitivity, and can realize rapid and accurate identification of pathogenic bacteria in a relatively short period of time, providing a new technical means for rapid detection in clinical and grassroots laboratories.

Keywords: *Pasteurella multocida*; *Haemophilus parasuis*; Double PCR; Detection

DOI: <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.2>

Introduction

Pasteurella multocida disease is an infectious disease caused by *Pasteurella* bacteria, which can be transmitted between the same or different animals. In the past, it has been called *Pasteurella multocida* by the names of the animals that infect it, horse, cow, sheep, poultry, rabbit, and later collectively. Acute manifestations in animals are characterized by septicemia and hemorrhagic inflammation of tissues and organs, also known as hemorrhagic septicemia. (Starkey, S.R. & Donnelly, T.M., 2012). Chronic type is often manifested as suppurative lesions in various organs, which are often mixed with other pathogens or secondary infections. The disease is widespread in countries around the world, with tropical and subtropical countries most affected. Swine pasteurellosis, also known as pulmonary disease of Swine, commonly known as "laryngitis" or "distemper of the neck", is an important infectious disease caused by *Pasteurella multocida* (PM), which often resided in the upper respiratory tract

of pigs. The disease is mainly caused by temperature disorders, decreased resistance, poor growth environment and extreme weather. Severe pig sitting position mouth breathing, causing pneumonia, dyspnea.

Haemophilosis, also known as Glesser's disease, is caused by *Haemophilus parasuis* (HPS) or *Glaeserella parasuis* (Lin, Wei-Hao, Shih, Hsing-Chun, Lin, Chuen-Fu, Yang, Cheng-Yao, Lin, Chao-Nan & Chiou, Ming-Tang., 2019).

It is a kind of symbiotic bacteria in the upper respiratory tract of pigs, which invades the body when the resistance of pigs is low (Li J Y, Zhang J M, Xu C G, et al. ,2010; Si Z S, Wang G Y. 2011; Rebenko, H. (2014), Ni, Hong-Bo, Gong, Qing-Long, Zhao, Quan, Li, Xiao-Yue, Zhang, Xiao-Xuan. (2020). It often causes serous or fibrinous multiple serositis, arthritis, meningitis, high fever, respiratory disorders and other symptoms in pigs, which can lead to death in severe cases. At present, in *Pasteur* bacteria

genera, deputy haemophilus taxonomic position remain uncertain, it is because it with other haemophilus species lack of nucleic acid homology between vice pigs and haemophilus strain between the presence of large amounts of heterologous gene, researchers put forward, in vice pig haemophilus has confirmed there is more than one category of bacteria (Ma, Lina, Wang, Liyan, Chu, Yuefeng, Li, Xuerui, Cui, Yujun, Chen, Shengli, Zhou, Jianhua, Li, Chunling, Lu, Zhongxin, Liu, Jixing & Liu, Yongsheng., 2016). HPS requires special conditions to enter the animal body and lead to the outbreak of systemic disease. Normally, the pathogen can cause Glaser's disease, which is characterized by meningitis, arthritis and multiple serositis. Both bacteria can cause fever, dyspnea, cough, swelling of the joints, and similar pathological changes such as bleeding and cellulose exudate in the lungs of pigs. Although the disease can occur in any season of the year, the incidence is higher in spring, fall and winter than in summer. Once clinical symptoms appear, high dose antibiotics should be applied in time for treatment, and prophylactic drugs should be given to the whole group of pigs. According to the local epidemic situation, the pig farm should do a good job of immune prevention, strengthen feeding management and reduce stress response (Nedbalcova, Katerina, Satran, P., Jaglic, Zoran, Ondriasova, R. & Kucerova, Z., 2018).

Pm should pay attention to the disease difference with swine erysipelas, swine fever, swine flu, these belong to infectious diseases, and can make sick pigs high temperature rising to a certain extent, waste and loss of appetite, and the symptom such as bleeding, but ensure that swine flu will only lead to the pig infection occurs, the other animals not infection occurs, and the disease is seasonal, generally has the very high incidence in winter, but the mortality rate is low; Swine fever is usually also a pig with susceptibility, and the prevalence of a wide range, but will not lead to salivation, throat swelling, the body will not be sitting or lying dog posture; Swine erysipelas can cause septic disease, and only cannot lie down, the throat will not swell, and will not be a dog sitting or lying posture. Through the above differences to identify, timely and effective symptomatic treatment, to ensure the cure rate. HPS attention and streptococcal disease, infectious pleural pneumonia differential diagnosis. Arthritis, hocks, swelling of wrist joints, severe pain, limp leg caused by *Haemophilus parasuis*, a pinch with the hand, pain scream; There was a serous fibrin exudate in the articular cavity. Pericardial effusion, serous fibrinous pleurisy, and pericarditis. The surface of the lung is covered with a pale yellow serous fibrous membrane. On section, there are focal dark red congested areas. Streptococcal arthritis caused by swelling joints, early hard, temperature rise, later soft, touch the feeling of fluctuation, acupuncture flow pus; A few hardened and thickened skin; At necropsy, synovial fluid is turbid, with yellowish-white cheesy mass, subcutaneous colloid edema around the joints, and suppurative necrosis foci, and necrosis of articular cartilage in severe cases. The disease is easily confused with infectious pleural pneumonia, but most of the lesions caused by this disease are meningitis, arthritis and claudication, while infectious pleural pneumonia is less common. Diagnostic disease is confirmed by clinical examination, necropsy, and laboratory examination. In this study, a double-layer PCR method for detecting PM and HPS was established based on laboratory detection to realize rapid and efficient diagnosis.

Literature Review

In recent years, these two diseases have caused great economic losses to the pig industry (Zhang Bin, Tang Chen, Liao Ming, et al., 2014, Cardoso-Toset F, Gómez-Laguna J, Callejo M, et al., 2013). Although there are conventional PCR methods for

the detection of these two diseases, there are problems such as cumbersome operation and long time consuming in practical application. Therefore, an efficient, rapid and accurate detection method can save more time for subsequent treatment and prevention and control, and minimize economic losses to the greatest extent (Liang Q, Yang B, Yong S L, et al., 2018, Zhang Y, Li J, Li W J, et al., 2017).

Multiple PCR technology is a method of simultaneously amplifying multiple nucleic acid fragments by adding two or more pairs of primers in the same PCR amplification system. A single multiple PCR can identify and detect pathogens at the same time. It has unique advantages and high practical value in the differential diagnosis of clinical mixed infections Moriy, Nagamine K, Tomita N, et al, 2010; Malorny B, Tassios P T, Radstrom P, et al, 2003). In this experiment, a dual PCR method was established for the identification of *Pasteurella polycida* and *Haemophilus parasuis* from swine samples at one time. Compared with the traditional bacteriological detection method, it was simple, rapid and accurate.

1 Materials

1.1 All strains

Escherichia coli, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* was presented by Ms. Wang Lirong. *Haemophilus parasuis* was donated by Mr. Ding Ke of Henan University of Science and Technology.

1.2 Main reagents and instruments

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and DL-2000 Marker, both purchased from Sangon Bioengineering (Shanghai) Co, Ltd.; Trypsin soybean agar (TSA) and Trypsin soybean broth (TSB) medium were purchased from Oxoid Company in the United States. Bacterial DNA extraction kit, TaqDNA polymerase, Proteinase K, Primer Star DNA polymerase, gel recovery kit, plasmid extraction kit, pMD-19 plasmid and gel recovery kit were all purchased from Takara Biological Company.

2 Methods

2.1 Medium preparation

TSA solid medium: 40 g trypan Soy Agar (TSA) was accurately weighed, 940 mL purified water was added, fully shaken, heated to dissolve, autoclave sterilization at 121°C for 15 min, and 50 mL filtered and sterilized veal serum and 10 mL 0.01%NAD were added.

TSB liquid culture medium: accurately weigh 30 g trypan Soy Broth (TSB), add 940 mL of purified water, shake well and autoclave at 121°C for 15min, add 50 mL of filtered and sterilized calf serum and 10 mL of 0.01%NAD.

Blood agar plate: 30 g of nutrient agar was accurately weighed and dissolved in 890 mL of purified water. After fully shaken, it was autoclaved at 121.0 °C for 15 min, cooled to about 45°C, and 100 mL of fresh anticoagulant sheep blood and 0.01%NAD 10 mL of cross sterilization rate were added. After fully shaken, it was poured into plate.

0.01% nicotinamide adenine dinucleotide (NAD): accurately weighed 5 mg NAD, dissolved in 50mL pure water, filtered and sterilized.

2.2 Bacterial culture

Pasteurella multocida was activated on TSA solid medium at 37 °C, then transferred to TSB liquid medium, cultured at 37 °C for 18 h, and stored at 4 °C for later use.

The culture of *Haemophilus parasuis* is more difficult than that of *Pasteurelli*, so it needs to be activated on blood AGAR plate, then transferred to TSB liquid medium for culture at 37 °C

for 24 h, and stored at 4 °C for later use.

2.3 Primer design and synthesis

According to the gene sequences registered in GenBank,

Primer 5 software was used to design specific primers for the conserved regions of these three pathogens, and the modified primers were synthesized in Sangon Bioengineering (Shanghai) Co., Ltd.

Table 1

Sequences of primers

Name		Sequence(5'-3')	Amplicon size/bp
<i>Pasteurella multocida</i>	F'	AGATCCTGGCTCAGATTGAACG	485
	R'	CTCTGTAATTAACGTCAATGATGCC	
<i>Haemophilus parasuis</i>	F'	AAAATGGGCGAAATGGTG	339
	R'	TGCGTGTCTGGTGTATCTAA	

2.4 Extraction of bacterial DNA

The TAKARA bacterial DNA extraction kit was used for the operation. See Annex A for the steps.

2.5 Determination of DNA content

After preheating for 30 min, the ultrafine rapid nucleic acid protein analyzer UV-1800 was used to proofread the spectrum, adjust the wavelength to 750nm, correct the baseline, rinse the colorimetric dish with ultrapure water, add 50µL TE buffer as blank control, and the rest were samples to be tested (sample was diluted with TE buffer 50 times), read the absorbance value, and calculate the DNA content by the formula. DNA content = $(1.45 \times OD_{280}) / (0.78 \times OD_{260})$. When the calculated value is greater than 1.9, it indicates that there is RNA contamination in the sample to be tested. When the calculated value is less than 1.6, it indicates that there is protein and phenol contamination in the sample to be tested.

2.6 Optimization of dual PCR amplification conditions

Gradient PCR apparatus was used for amplification. In order to screen the optimal PCR amplification conditions, genomic DNA of PM and HPS was used as the template for PCR, and six PCR annealing temperatures were set in the experiment, which were 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C and 58°C, respectively. PCR reaction system: 20µL system, DNA Taq enzyme 10µL, upper and lower primers 0.5µL each, DNA template 2µL, DEPC water 7µL; The PCR reaction conditions were as follows: pre-denaturation at 95°C for 5min, denaturation at 95°C for 30s, annealing at 53-58°C for 30s, extension at 72°C for 60s, a total of 30 cycles. Finally, it was extended at 72.0 °C for 10 min and stored at 4°C. The reaction products were detected by 1.5% AGAR gel electrophoresis. The annealing temperature of double PCR was optimized.

2.7 Specificity Verification

In order to further verify the test set up double PCR specificity, on purpose strain and *E. coli*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* DNA as a template, while adding several kinds of primers, using the optimized dual PCR reaction conditions for PCR amplification, reaction products with 1.5% AGAR gel electrophoresis detection.

3 Results and analysis

3.1 Optimization results of reaction conditions

The reaction system in the EP tube was centrifugally mixed, and the reaction amplification was carried out using PCR instrument. After verification at different annealing temperatures, the setting procedure with the highest efficiency was: 95°C pre-denaturation for 5min, 95°C denaturation for 30s, 55°C annealing for 30s, 72°C extension for 60s, a total of 30 cycles.

3.2 Double PCR electrophoresis results of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis*

In Figure 1, the electrophoresis results of primer No. 1 and primer No. 2 showed clear bands with maximum brightness, and the molecular weight of DNA was 485 bp, indicating that primer No. 1 and primer No. 2 were the best primers for *Pasteurella multocida*, with the best amplification effect. Therefore, primer No. 1 and primer No. 2 were selected for *Pasteurella multocida* porcine (both primer No. 1 and primer No. 2 were the same primer). The PCR annealing temperature was 55.0 °C. The electrophoresis results of primers No. 3 and No. 4 are shown in the figure. The molecular weight of DNA is 339bp, indicating that the best primers for *Haemophilus parasuis* are No. 3 and No. 4, which have the best amplification effect. The PCR annealing temperature was 55 °C.

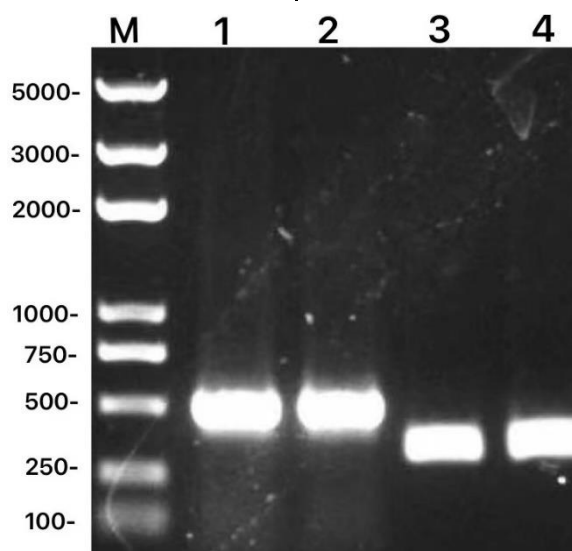


Fig. 1

Double PCR electrophoresis results of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis*

M: DL5000 DNA Marker ; 1-2: Pm; 3-4: Hps

3.3 Specificity Verification

The results are shown in Figure 2 and Figure 3.

Double PCR method for *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* genome DNA test results (see figure 2, 3) show that for *Pasteurella multocida* inspection only 2 485 bp, the specific purpose of strip for the detection of *Haemophilus parasuis* appears only four 339 bp

band specific purpose, for other negative control without amplification bands in the genomic DNA tests. (The experiments in Figure 2 and Figure 3 were performed on the same glue for electrophoresis) The non-target bacteria did not amplify the target band, and the DNA amplification results of the target bacteria at 485bp and 339bp were good, indicating the high specificity of the method for detection of the target bacteria.

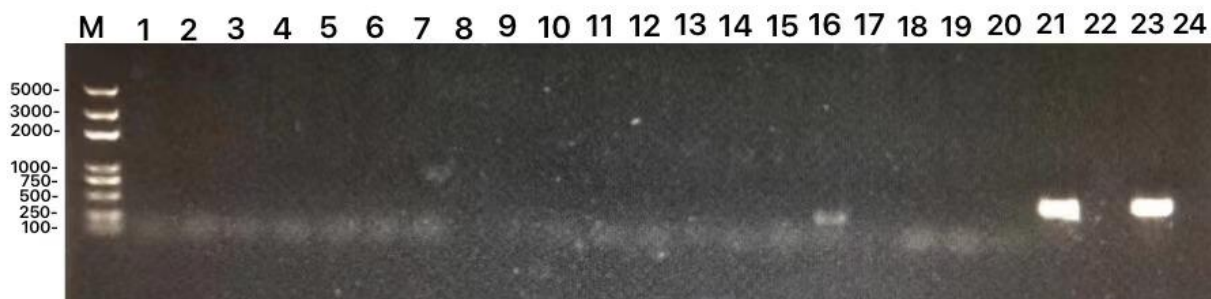


Fig. 2

From No.1 to No.24 PCR specific detection products

M: DL5000 DNA Marker ; 1-5:*Escherichia coli*;
6-10: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 11-15:*Streptococcus pneumoniae*;
16-20:*Staphylococcus aureus*; 21,23: *Pasteurella multocida*; 22,24:blank control

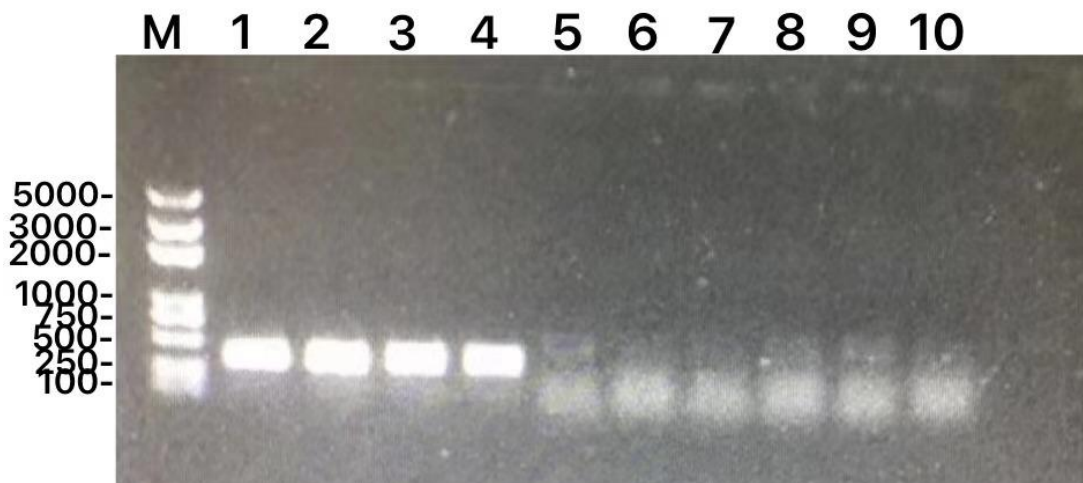


Fig. 3

From No.1 to No.10 PCR specific detection products

M: DL5000 DNA Marker; 1-4: *Haemophilus parasuis*; 5: *Escherichia coli*;
6: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 7: *Streptococcus pneumoniae*;
8: *Staphylococcus aureus*; 9-10: blank control

3.4. Summary

Pasteurella and *Haemophilus* double PCR reaction, the best annealing temperature is 55.0 °C, the specificity of the two pairs of primers is stronger, no cross reaction for the purpose strain amplification. Vice pig kill PAP bacteria and *Haemophilus* specific product size in the order of 485 bp and 339 bp, after agarose electrophoresis can clearly distinguish, nothing specific amplification interference experiment, can detect two kinds of pathogenic bacteria in the same PCR reaction.

Therefore, the dual PCR detection method for *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* established in this study has many advantages. First, one method can be used to distinguish the two pathogens. Second, this method has strong specificity, low cost and high amplification efficiency. Thirdly, this method is suitable for laboratory detection and diagnosis.

4. Discussing

In recent years, *Haemophilus parasuis* has become one of the typical bacterial diseases that cause the death of nursery

pigs under the conditions of large-scale breeding (Gao PC, Chu YF, Zhao P, et al, 2008; Xue G C, Ren T., 2009). Porcine pulmonary disease caused by *Pasteurella multocida* infection is also a common infectious disease that causes the death of pigs. These two bacterial diseases occur all over the world, and both can cause respiratory symptoms of pigs (Harper M, Boyce J D., 2017; Li J, Xie Y Z, Xuan Xiongbiao, et al., 2011). Due to the use of a large number of antibiotics in pig farms after the disease, it is difficult to isolate and cultivate the bacteria, and the accuracy of isolation and identification is low. In addition, some bacteria have strict requirements on the growth conditions and slow growth, which not only brings challenges to the diagnosis of the disease, but also causes significant economic losses to the pig industry.

Laboratory tests in recent years, In the clinical samples tested, the detection rate of *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* was relatively high, and the proportion of *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* was relatively large. Moreover, it was difficult to isolate and cultivate the two kinds of

bacteria. Therefore, in order to improve the efficiency and accuracy of detection, this study combined molecular biology methods and established a dual PCR method for simultaneous detection of the two kinds of bacteria on the basis of the existing detection methods. In the establishment of optimal PCR amplification. In the process of the system, the main principle is to make changes in the basic amplification system, and select the optimal reaction conditions through the light and shade of the electrophoresis map and the width of the bands, among which the main factors are annealing temperature, DNA proportion and primer proportion. The optimum annealing temperature was studied only in this experiment.

Zhang Yuan, Wei Caiwen, Li Jian, et al. (2014). improved the method of capsular clustering of *Pasteurella multocida* by establishing multiplex PCR, indicating that there are many types of *Pasteurella multocida* infection, which are mixed with *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Actinomyces pleuritis* and other infections. Therefore, it is necessary to establish a PCR method that can detect multiple pathogens simultaneously. Miao Lizhong et al. designed specific primers according to the HPS INFB gene sequence in GenBank, and constructed a real-time fluorescence quantitative PCR method for rapid detection of HPS

(Cai X W., 2006).

The dual PCR method established in this study could successfully amplify *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* with amplification lengths of 485bp and 339bp, respectively, without cross-reaction with other related pathogens. This method can be used to distinguish two kinds of pathogens, and this method has strong specificity, low cost, high amplification efficiency, and is suitable for rapid laboratory detection.

CONCLUSIONS

This study established a dual PCR detection method that can simultaneously detect *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis*. By using *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* specific primers, by adjusting the primer concentration, annealing temperature and other conditions, a dual PCR detection method for *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* was established. This research is mainly aimed at the rapid detection method established for *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis*, which has high specificity and sensitivity, and realizes the rapid and accurate identification of pathogenic bacteria in a short time. This clinical and basic laboratory rapid detection for *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* provides a new technical means.

References:

1. Cai X W. (2006). Isolation and characterization of *Haemophilus parasuis* and development of its diagnostic method and inactivated bacterin [D]. *Wuhan: Huazhong Agricultural University*,
2. Cardoso-Toset F, Gómez-Laguna J, Callejo M, et al. (2013). Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiolog*, 167(3-4): 690-694.
3. Gao PC, Chu YF, Zhao P, et al. (2008). Screening of culture conditions for *Haemophilus parasuis* and its pathogenicity test to guinea pigs. *Advances in Veterinary Medicine*, (10):10-13.
4. Harper M, Boyce J D. (2017). The Myriad Properties of *Pasteurella multocida* Lipopolysaccharide. *Toxins*, 21, 9(8): 254-275.
5. Li J Y, Zhang J M, Xu C G, et al. (2010). Research progress on main virulence factors and pathogenic mechanism of *Haemophilus parasuis*. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 37 (12) : 173-176.
6. Li J, Xie Y Z, Xuan Xiongbiao, et al. (2011). Real time fluorescence PCR of *Haemophilus parasuis* Establishment and application of rapid detection method. *Anhui Agricultural Sciences*, 39(6) : 3607-3609.
7. Liang Q, Yang B, Yong S L, et al. (2018). PCR method for detection of *Haemophilus parasuis*. *Modern Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 358 (09) : 10-13. (in Chinese)
8. Lin, Wei-Hao, Shih, Hsing-Chun, Lin, Chuen-Fu, Yang, Cheng-Yao, Lin, Chao-Nan & Chiou, Ming-Tang. (2019). Genotypic analyses and virulence characterization of *Glaesserella parasuis* isolates from Taiwan. *PeerJ*. 7. e6960. 10.7717/peerj.6960.
9. Ma, Lina, Wang, Liyan, Chu, Yuefeng, Li, Xuerui, Cui, Yujun, Chen, Shengli, Zhou, Jianhua, Li, Chunling, Lu, Zhongxin, Liu, Jixing & Liu, Yongsheng. (2016). Characterization of Chinese *Haemophilus parasuis* Isolates by Traditional Serotyping and Molecular Serotyping Methods. *PLoS ONE*. 11. 10.1371/journal.pone.0168903.
10. Malorny B, Tassios P T, Radstrom P, et al. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of food-borne pathogens. *Int J Food Microbiol*, 83(1) : 39—48.
11. Moriy, Nagamine K, Tomita N, et al. (2010). Development of multiplex — PCR for identification of *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Anim Feed Sci Tech*, (22) : 25—27.
12. Nedbalcova, Katerina, Satran, P., Jaglic, Zoran, Ondriasova, R. & Kucerova, Z. (2018). *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. *Veterinární Medicina*. 51. 168-179. 10.17221/5537-VETMED.
13. Ni, Hong-Bo, Gong, Qing-Long, Zhao, Quan, Li, Xiao-Yue, Zhang, Xiao-Xuan. (2020). Prevalence of *Haemophilus parasuis* "Glaesserella parasuis" in pigs in China: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*. 182. 105083. 10.1016/j.prevetmed.2020.105083.
14. Rebenko H. I. (2014). Etiologia ta epizootologia infektsiynykh khvorob respiratornoho traktu svynei (ohliad literatury) [Etiology and epizootology of infectious diseases of the respiratory tract of pigs (literature review)] *Visnyk SNAU seria «Vet med»*. [Bulletin of the SNAU series "Vet Med"], № 1 (34), 114-121.
15. Si Z S, Wang G Y. (2011). Research progress of *hemophilus parasuis*. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 38 (06): 179-182. (in Chinese with English abstract)
16. Starkey, S.R. & Donnelly, T.M.. (2012). *Pasteurella multocida*. *Clinical Veterinary Advisor: Birds and Exotic Pets*. 717-719. 10.1016/B978-1-4160-3969-3.00418-2.
17. Xue G C, Ren T. (2009). Epidemiology and pathogenic factors of *Haemophilus parasuis*. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 36 (05): 168-171. (in Chinese)

18. Zhang Bin, Tang Chen, Liao Ming, et al. (2014). Update on the pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection and virulence factors. *Vet Microbiology*, 168(1): 1-7.
19. Zhang Y, Li J, Li W J, et al. (2017). PCR method for detection of *Bacillus multocida* bars *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 51 (05) : 16-21. (in Chinese with English abstract)
20. Zhang Yuan, Wei Caiwen, Li Jian, et al. (2014). Application of multiplex PCR in capsular sequencing of *Pasteurella multocida*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 44 (12): 1286-1291.

Чжан Юй, студент, Хенанський науково-технічний інститут (Китай) та Сумський національний аграрний університет (Україна)

Ребенко Галина, PhD, Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна),

Ху Цзяньхе, професор, Інститут науки і техніки Хенань (Хенань, Китай)

Чжан Шоупінг, PhD, Інститут науки і техніки Хенань (Хенань, Китай)

Розробка ПЛР для одночасного виявлення *Pasteurella multocida* та *Haemophilus parasuis*

Pasteurella multocida та *Haemophilus parasuis*, є основними збудниками респіраторних захворювань свиней на колективних свинарських фермах усіх країн з розвиненим свинарством. Збудники мають значний вплив на дихальні шляхи свиней та серйозно перешкоджають росту і розвитку, а відповідно, знижують продуктивність. Тому метод швидкого виявлення цих мікроорганізмів є запорукою успішної профілактики та контролю інфекцій.

Традиційні методи лабораторних досліджень для підтвердження попереднього діагнозу, поставленого на підставі аналізу даних анамнезу, клінічних симптомів, патологічних змін та епідеміологічних характеристик захворювання, включають бактеріологічні дослідження *Pasteurella multocida* та *Haemophilus parasuis*, культуральну, біохімічну та імунологічну ідентифікацію. Ці методи трудомісткі й не можуть задовільнити потреби у швидкій діагностиці, що ускладнює можливість профілактики та контролю хвороб тварин. *Pasteurella multocida* та *Haemophilus parasuis* обидві є збудниками синдрому респіраторних захворювань свиней (PRDC), і часто виступають у вигляді асоційованої інфекції, тому необхідно встановити точний і швидкий метод ідентифікації обох загальних збудників респіраторних хвороб у свиней. У цій роботі *Pasteurella multocida* та *Haemophilus parasuis* використовувались як об'єкти дослідження для розробки подвійного методу ПЛР-детекції.

Основний зміст досліджень полягає в наступному: було досліджено компоненти та реагенти та відпрацьовано покроковий порядок постановки подвійної ПЛР для одночасного виявлення *Pasteurella multocida* та *Haemophilus parasuis*, використовуючи специфічні для *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* праймери, а також, регулюючи концентрацію праймерів та температуру відпау.

Метод швидкого виявлення *Pasteurella multocida* та *Haemophilus parasuis*, описаний у цьому дослідженні, має високу специфічність та чутливість і може реалізувати швидку та точну ідентифікацію патогенних бактерій за відносно короткий проміжок часу, забезпечуючи нові технічні засоби для швидкого виявлення *Pasteurella multocida* та *Haemophilus parasuis* у лабораторії.

Ключові слова: *Pasteurella multocida*; *Haemophilus parasuis*; подвійна ПЛР-детекція

THE MECHANISM OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE MPX AGAINST ENTEROHEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI IN VITRO

Xueqin Zhao

Postgraduate student

Sumy National Agrarian University of Ukraine (Sumy, Ukraine)

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology (Xinxiang, China)

ORCID: 0000-0002-4713-4685,

zxueqin0708@163.com

Hanna Fotina

Doctor of Veterinary Sciences, Professor

Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

ORCID: 0000-0002-0761-3681

hanna.fotina@snau.edu.ua

Lei Wang

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology (Xinxiang, China)

ORCID: 0000-0001-7972-7680

wlei_007@163.com

Jianhe Hu

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology (Xinxiang, China)

ORCID: 0000-0002-5248-0312

jianhehu@126.com

Escherichia coli is a facultative anaerobic bacteria that exists in the gastrointestinal tract of humans and animals. It can cause diarrhea, enteritis, destruction of the host's intestinal barrier, and intestinal microecological disturbances. In recent years, due to the abuse of traditional antibiotics, a variety of drug-resistant strains and super bacteria have emerged in an endless stream. Therefore, there is an urgent need to find new alternatives to antibiotics. Antimicrobial peptides are a type of small peptides produced when organisms resist the invasion of foreign microorganisms. They are considered to be the best alternative to antibiotics which has become a research hotspot in recent years. The antimicrobial peptide MPX is extracted from wasp venom and has a good bactericidal effect on many bacteria. To explore the effect of MPX against *E. coli*, the function of MPX against *E. coli* was detected by MIC, plate count, propidium iodide, NPN and DiSC3(5) permeability testing, immunofluorescence microscope observation, and the impact of MPX stability by temperature, pH, ion. In this study, the results found that MPX has good antibacterial activity against *E. coli*, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was 31.25 ug/mL. MPX bactericidal kinetics study found that MPX had good bactericidal activity within 6 hours. Bacterial permeability studies have shown that MPX could increase the permeability of bacteria, leading to an increase in the protein content of the bacterial supernatant. In addition, NPN, PI and DiSC3(5) results showed that the fluorescence value was positively correlated with MPX. The stability test of MPX found that salt ions, temperature, pH, etc. have a slight influence on its effect. In addition, scanning electron microscopy results showed that the bacteria became smaller and the contents leaked after the action of MPX. The above results showed that MPX has a good bactericidal activity in vitro, laying the foundation for the development of new drugs for the treatment of bacterial infections.

Key words: antimicrobial peptide MPX; Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; in vitro

DOI: <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.3>

Introduction. *Escherichia coli* is a facultative anaerobic bacteria that mainly exists in the gastrointestinal tract of humans and animals, colonize in the small intestine, which is usually associated with acute secretory diarrhea (Fleckenstein J.M. et al., 2010) It can cause diarrhea, enteritis, destruction of the host's intestinal barrier, and intestinal microecological disturbances (Madhavan T.P. et al., 2015). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is classically associated with acute secretory diarrhea, which induces 2 million people death in developing countries over a year, predominantly children in the first years of life (Song X. et al., 2021) In addition, in recent years, due to a large number of unreasonable use of antibiotics, the resistance of *E. coli* has increased. The antibiotics, tetracyclines, sulfonamides and penicillins, which are most commonly used in animal production, have the highest resistance rates (Van Boeckel T.P. et al., 2019). Therefore, there is an urgent need to find alternative antibacterial drugs that can treat *E. coli* infections.

Antimicrobial peptides are a class of small defensive peptides produced when organisms resist the invasion of foreign microorganisms. They are an important part of the body's innate immune system (Andrejko M. et al., 2021). Compared with traditional antibiotics, antimicrobial peptides have the characteristics of small molecular weight, good water solubility, good thermal stability, unique antibacterial mechanism, broad-spectrum antibacterial activity against clinically resistant strains, and resistance to bacterial resistance (Luu T. et al., 2021). MPX (H-INWKGIAAMAKLL-NH₂) belongs to the family of bee venom antimicrobial peptides. It has a high content in bee venom. It is an amino acid peptide with 4 net positive charges (Henriksen J.R. et al., 2014). Previous research of our group found that MPX has good antibacterial activity against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. However, it is currently unknown whether MPX has good anti-*E. coli* activity.

Aim. The aim of this was to study the mechanism of antimicrobial peptide MPX against *E. coli* in vitro.

Materials and Methods.

Peptide synthesis.

MPX (H-INWKGIAAMAKLL-NH₂) was obtained by Shanghai Jier Biochemical Company (China) using solid-phase N-9-fluoromethoxycarbonyl (Fmoc) strategy and high performance liquid chromatography (HPLC) purification, and its purity was as high as 98%.

Bactericidal activity test.

E. coli was cultured in LB liquid medium to the logarithmic phase (OD₆₀₀=1.0), and the final concentrations of MPX (31.25 ug/mL), PR39 (50 ug/mL), and Enro (50 ug/mL) were added to the bacterial solution, added ddH₂O as the negative control, incubated at 37°C for 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, then measured the OD₆₀₀ of the bacterial solution and dilute the bacterial solution every 1 h. Put it on the LB plate and incubated in a 37°C degree incubator, and incubate for 12 h until a single colony is clearly visible, and then counted the plates (Wang L. et al., 2017).

The effect of MPX on the outer membrane of *E. coli*.

E. coli were washed with 1:1 mixture of 5 mM HEPES buffer and resuspended with the same. The concentration of *E. coli* were 1x10⁸ CFU/mL. This study was performed in a Corning 96 black well plate with clear bottom containing 10 µM of N-Phenyl naphthylamine (NPN) dye and 190 µL of bacterial suspension. After that, bacterial suspensions with dye in each well were treated with 10 µL of MPX at concentrations of 1 MIC, 2 MIC, 4 MIC. Then, the fluorescence was monitored at an excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 420 nm. The increase in fluorescence intensity was monitored for another 10 min with an INFINITE M PLEX microplate reader (Uppu D.S. et al., 2013).

The effect of MPX on cell plasma membrane.

E. coli were collected separately washed with 1:1 ratio of 5 mM glucose and HEPES buffer (pH = 7.4). Next, the bacterial plate was resuspended in 1:1:1 ratio of 5 mM HEPES buffer, 100 mM KCl solution supplemented with 0.2 mM EDTA and 5 mM glucose. For this study EDTA was used to allow the dye uptake by permeabilizing outer membrane of *E. coli*. This study was performed in a Corning 96 black well plate with clear bottom containing 2 µM of 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide [DiSC3(5)] and 190 µL of bacterial suspension. After that, 10 µL of MPX (1 MIC, 2 MIC, 4 MIC) was mixed with the suspension of bacteria and dye of each well. In this experiment, ddH₂O was used as the control. Fluorescence intensity was measured at 622 nm excitation wavelength and 670 nm emission wavelength for 10 min using an INFINITE M PLEX microplate reader (Konai M.M. et al., 2014).

The effect of MPX on the inner membrane of *E. coli*.

Briefly, The mid-log phase of *E. coli* were separately centrifuged (8000rpm, 5 min), washed and resuspended in a 1:1 ratio of 5 mM glucose and HEPES buffer (pH = 7.4). The working concentration of *E. coli* was 1x10⁸ CFU/mL. After that, 190 µL of bacterial suspension containing 10 µM propidium iodide (PI) was added to the well of a black Corning 96-well plate with a clear bottom. Next, 10 µL of MPX (1 MIC, 2 MIC, 4 MIC) was added to the wells containing dye and bacterial suspension. The control was ddH₂O. An excitation wavelength of 535 nm and emission wavelength of 617 nm were used to monitor the PI fluorescence for 10 min using an INFINITE M PLEX microplate reader (Ghosh C. et al., 2016).

Detection of MPX to inhibit *E. coli* from forming biofilms.

The ability of MPX inhibited *E. coli* biofilm formation was tested according to the reference (Grasteau A. et al., 2011) In a 96-well polystyrene microtiter plate, the overnight cultured *E. coli* was inoculated into 100 µL of LB liquid medium according to the amount of 1%, and different concentrations of MPX (0.5 MIC, 1 MIC, 2 MIC, 4 MIC); ddH₂O is used as a negative control. Place the culture plate in a 37°C incubator for 24 h. Aspirated and discarded the culture supernatant. Washed each well with 200 µL sterile PBS 3 times; fixed with 70% methanol for 30 min; aspirated and discarded the fixative at 37°C dry in the incubator for 30 min; added 100 µL of 1% Hucker crystal violet staining solution to each well, and stained for 5 min at room temperature; removed the staining solution, and rinsed the culture plate under a slow stream of water until the flowing water was colorless; After the oven was dried, placed it under a microscope for observation; then added 100 µL of 70% ethanol solution to each well for decolorization, vortex and mix, and quickly placed it in a multifunctional microplate reader to determine the absorbance value of OD₅₇₀ (Grasteau A. et al., 2011).

Scanning electron microscope observed the formation of biofilm.

After culturing the *E. coli* overnight, diluted it with fresh LB liquid medium by 100 times, transfer it to a 6-well cell plate with sterile glass slides, add 500 µL bacterial solution to each well, added MPX (1 MIC), ddH₂O as negative control. After 24 h of incubation in a constant temperature incubator at 37°C, slowly removed the cell culture solution and rinsed with sterile saline for 3 times to wash away floating bacteria. Add 300 µL of 2.5% glutaraldehyde solution to each well. After fixation at room temperature for 30 min, rinsed with pH=7.4 phosphate buffer for 3 times, with an interval of 10 min each time. 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% alcohol gradient dehydration respectively, each time interval of 15 min. After the slides are dry, observe the formation of biofilm under scanning electron microscope (Wang L. et al., 2020).

Statistical analyses.

GraphPad Prism 8.0 software to perform data statistics and difference analysis of experimental results (One-Way ANOVA or Two-Way ANOVA). P≤0.05 is considered as significant difference (*P <0.05; **P <0.01; *** P <0.001).

Results.

MPX bactericidal activity detection results.

The antibacterial activity of MPX against *E. coli* was detected by double-layer agarose amplification. It was found that MPX could effectively inhibit the growth of *E. coli* at 1 mg/mL, and the size of the antibacterial ring was equivalent to that of Enro (1 mg/mL). The negative control has no antibacterial activity. In addition, a modified micro broth dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration of MPX against *E. coli* 31.25 ug/mL. In order to test the bactericidal activity of the antimicrobial peptide MPX against *E. coli*, the OD₆₀₀ value of the bacterial culture was measured, and it was found that the OD₆₀₀ of the bacterial culture solution decreased to 0.1 after the antimicrobial peptide MPX acted on for 6 h, which was significantly lower than that of the control group (Figure 1 A, p<0.01)). The bactericidal activity of MPX against *E. coli* was measured by a plate counting method. It was found that MPX showed an MIC-dependent increase in the bactericidal efficiency of *E. coli*. The number of bacteria was significantly reduced (Figure 1B).

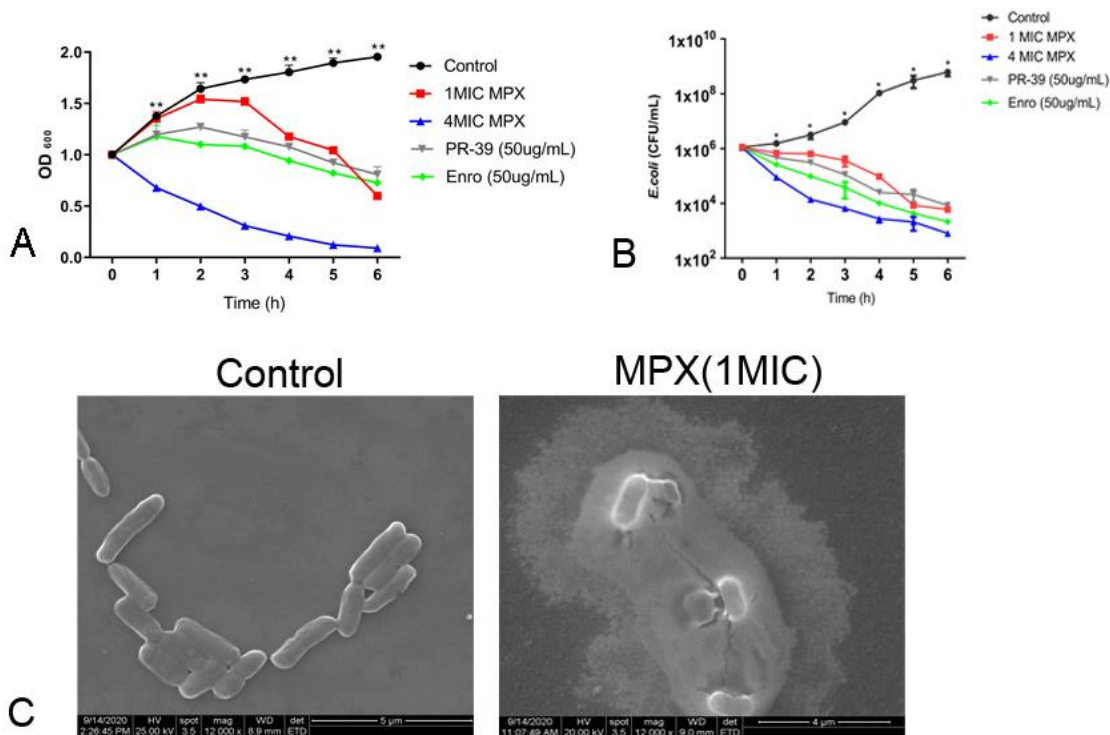


Fig. 1 The bactericidal activity detection of MPX in vitro.
A. The *E.coli* OD₆₀₀ detection after treatment with MPX;
B. The *E.coli* plate count detection after treatment with MPX;
C. The effect of MPX on *E. coli* was detected by scanning electron microscope.

Scanning electron microscope was used to observe the effect of MPX on the morphology of *E. coli*. The results showed that the negative control *E. coli* has a full morphology, large cells, and a smooth surface. After MPX (1 MIC) treatment for 2 h, the cells became significantly smaller, resulting in leakage of bacterial contents (Figure 1C). The above results all indicate that MPX can effectively kill *E. coli* in vitro.

The effect of pH and temperature on the antibacterial activity of MPX.

In order to study the effect of pH and temperature on the antibacterial activity of MPX, the antibacterial radius method was

used to determine the antibacterial activity of MPX on *E. coli* at different pH values and temperatures. As shown in Figure 2A, the pH in the range of 2-9 has no effect on MPX activity. When pH>10, the antibacterial activity of MPX decreases, indicating that the activity of MPX was stable compared in acidic and weakly alkaline environments. The MPX was subjected to different temperature treatments, and the highest temperature reached 100°C. It was found that the temperature had no effect on the antibacterial activity of MPX, indicating that MPX has good thermal stability (Figure 2B).

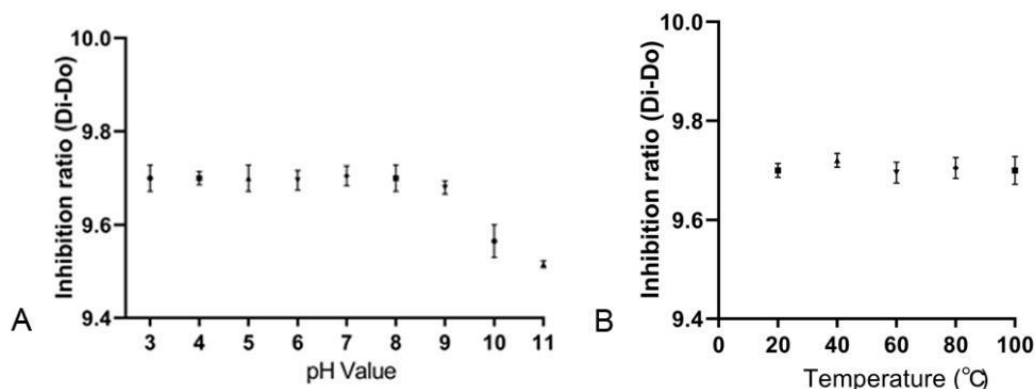


Fig. 2 The effect of pH and temperature on MPX.
A. The effect of pH on MPX; B. The effect of temperature on MPX.

The effect of ions on the antibacterial activity of MPX.

In order to study the effect of different salt ions on the activity of MPX after treating with MPX at different concentrations of cations Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, it was found that cations Na⁺, K⁺ had no effect on the antibacterial activity of MPX, while cationic

Mg²⁺ and Ca²⁺ had effect on MPX activity (Figure 3A-D). It is speculated that the presence of cationic Ca²⁺ leads to changes in the secondary structure of MPX, thereby affecting its antibacterial activity.

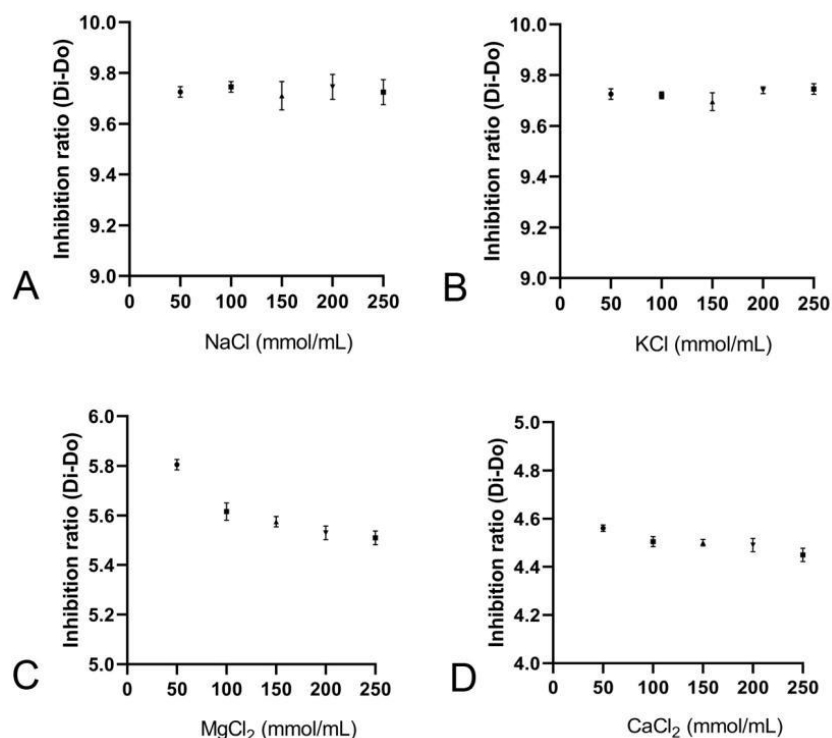


Fig. 3 The effect of cations Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} on the activity of MPX.

A. The effect of cations Na^+ on the activity of MPX; **B.** The effect of cations K^+ on the activity of MPX; **C.** The effect of cations Mg^{2+} on the activity of MPX; **D.** The effect of cations Ca^{2+} on the activity of MPX.

Bacterial permeability of MPX.

In order to study the permeability of antimicrobial peptide MPX to *E. coli* strains, BCA protein content determination and immunofluorescence observation was used in this study and found that the protein content in supernatant of *E. coli* was significantly higher than that of the control group after the action of MPX treatment for 3 hours (Figure 4A). The protein content is significantly higher than MPX (1 MIC) after treatment with MPX (2 MIC), and the effect of MPX on *E. coli* is positively correlated with the concentration. Fluorescence microscope used SYTO 9/PI (Properly mix SYTO 9 and PI staining, bacteria with intact cell membranes are stained fluorescent green, while bacteria with damaged cell membranes are stained fluorescent red). Compared with the control group, the integrity of the cell membrane was damaged after MPX (2 MIC) treatment, PI entered into the bacterial cells, and the number of dead bacteria increased significantly. The effect was significantly better than that of MPX 1MIC, and it was consistent with the BCA protein content determination

results. MPX exerts its bactericidal function by changing the permeability of bacteria.

The permeability of MPX to the outer membrane of *E. coli* was measured by NPN uptake assay. NPN is a neutral hydrophobic fluorescent probe, which is usually excluded by the outer membrane, but the fluorescence intensity increases when it enters the outer membrane. As shown in Figure 4C, MPX rapidly penetrated the outer membrane of *E. coli* in a concentration-dependent manner, which could be observed by the increase in NPN fluorescence. MPX could penetrate the outer membrane of *E. coli* even at a concentration of 1 MIC in a dose-dependent manner.

PI was used to determine the permeability of MPX to the inner membrane of *E. coli*. Due to its strong binding to bacterial DNA, the fluorescence of PI increases when it enters the damaged bacterial cell. After *E. coli* treatment with MPX, the PI fluorescence intensity was significantly increased, and the fluorescence signal intensity increased in a concentration-dependent manner (Figure 4D).

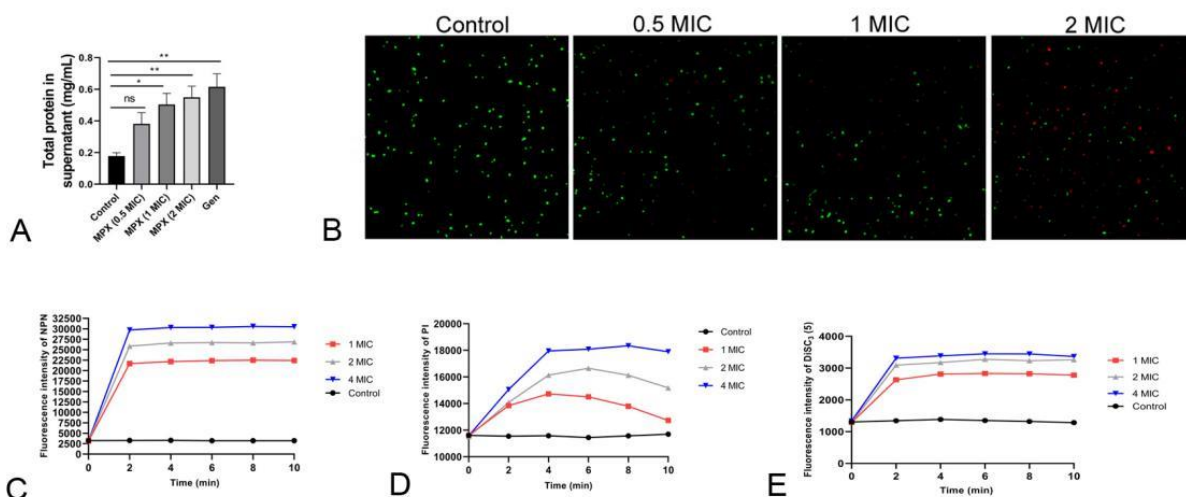


Fig. 4 The effect of MPX on the permeability of *E. coli*.

- A.** The results of total protein in *E. coli* bacterial supernatant after MPX treatment;
- B.** The effect of MPX on the permeability of *E. coli* was observed by immunofluorescence;
- C.** Detection of NPN fluorescence after MPX treatment with *E. coli*;
- D.** Detection PI of fluorescence after MPX treatment with *E. coli*;
- E.** Detection of DISC3(5) fluorescence after MPX treatment with *E. coli*.

The effect of MPX on the depolarization of *E. coli* cytoplasmic membrane was observed. Membrane-potential sensitive dye 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide [DiSC3(5)] was used for this study. Under the normal potential on the cell membrane, DiSC3(5) dye is distributed inside and outside the bacterial cell. Therefore, the initial fluorescence intensity of the dye decreases due to its "self-quenching" within the bacterial cell. After treatment with drugs that affect the normal membrane potential, the release of the dye in the external medium increases, which in turn leads to an increase in fluorescence intensity. After adding different concentrations of MPX (1 MIC, 2 MIC, 4 MIC), it was found that the fluorescence intensity of *E. coli* increased with the increase of the concentration of MPX (Figure 4E). This result showed that MPX had a significant effect on the normal membrane potential of *E. coli*.

The effect of MPX on *E. coli* biofilm formation.

The formation of *E. coli* biofilm plays an important role in

its virulence and drug resistance. Therefore, this study first adopted the crystal violet method to study the effect of MPX on the biofilm formation of *E. coli*. The results showed that compared with the control group, MPX (1 MIC) could reduce the formation of *E. coli* biofilm in a dose-dependent manner, and MPX (4 MIC) had the best effect (Figure 5A). Furthermore, after using 70% alcohol to dissolve the crystal violet, the absorbance value was measured with an OD₅₇₀ spectrophotometer, compared with the control group, MPX significantly reduced the absorbance value of the *E. coli* biofilm (Figure 5B).

Scanning electron microscope was used to observe the effect of MPX (1 MIC) on the biofilm of *E. coli*, which resulted in a loose structure, reduced bacterial adhesion, and an increase in the gap between bacteria. While control group formed dense biofilm with small gaps between bacteria (Figure 5). The above results indicate that MPX can significantly inhibit the formation of *E. coli* biofilm.

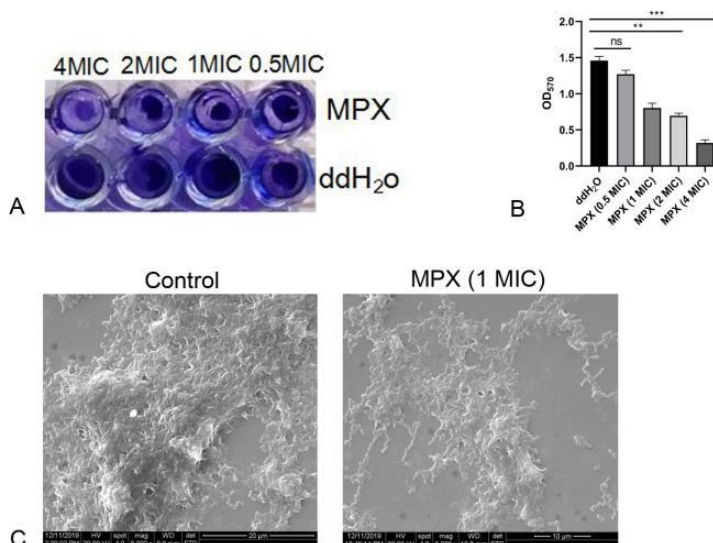


Fig. 5 The effect of MPX on the formation of *E. coli* biofilm.

- A.** The effect of MPX on *E. coli* biofilm by crystal violet staining;
- B.** OD₅₇₀ detected the effect of MPX on *E. coli* biofilm;
- C.** The effect of MPX on the biofilm formation of *E. coli* by scanning electron microscope.

Discussion and Conclusion

In recent years, the unreasonable use of antibiotics has led to an increase in the resistance of *E. coli*. Therefore, there is an urgent need to find alternatives to antibiotics. Amphaiphan C and others isolated *E. coli* from dogs and cats suffering from urinary system diseases, and tested for drug sensitivity, and found that the resistance of *E. coli* was 16.7% (Amphaiphan C. et al., 2021) Fayemi OEF from et al from 180 samples of fresh beef and meat products detected that 61 samples contained different serotypes of *E. coli*.

The resistance analysis of the isolated *E. coli* O157:H7 showed that 23.6% resistance of STEC serotype (Fayemi O.E. et al., 2021) Sarjana Safain K et al determined the spectrum of AMR and associated genes encoding aminoglycoside, macrolide and β -lactam classes of antimicrobials in bacteria isolated from hospitalized patients in Bangladesh, found that 53% of isolates were multidrug-resistant (MDR), including 97% of *E. coli* (Sarjana S.K. et al., 2021).

Shin H et al isolated high level carbapenem and extensively drug resistant (XDR) strain N7 of *E. coli*, which produces a variant of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-5) from the influent of the Jungnang wastewater treatment plant located on Han River, Seoul, South Korea N7, which harbors the gene, showed high level of carbapenem resistance at concentrations of doripenem (512 mg/L) and meropenem (256 mg/L), and XDR to 15 antibiotics (Shin H. et al., 2021).

The above results indicate that *E. coli* has high resistant to antibiotics, and there is an urgent need to find the best alternative to antibiotics against *E. coli* infection. This study found that MPX has good antibacterial activity against *E. coli*, with a minimum inhibitory concentration of 31.25 μ g/mL and has no drug resistance, indicating that MPX is expected to become one of the antibiotic alternatives for the treatment of *E. coli* infections.

The formation of bacteria biofilm leads to an increase in bacterial resistance. Morroni G et al. found that the antimicrobial peptide LL-37 has good antibacterial activity against multi-drug resistant *E. coli*, and MIC and sub-MIC concentrations of LL-37

were able to reduce *E. coli* biofilm formation (Morroni G. et al., 2021) Vergis J et al found that the antimicrobial peptide Lactoferricin (17-30) has good antibacterial and anti-biofilm activity against multi-drug-resistant Enterococci, and Lactoferricin (17-30) significantly reduced the formation of *E. coli* biofilm (Vergis J. et al., 2020) Mishra BE et al found that antimicrobial peptide WW298 could effectively inhibit the MRSA attachment and disrupt its preformed biofilms more effectively than daptomycin (Mishra B. et al., 2020). Liu Ye et al found that tryptophan-rich amphiphilic peptide termed WRK-12 significantly inhibited the formation of biofilm in a dose-dependent manner, especially multidrug-resistant (MDR) bacteria particularly Gram-negative bacteria (Liu Y. et al., 2020) This study found that MPX (1 MIC) significantly inhibited the formation of *E. coli* biofilm, indicating that antibacterial peptides have a good antibacterial biofilm formation effect, which lays the foundation for the development of antibacterial biofilm formation drugs.

In summary, the above results show that MPX has a good killing effect on *E. coli* and the stability was less affected by temperature, pH, and ions. In addition, MPX could significantly inhibit the formation of *E. coli* biofilms. This research provides a theoretical basis for the development of new drugs against *E. coli* infection.

Author's contributions

All authors participated in this article design. Xueqin Zhao participated and performed writing and data collection. All authors have read and approved the final manuscript for publication.

Acknowledgments

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31702259 and 31520103917), Young Talent Lifting Project in Henan Province (2020HYTP041), Key Scientific Research Projects of Colleges and University in Henan Province (21A230004).

Conflict of interest Author does not report any financial or personal connections with other persons or organizations, which might negatively affect the contents of this publication and/or claim authorship rights to this publication.

References:

1. Amphaiphan C, Yano T, Som-In M, et al. (2021). Antimicrobial drug resistance profile of isolated bacteria in dogs and cats with urologic problems at Chiang Mai University Veterinary Teaching Hospital, Thailand (2012-2016). *Zoonoses Public Health*. doi:10.1111/zph.12832.
2. Andrejko M, Mak P, Sieminska-Kuczer A, et al. (2021). A comparison of the production of antimicrobial peptides and proteins by *Galleria mellonella* larvae in response to infection with two *Pseudomonas aeruginosa* strains differing in the profile of secreted proteases. *J Insect Physiol*. 104239, doi:10.1016/j.jinsphys.2021.104239.
3. Fayemi O E, Akanni G B, Elegbeleye J A, Aboaba O O, Njage P M. (2021). Prevalence, characterization and antibiotic resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups isolated from fresh beef and locally processed ready-to-eat meat products in Lagos, Nigeria. *Int J Food Microbiol*. 347, 109191, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109191.
4. Fleckenstein J M, Hardwidge P R, Munson G P, Rasko D A, Sommerfelt H, Steinsland H. (2010). Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect*. 12, 89-98, doi:10.1016/j.micinf.2009.10.002.
5. Ghosh C, Manjunath G B, Konai M M, et al. (2016). Aryl-alkyl-lysines: Membrane-Active Small Molecules Active against Murine Model of Burn Infection. *ACS Infect Dis*. 2, 111-22, doi:10.1021/acsinfecdis.5b00092.
6. Gasteau A, Tremblay Y D, Labrie J, Jacques M. (2011). Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol*. 153, 134-43, doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.029.
7. Henriksen J R, Etzerodt T, Gjetting T, Andresen T L. (2014). Side chain hydrophobicity modulates therapeutic activity and membrane selectivity of antimicrobial peptide mastoparan-X. *PLoS One*. 9, e91007, doi:10.1371/journal.pone.0091007.
8. Konai M M, Ghosh C, Yarlagadda V, Samaddar S, Halder J. (2014). Membrane active phenylalanine conjugated lipophilic norspermidine derivatives with selective antibacterial activity. *J Med Chem*. 57, 9409-23, doi:10.1021/jm5013566.
9. Liu Y, Shi J, Tong Z, Jia Y, Yang K, Wang Z. (2020). Potent Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Amphiphilic Peptides against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*. 8, doi:10.3390/microorganisms8091398.
10. Luu T, Li W, O'Brien-Simpson N M, Hong Y. (2021). Recent Applications of Aggregation Induced Emission Probes for Antimicrobial Peptide Studies. *Chem Asian J*. doi:10.1002/asia.202100102.

11. Madhavan T P, Sakellaris H. (2015). Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol.* 90, 155-97, doi:10.1016/bs.aambs.2014.09.003.
12. Mishra B, Lakshmaiah N J, Lushnikova T, Zhang Y, Golla R M, Zarena D, Wang G. (2020). Sequence Permutation Generates Peptides with Different Antimicrobial and Antibiofilm Activities. *Pharmaceuticals (Basel)*. 13, doi:10.3390/ph13100271.
13. Morroni G, Sante L D, Simonetti O, et al. (2021). Synergistic effect of antimicrobial peptide LL-37 and colistin combination against multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates. *Future Microbiol.* 16, 221-227, doi:10.2217/fmb-2020-0204.
14. Sarjana S K, Sarower B G, Hassan H S, et al. (2021). Genotypic and phenotypic profiles of antibiotic-resistant bacteria isolated from hospitalized patients in Bangladesh. *Trop Med Int Health.* doi:10.1111/tmi.13584.
15. Shin H, Kim Y, Han D, Hur H G. (2021). Emergence of High Level Carbapenem and Extensively Drug Resistant *Escherichia coli* ST746 Producing NDM-5 in Influent of Wastewater Treatment Plant, Seoul, South Korea. *Front Microbiol.* 12, 645411, doi:10.3389/fmicb.2021.645411.
16. Song X, Yang Y, Li J, et al. (2021). Tannins extract from *Galla Chinensis* can protect mice from infection by Enterotoxigenic *Escherichia coli* O101. *BMC Complement Med Ther.* 21, 84, doi:10.1186/s12906-021-03261-x.
17. Uppu D S, Akkapeddi P, Manjunath G B, Yarlagadda V, Hoque J, Halder J. (2013). Polymers with tunable side-chain amphiphilicity as non-hemolytic antibacterial agents. *Chem Commun (Camb)*. 49, 9389-91, doi:10.1039/c3cc43751e.
18. Van Boeckel T P, Pires J, Silvester R, et al. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science.* 365, doi:10.1126/science.aaw1944.
19. Vergis J, Malik S S, Pathak R, et al. (2020). Exploiting Lactoferricin (17-30) as a Potential Antimicrobial and Antibiofilm Candidate Against Multi-Drug-Resistant Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 11, 575917, doi:10.3389/fmicb.2020.575917.
20. Wang L, Zhao X, Zhu C, et al. (2017). Thymol kills bacteria, reduces biofilm formation, and protects mice against a fatal infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain L20. *Vet Microbiol.* 203, 202-210, doi:10.1016/j.vetmic.2017.02.021.
21. Wang L, Zhao X, Zhu C, et al. (2020). The antimicrobial peptide MPX kills *Actinobacillus pleuropneumoniae* and reduces its pathogenicity in mice. *Vet Microbiol.* 243, 108634, doi:10.1016/j.vetmic.2020.108634.

Ксюсцінь Дзяо, аспірант кафедри ветеринарної експертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки та якості продукції тваринництва Сумського НАУ

Ганна Фотіна, доктор ветеринарних наук, професор

Лей ВАНГ, коледж наук про тварин і ветеринарної медицини, Інститут науки і техніки Хенань, (Сінсян, Китай)

Ху Цзяньхе, професор, Коледж наук про тварин і ветеринарної медицини, Інститут науки і техніки Хенань (Китай)

Механізм дії антимікробного пептиду MPX проти ентерогеоморфної *Escherichia coli* in vitro

Метою нашої роботи було дослідження механізму протимікробного пептиду MPX проти кишкової палички *in vitro*. Дослідження проводили в лабораторії безпеки та якості продуктів тваринництва Сумського НАУ, факультету ветеринарної медицини, Суми, Україна та на базі Науково-технічного інституту Хенань, Сінсян, Китай. Кишкова паличка - факультативна анаеробна бактерія, яка в основному існує в шлунково-кишковому тракті людей і тварин, колонізується в тонкому кишечнику, що зазвичай пов'язано з гострою секреторною діареєю. Це може спричинити діарею, ентерит, руйнування кишкового бар'єру господаря та кишкові мікроекологічні порушення. В останні роки через зловживання традиційними антибіотиками безліч резистентних штамів та супер бактерій з'явилися у незліченній кількості. Тому існує нагальна потреба у пошуку нових альтернатив антибіотикам. Антимікробні пептиди - це тип малих пептидів, що утворюються, коли організм протистоять вторгненню чужорідних мікроорганізмів. Вони вважаються найкращою альтернативою антибіотикам, яка за останні роки стала точкою досліджень. Антимікробний пептид MPX витягується з отрути осі і має хороший бактерицидний ефект відносно багатьох бактерій. Було досліджено вплив MPX проти кишкової палички. Функцію MPX проти кишкової палички визначали за допомогою MIC, кількості пластин, йодиду пропідію, тесту проникності NPN та DiSC3 (5), спостереження з використанням імуофлуоресцентного мікроскопу та впливу стабільності MPX за температури, рН, іона. У цьому дослідженні виявили, що MPX має хорошу антибактеріальну активність щодо кишкової палички, а мінімальна інгібуєча концентрація (MIC) становила 31,25 мкг / мл. Дослідження бактерицидної кінетики MPX показало, що MPX має хорошу бактерицидну активність протягом 6 годин. Дослідження проникності бактерій показали, що MPX може збільшити проникність бактерій, що призведе до збільшення вмісту білка в супернатанті бактерій. Крім того, результати NPN, PI та DiSC3 (5) показали, що значення флуоресценції позитивно корелювало з MPX. Тест на стійкість MPX виявив, що іони солі, температура, рН тощо мають незначний вплив на його вплив. Крім того, результати скануючої електронної мікроскопії показали, що бактерії стало менше, а вміст витік після дії MPX. Наведені вище результати показали, що MPX має хорошу бактерицидну активність *in vitro*, закладаючи основу для розробки нових препаратів для лікування бактеріальних інфекцій.

Ключові слова: MPX, бактерицидна активність, антимікробні пептиди, резистентні штам

КОРДОВА КРОВ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ЇЇ КОМПОНЕНТІВ В ПРАКТИЦІ ВЕТЕРИНАРНОЇ ХІРУРГІЇ

Краєвський Аполлінарій Йосиповичдоктор ветеринарних наук, професор
Сумський національний аграрний університет (м. Суми, Україна)
ORCID: 0000-0003-2836-8686
kay57@ukr.net**Чекан Олександр Миколайович**кандидат ветеринарних наук, доцент
Сумський національний аграрний університет (м. Суми, Україна)
ORCID: 0000-0002-5676-1947
achekanne@gmail.com**Бондаренко Ірина Вікторівна**кандидат ветеринарних наук, доцент
Сумський національний аграрний університет (м. Суми, Україна)
ORCID: 0000-0002-1019-3446
bondarenkoIV@gmail.com**Гребеник Наталія Петрівна**кандидат ветеринарних наук, доцент
Сумський національний аграрний університет (м. Суми, Україна)
ORCID: 0000-0002-1254-3374
greb.nata@ukr.net

У статті наведено результати досліджень глікопротеїнів, глікозаміногліканів та церулоплазміну в плазмі крові великої рогатої худоби в динаміці загоєння післякастраційних ран, за використання інтраперитоніальних ін'єкцій сироватки кордової крові. З'ясовано вплив парентерального застосування сироватки кордової крові на показники метаболізму сполучної тканини клінічно здорових тварин та при асептичному запаленні. Кордову кров для отримання сироватки відбирали із судин пуповини під час фізіологічних родів у корів. Сироватку після центрифугування розливали по 5 мл у стерильні пластикові пробірки і піддавали криоконсервації у морозильній камері при 18-20°C, яку зберігали до 3-4 тижнів. Визначено рівень церулоплазміну за методикою, що ґрунтується на окисненні *p*-фенілендіаміну за участю даного металопротеїну.

З'ясовано, що застосування інтраперитоніального введення сироватки кордової крові дозволяє обмежити руйнацію сполучнотканинного матриксу та посилює і модулює гостро фазну відповідь організму на розвиток запальної реакції.

Ключові слова: кордова кров, велика рогата худоба, глікопротеїни.

DOI: <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.4>

Вступ. Кордовою (плацентарною, пуповинною, фетальною) називається кров, що залишається в судинах плаценти і пуповини після народження тварини і відокремлення її від матері. Вона є, власне кажучи, частиною крові плоду Barker, Juliet & Krepiski, Timothy, (2002), Arnsen, B. (2005). Кордова кров, будучи внутрішнім середовищем зростаючого організму, забезпечує транспорт до різних тканин і органів біологічно активних речовин, що продукуються тканинами фетоплацентарного комплексу. Ці сполуки, різні за своєю природою і джерелом походження, визначають ріст і диференціювання тканин плоду, регулюють його метаболізм.

Імунотолерантність кордової крові зумовлена особливостями фізіологічних і імунологічних характеристик клітин, що містяться в пуповинній крові. На сьогоднішній день кордова кров розглядається як джерело стовбурових клітин і, ймовірно, однією з найбільших переваг кордової крові, у порівнянні з іншими джерелами стовбурових клітин, є її менша імунологічна реактивність, що зумовлює зниження ризику реакції «трансплантат проти хазяїна» Thomson, Blythe & Robertson (2000); Gluckman, Eliane & Broxmeyer, HA (1989); Engelfriet, C.P. & Vanderson, R. (2000).

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Однією з особливостей фенотипу лімфоцитів кордо-

вої крові, що характеризує їх як клітини зі специфічною імунореактивністю, є відсутність рецепторів до інтерлейкіну-2. Окрім того, близько 30% лімфоцитів кордової крові віднесені до так званих «нульових» клітин через відсутність маркерів будь-яких імунокомпетентних клітин на їхній поверхні Uhm, Wan-Sik & Na (2000).

Вважається, що в пуповинній крові в більшій концентрації, в порівнянні з периферичною кров'ю, присутні CD4+ Т-хелпери типу 2, які продукують інтерлейкін-2. Даний медіатор, як відомо, виявляє інгібуючий вплив у відношенні до цитотоксичної активності Т-клітин, що також узгоджується зі зниженням цитотоксичним ефектом кордової крові Engelfriet, C.P. & Vanderson (2000); Harris, David & Schumacher, M. (1992); Chugunova, L & Shestakova (1999).

На сьогоднішній день у науковій літературі та клінічній практиці гуманітарної медицини накопичено значну інформацію про позитивний вплив кордової крові, як на різні органи, системи і клітинні культури, так і на організм у цілому. На основі кордової крові створені і використовуються в клінічній практиці такі препарати, які відносять до групи біогенних стимуляторів. Основна відмінність кордової крові як біогенного стимулятора полягає в тому, що вона має у своєму складі збалансований комплекс біологічно активних речовин, що беруть участь в індукції, регресії, зворотного інгібування різних

ферментів в органах і тканинах реципієнта, завдяки чому можливий вплив на метаболізм не тільки хворого, але і здорового організму без вираженої патології Murohara, T. & Ikeda, H. & Duan, J.. (2000), Irina, Petrova. (2013).

Кордова кров та її складові компоненти активно використовуються в сучасних біотехнологічних програмах завдяки своїм унікальним властивостям. Останнє десятиріччя характеризується інтенсивним розвитком нового напрямку в медицині – замісної регенеративно-пластичної терапії із використанням плюрипотентних стовбурових клітин кордової крові. Високий клінічний ефект застосування ядро утримуючих клітин і рідких субстратів ембріонального та фетоплацентарного походження зумовлений активним замісним та стимулювальним впливом на функціонально неповноцінні клітини і тканини у окремих органних системах, істотною ініціацією репаративних і метаболічних процесів, імуностимулюючою та імунорегуючою дією.

Останнім часом у клінічну практику впроваджуються різноманітні методики використання із лікувальною метою не тільки цільної кордової крові, а й її плазми та сироватки.

Сироватка та плазма пуповинної крові містить значну концентрацію комплексу репродуктивних імунomodуляторів, цитокінів, адгезивних компонентів, увесь спектр гормонів, що притаманний організму новонародженої тварини, ростові та антипроліферативні фактори, гемопоетини і адаптогени, опіодні пептиди – ендорфіни, енкефаліни, мікроелементи, вітаміни. Однак, незважаючи на підвищений вміст багатьох біо- і імуностимуляторів у кордовій крові, ці речовини знаходяться в збалансованих концентраціях і являють собою біологічно активний комплекс, необхідний для організму, що розвивається та нормалізує обмін речовин при введенні в дорослий організм Rampling, Michael et oll. (1989).

Таким чином, кордова кров, що містить набір специфічних плацентарних білків, гормонів, ростових факторів, цитокінів, гемопоетичних факторів, інтерлейкінів, опіодних пептидів, ферментів і проферментів, вітамінів, мікроелементів та репродуктивних імунomodуляторів, може також знайти широке застосування в практиці ветеринарної хірургії при тих захворюваннях, традиційна комплексна терапія яких передбачає застосування різних біологічних препаратів.

Мета роботи з'ясувати вплив парентерального застосування сироватки кордової крові на показники метаболізму сполучної тканини клінічно здорових тварин та при асептичному запаленні.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили на бичках симентальської породи яким виконували кастрацію закритим методом за загальноприйнятною методикою. Надалі тварин було поділено на дві групи: контрольну та дослідну. Тваринам дослідної групи відразу після кастрації інтраперитоніально вводили по 5 мл криоконсервованої гомологічної сироватки кордової крові. Інтраперитоніальні ін'єкції гомологічної сироватки кордової крові тваринам дослідної групи проводили 1 раз на добу, протягом п'яти днів (всього 5 ін'єкцій).

Кордову кров для отримання сироватки відбирали із судин пуповини під час фізіологічних родів у корів. Сироватку після центрифугування розливали по 5 мл у стерильні пластикові пробірки і піддавали криоконсервації у морозильній камері при 18-20°C, яку зберігали до 3-4 тижнів.

Тваринам контрольної групи інтраперитоніально ін'єктували по 5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду в якості плацебо.

Кров для досліджень у тварин обох груп відбирали до

кастрації, на 5-ту та 11-ту добу досліджень.

У плазмі крові визначали вміст маркерів метаболізму сполучної тканини - гексоз глікопротеїнів (Г-ГП) та глікозаміногліканів (Г-ГАГ) фракційним методом за І. В. Неверовим та Н.І. Титаренко (1979) у орцинолової реакції із фракціонуванням етанолом та цетилпіридиній хлористим.

Рівень церулоплазміну визначали за методикою, що ґрунтується на окисненні п-фенілєндіаміну за участю даного металопроєїну.

Отриманий цифровий матеріал оброблено методами варіаційної статистики з використанням параметричного критерію Стьюдента

Результати досліджень Застосування інтраперитоніальних ін'єкцій сироватки кордової крові дозволяє виразно коригувати рівень гексоз сполучених із білком, глікопротеїнів та глікозаміногліканів у плазмі крові кастрованих тварин. Зокрема, на п'яту добу досліджень вміст гексоз сполучених із білком у плазмі крові тварин контрольної групи зріс з $1925,0 \pm 77,22$ мг/л у інтактних тварин до $2400,0 \pm 141,59$ мг/л ($p < 0,01$), тоді як у дослідній групі вміст гексозовмісних протеїнів проявляв лише тенденцію до зростання і склав $1950,0 \pm 64,62$ мг/л.

Водночас, концентрації глікопротеїнів та глікозаміногліканів у плазмі крові в даний період досліджень мали різноспрямовані зрушення. Так, вміст глікопротеїнів у плазмі крові бичків дослідної групи зріс з $1087,50 \pm 47,96$ мг/л у некастрованих тварин до $1225,0 \pm 47,93$ мг/л ($p < 0,05$), тоді як у контрольній групі їх рівень навпаки проявляв тенденцію до зниження - $925,0 \pm 85,49$ мг/л.

Гіперглікопротеїнемія у кастрованих тварин дослідної групи, очевидно пов'язана із здатністю компонентів сироватки кордової крові посилювати синтез прозапальних глікопротеїнів печінкою та коригувати і модулювати флогогенні реакції організму в цілому.

Дослідження вмісту глікозаміногліканів у плазмі крові тварин яким застосовували інтраперитоніальні ін'єкції сироватки кордової крові вказують на істотне обмеження та гальмування деградації протеогліканових комплексів матриксу сполучної тканини ділянки кастраційної рани порівняно із тваринами контрольної групи.

Зокрема, концентрація основних маркерів руйнації сполучнотканинного матриксу - глікозаміногліканів у плазмі крові тварин контрольної групи зазнає значного зростання до $1375,0 \pm 47,93$ мг/л проти $837,50 \pm 92,31$ мг/л у інтактних тварин, ($p < 0,001$), тоді як при застосуванні інтраперитоніальних ін'єкцій сироватки кордової крові їх рівень навпаки проявляє тенденцію до зниження, складаючи - $725,0 \pm 103,19$ мг/л.

Таким чином, застосування сироватки кордової крові дозволяє обмежити руйнацію сполучнотканинного матриксу та посилює гостро фазну відповідь організму на розвиток запальної реакції. Окрім цього, інтраперитоніальні ін'єкції сироватки кордової крові сприяють збереженню в умовах максимального прояву запальної реакції у кастраційних ранах оптимального індексу співвідношення між рівнем глікозаміногліканів та глікопротеїнів у плазмі крові оперованих тварин - 0,6 проти 0,8 у інтактних тварин та майже 1,5 у контрольній групі.

Наприкінці досліджень (одинадцята доба) рівень глікопротеїнів у плазмі крові тварин дослідної та контрольної груп наблизився до показника некастрованих тварин, склавши $950,0 \pm 64,62$ мг/л в дослідній та $975,0 \pm 62,98$ мг/л у контрольній групі, відповідно.

Водночас, уміст глікозаміногліканів у плазмі крові тварин контрольної групи зріс порівняно із показником некастрованих до $1550,0 \pm 28,90$ мг/л, ($p < 0,001$) а у дослідній до $1450,0 \pm 202,31$ мг/л, ($p < 0,001$), відповідно.

Зростання рівня глікозаміногліканів у період гранулювання та епітелізації кастраційних ран, поряд із затуханням запальної реакції пов'язаний на нашу думку із активацією синтезу і формуванням протеогліканів та колагенових волокон.

При запаленні відбувається швидкий синтез колагену та білково-вуглеводних комплексів сполучної тканини, однак, одночасно із цим прискорюється і деградація колагену та протеогліканових комплексів, тобто ці компоненти у запаленій тканині є незрілими і обмін їх посилюється.

В той же час, при застосуванні сироватки кордової крові рівень глікозаміногліканів в даний період досліджень проявляє тенденцію до зниження відносно значень тварин контрольної групи, що є свідченням формування більш повноцінного колагену та протеогліканового матриксу грануляційної тканини посткастраційних ран.

Поряд із корекцією вмісту в плазмі крові маркерів метаболізму сполучної тканини на тлі застосування сироватки кордової крові, спостерігалася й позитивна клінічна динаміка перебігу ранового процесу, що характеризувалася формуванням помірного запального набряку тканин рани та прискоренням росту грануляційної тканини, і в цілому дозволяє скоротити терміни загоєння кастраційних ран на 5-7 діб порівняно із тваринами контрольної групи.

Дослідження рівня гостро фазного мідьумісного білку - церулоплазміну у плазмі крові кастрованих тварин на п'яту добу спостережень після виконання інтраперитоніальних ін'єкцій сироватки кордової крові свідчать про істотне зростання концентрації даної мідьоксидази з $98,44 \pm 5,16$ мг/мл у інтактних тварин, до $131,25 \pm 7,15$ мг/мл, ($p < 0,002$), тоді як у контрольній групі це зростання було менш виразним і склало $115,94 \pm 4,19$ мг/мл, ($p < 0,02$).

На одинадцятую добу досліджень вміст церулоплазміну у плазмі крові кастрованих тварин зазнавав зниження наближаючись до показника інтактних тварин склавши $109,38 \pm 5,65$ мг/мл у дослідній та $100,63 \pm 5,65$ мг/мл у контрольній групі, відповідно.

Таким чином, застосування інтраперитоніальних ін'єкцій сироватки кордової крові активує синтез церулоплазміну у печінці та експресію даного реактанта гострої фази запальної реакції у плазмі крові, чим попереджається дестабілізація клітинних мембран та процеси ліпопероксидації.

З 413 зразків крові 66 (16%) були SAA +. SAA + зразки мали підвищений рівень загального білка, IgM, IgG і нейтрофіли та зниження лімфоцитів, еозинофілів та зниження рівня альбуміну порівняно зі збірними зразками SAA.

Загальна поширеність серед зразків крові SAA + становила 16%; проте, тварини на прив'язному утриманні, мали набагато вищу поширеність SAA + (26%).

Види та частота запальних та незапальних ознак не спостерігається у день відбору проб.

Аналізуючи наведені дані, можна оцінити наскільки точні отримані дані спостережень за коровами, коли мова йде про SAA як остаточного маркера запалення. Будь-яка корова з запальними ознаками вважалася такою ж, як і корова лише з однією запальною ознакою, тобто всі корови були позитивні або негативні щодо запальних ознак. Конгломерат для кожного класу ферми з виявленням запалення, виміряним щодо SAA як стандарту запалення було виявлено в обох господарствах.

"Позитивний%" - це поширеність SAA для типу ферми. Чутливість є мірою позитивних спостережень щодо запалення щодо всіх позитивних (позитивні за SAA).

Хибно позитивні - це кількість "неправильних" спостережень (виявлене запалення), коли згідно за SAA не було запалення. Кількість хибнопозитивних результатів становила 17 із 347 (5%).

Під час операції неконтрольована або дифузна кровотеча може призвести до множинних клінічних та економічних негативних наслідків для тварини.

Несприятливі ефекти включають:

- Потреба у переливанні крові. Якщо не вдається впоратися належним чином, хірургічна кровотеча збільшує тривалість хірургічної процедури, а також може збільшити потребу пацієнта у переливанні крові.

Серйозні інфекційні та неінфекційні побічні явища, пов'язані з переливанням алогенної крові та продуктів крові. Хоча інфекції, що передаються через переливання крові, зменшились, поінформованість та звітність неінфекційних ускладнень переливання (наприклад, імунологічні реакції, помилки переливання) збільшені та неінфекційні ускладнення в даний час є найбільш поширеною та більш смертоносною групою захворювань, пов'язаних із переливанням крові.

Неправильне переливання компонентів крові, що призводить до гемолітичного переливання реакції та гостра травма легенів, пов'язана з переливанням крові (TRALI), залишаються основними джерелами захворюваності та смертності.

- Зниження температури серцевини. Велика крововтрата під час травматичних операцій або тривалих хірургічних процедур може спричинити зниження серцевої температури пацієнта, і втрата температури має прямий вплив на згортання крові.

Коли температура тіла наближається до 34°C ($93,2^{\circ}\text{F}$), тромбоцити починають втрачати здатність агрегуватися; це відоме як гіпотермічна коагулопатія.

- Тромбоцитопенія. Це поширений гемостатичний дефіцит, який може розвинути під час операції, оскільки масивної крововтрати, що вимагає заміни або після введення гепарину (тобто індукованого гепарином тромбоцитопенія).

Наслідки тромбоцитопенії включають крововиливи або тромботичні події.

- Гіповолемічний шок. Це відбувається в результаті виснаження судинного об'єму від крововиливу під час операції і може зменшити серцевий викид, оскільки серце не може повністю заповнитись. Після того, як пацієнт програє 10% його загального обсягу крові, серцевий викид і центральний тиск починають падати. Як результат, організм компенсує, викликаючи периферичну вазоконстрикцію для поліпшення серцевого поштовху та легеневого газообміну, і відбувається діафорез. Ці зміни можуть призвести до компенсованого шоку, і організм здатний компенсувати втрату об'єму. Однак, якщо втрата крові не припиняється і об'єм замінюється, з часом компенсаторні механізми виходять з ладу.

Значний обсяг досліджень в останні роки був спрямований на профілактику операційних ускладнень. Первинна профілактика в основному націлена на передбаченні фактори ризику навколишнього середовища.

Альтернативною профілактичною стратегією є модифікація регуляторних компонентів імунної системи, зокрема, регуляторних Т-клітин Foxp3 + (Tregs). Існують нові докази на моделях тварин і людей, які свідчать про те, що втрата нор-

мальної імунологічної самотолерантності при хірургічній патології, що є вирішальним етапом його патогенезу, може бути пов'язана з недостатністю Tregs.

Пуповинна кров багата на Tregs, які пригнічують функцію при антигенній стимуляції, а також є джерелом гемопоетичних та плюрипотентних стовбурових клітин. Таким чином, існує суттєве наукове обґрунтування потенціалу пуповинної крові для запобігання або затримки початку хірургічних патологій. Дослідження CoRD свідчить, що може вливання аутологічної пуповинної крові високим ризиком хірургічної патології, що мають сироваткові антитіла до множинних β -клітинних антигенів. Паралельно під час дослідження буде вивчатися імунологічний ефект інфузії пуповинної крові. Це вперше буде проведено таке дослідження хірургічної патології у корів, хоча під час дослідження використовували аутологічну пуповинну кров після початку хірургічних ускладнень. При дослідженні I фази ранового процесу, у якому взяли участь 24 корови (середній вік, 5,1 року), інфузій аутологічної пуповинної крові було пов'язано з тимчасовим збільшенням загальної кількості та наївних трег на 6 та 9 місяців відповідно. Побічних явищ не спостерігалось. Тим не менше, втручання не зберегло функцію β -клітин, оскільки рівень C-пептиду знижувався після інфузії. Однак час після встановлення діагнозу, часто спостерігається швидка втрата маси β -клітин, і це зниження могло статися до введення інфузії.

Оскільки клінічне застосування алотрансплантатів UCSВ набуває значущості, механістичний зв'язок між цими продуктами та регенерацією тканин повинен бути повністю вивчений. Дослідження таких алотрансплантатів зосереджувались головним чином на вмісті стовбурових клітин через їх походження з тканин народження. Однак дослідження на доклінічних моделях дають зрозуміти, що фактично терапевтичний вплив, а не стовбурові клітини, мають реальний терапевтичний вплив *in vivo* Chugunova, L et oll. (1999). Раніше ми показали, що алотрансплантати, отримані з UCSВ, можуть індукувати проліферацію, міграцію та ангиогенез завдяки цитокинам, присутнім в UCSВ. Знання, отримані в результаті постійних досліджень таких алотрансплантатів, спонукали до спроб виявити нові параметри контролю якості, які можуть бути корисними для визначення критеріїв вивільнення придатності. У міру того, як регулятивні настанови продовжуватимуть розвиватися, параметри, що стосуються регенеративних механізмів, також, ймовірно, будуть включені в розробку системи контролю якості. Це перше у своєму роді дослідження з метою вибору набору ознак контролю якості, які можуть бути використані для визначення клінічної придатності алотрансплантатів, отриманих з UCSВ.

Ми перерахували клітинний компонент на додаток до кількісної оцінки цитокинів та ідентифікації нових сигнальних білків, щоб мати повне уявлення про алотрансплантат. Загальна кількість клітин та відсоток життєздатності клітин відповідали серед досліджуваних зразків. Хоча життєздатність клітин та їх метаболічну активність неможливо співвіднести з ефективністю продукту, це свідчить про рівномірність виробничого процесу. Ми виявили значний відсоток життєздатних клітин в UCSВ; однак дуже низька фракція забарвлювалась позитивно на маркери стовбурових клітин згідно з рекомендаціями Міжнародного товариства клітинної терапії Miyahara, Niigaki & Okazaki, et. oll. (2010). Ці дані не виключають можливості присутності стовбурових клітин у клітинах алотрансплантата пуповинної крові. Виділення стовбурових клітин з UCSВ було успішно здійснено раніше із застосуванням специфічних підходів до культури тканин Phadnis, et. oll. (2006);

Samareh Salavati Pour, et. oll. (2020). Цікаво побачити, чи дозволяють клітини UCSВ, культивовані в таких умовах *in vitro* протягом тривалого періоду часу, покращувати імунозабарвлення маркерів поверхні стовбурових клітин. Однак це виходить за рамки цього дослідження оцінки якості і може бути центром майбутніх досліджень. Хоча ми не передбачаємо залежності UCSВ від популяції життєздатних клітин як функції його клінічної вигоди, це демонструє, що методи криоконсервації без ДМСО є щадними, але ефективними для підтримки цих ніжних клітин. Двостороння реакція змішаних лімфоцитів показала, що клітини, що знаходяться в UCSВ, не проліферують, і біологічні ефекти не залежать від метаболічної функції цих клітин. Протеомічне профілювання зразків виявило кілька білків, які можуть впливати на загоєння ран, метаболізм АФК тощо. Наскільки нам відомо, це перший звіт про ідентифікацію глобальних білків, пов'язаних з алотрансплантатами UCSВ. Випадкове відбір зразків для протеомічного профілювання як частина звичайного контролю якості може виявити можливі відхилення у виробничому процесі. Близько 31 цитокини, які відіграють пряму або непряму роль у регенерації тканин, були визначені кількісно з великої когорти донорів і визнані послідовними. Хоча мінливість донорів неминуча, суворі критерії включення-виключення, засновані на кількісному виявленні критичних трофічних факторів, можуть обмежити варіабельність продукту та бути частиною параметра контролю якості.

Для визначення біообтяження донорної пуповинної крові та асептичності природи UCSВ дотримувались рекомендацій cGTP. Менше 10% зданих зразків крові було відхилено через результати серології, що підкреслювали важливість ефективного скринінгу донорів з чітко визначеними критеріями включення-виключення донорів. Обробка в постійно відстежуваному, контрольованому середовищі може різко зменшити мікробне забруднення. Протягом 24 місяців 99,98% продуктів переробки були асептичними. Алотрансплантати, які регулюються як НСТ / Ps, не повинні тестуватися на рівень ендотоксину або імуногенності. Але на основі аналізу повідомленого використання цих алотрансплантатів ці тести можуть мати клінічну значимість. Рівні ендотоксину в усіх випробовуваних продуктах UCSВ становили $<2,5$ ЄС / мл, використовуючи найсуворіші критерії допустимої межі ендотоксину для фармацевтичних препаратів. Тестування рівня ендотоксину на кожній партії донорів може бути включено як звичайний захід контролю якості для забезпечення клінічної безпеки у певних випадках. UCSВ був неімуногенним, як визначено MLR, навпаки, він пригнічував проліферацію алогенних РВМС. Це частково можна віднести до протизапальних цитокинів, таких як IL-6, -10 та -13. Концентрація іншого протизапального цитокину IL-1RA становила приблизно 30000 пг / мл, найвища серед усіх перевірених цитокинів. Клінічні випробування щодо пригнічення активності IL-1 з IL-1RA прийшли до висновку, що це безпечний та ефективний спосіб полегшення GvHD, який не реагував на звичайне лікування [33]. Надалі було б цікаво вивчити вплив UCSВ на пом'якшення GvHD за допомогою р

Незважаючи на очевидну необхідність у добре розроблених дослідженнях для вивчення конкретних терапевтичних застосувань пуповинної крові, існують важливі відмінності у способах збирання, зберігання та забезпечення доступу пуповинної крові у державних та приватних банків, що може вплинути на потенційні дослідження. Державні банки зберігають здані одиниці пуповинної крові для алогенного викорис-

тання, приблизно 3000 одиниць зберігаються щороку в Австралії (близько 1% живонароджених). Швидкість інкасації в державних банках залежить від наявності

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. Застосування компонентів кордової крові при хірургічній патології у тварин є новим та перспективним напрямком патогенетичної та корегуючої запальної реакції терапії.
2. Інтраперитоніальні введення сироватки кордової

крові дозволяють обмежити руйнацію сполучнотканинного матриксу та посилюють і модулюють гостро фазну відповідь організму на розвиток запальної реакції.

В перспективі, подальші дослідження з даної проблеми слід продовжити у напрямку визначення ефективності застосування компонентів кордової крові за акушерсько-гінекологічної та ортопедичної патології у продуктивних тварин.

Список використаної літератури:

1. Barker, Juliet & Krepski, Timothy & Defor, Todd & Davies, Stella & Wagner, John & Weisdorf, Daniel. (2002). Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: Availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 8. 257-60. 10.1053/bbmt.2002.v8.pm12064362.
2. Armson, B.. (2005). Umbilical Cord Blood Banking: Implications for Perinatal Care Providers. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstétrique et gynécologie du Canada : JOGC*. 27. 263-90. 10.1016/S1701-2163(16)30520-5.
3. Thomson, Blythe & Robertson, Kent & Gowan, Darla & Broxmeyer, Hal & Emanuel, David & Kotylo, Patricia & Brahmi, Zacharie & Smith, Franklin. (2000). Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. 96. 2703-2711. 10.1182/blood.V96.8.2703.
4. Gluckman, Eliane & Broxmeyer, HA & Auerbach, Arleen & Friedman, Henry & Douglas, Gordon & Devergie, Agnès & Esperou, Hélène & Thierry, Dominique & Socie, Gerard & Lehn, Pierre. (1989). Hematopoietic Reconstitution in a Patient with Fanconi's Anemia by Means of Umbilical-Cord Blood from an HLA-Identical Sibling. *The New England journal of medicine*. 321. 1174-8. 10.1056/NEJM198910263211707.
5. Engelfriet, C.P. & Vanderson, R. & Wagner, J.E. & Sobocinski, K.A.. (2000). Graft versus Host Disease in Children Who Have Received a Cord Blood or Bone Marrow Transplant from HLA-Identical Siblings. *Vox Sanguinis*. 79. 10.1046/j.1423-0410.2000.79402652.x.
6. Uhm, Wan-Sik & Na, K & Song, G-W & Jung, S-S & Lee, T & Park, Moon Hyang & Yoo, D-H. (2003). Cytokine balance in kidney tissue from lupus nephritis patients. *Rheumatology (Oxford, England)*. 42. 935-8. 10.1093/rheumatology/keg255.
7. Harris, David & Schumacher, M & Locascio, J & Besencon, F & Olson, G & DeLuca, D & Shenker, L & Bard, Judith & Boyse, E. (1992). Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89. 10006-10. 10.1073/pnas.89.21.10006.
8. Chugunova, L & Shestakova, Marina & Shamkhalova, M. (1999). Primenenie glikozaminoglikanov v lechenii diabeticheskoy nefropatii. *Diabetes mellitus*. 34. 10.14341/2072-0351-5562.
9. Murohara, T. & Ikeda, H. & Duan, J.. (2000). Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization.. *J Clin Invest*. 105.
10. Irina, Petrova. (2013). *Biologicheskie-svoystva-novyh-proizvodnyh-uratsila*.
11. Rampling, Michael & Whittingstall, P & Martin, G & Bignall, Simon & Rivers, R & Lissauer, Tom & Bailey, P. (1989). A Comparison of the Rheologic Properties of Neonatal and Adult Blood. *Pediatric research*. 25. 457-60. 10.1203/00006450-198905000-00006.
12. Kordek, Agnieszka & Giedrys-Kalemba, Stefania & Pawlus, Beata & Podraza, Wojciech & Czajka, Ryszard. (2003). Umbilical Cord Blood Serum Procalcitonin Concentration in the Diagnosis of Early Neonatal Infection. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 23. 148-53. 10.1038/sj.jp.7210885.
13. Miyahara, Hiroaki & Okazaki, N & Nagakura, Tomokazu & Korematsu, S & Izumi, T. (2010). Elevated umbilical cord serum TARC/CCL17 levels predict the development of atopic dermatitis in infancy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 41. 186-91. 10.1111/j.1365-2222.2010.03634.x.
14. Phadnis, Smruti & Joglekar, Mugdha & Venkateshan, Vijayalakshmi & Ghaskadbi, Surendra & Hardikar, Anandwardhan & Bhonde, Ramesh. (2006). Human Umbilical Cord Blood Serum Promotes Growth, Proliferation as well as Differentiation of Human Bone Marrow-derived Progenitor Cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*. 42. 283-6. 10.1290/0512087.1.
15. Samareh Salavati Pour, Maryam & Vahidi, Reza & Lashkari, Mahla & Derakhshani, Ali & Ameri, Zahra & Farsinejad, Alireza. (2020). Cord blood serum harvesting by hydroxyethyl starch: a fetal bovine serum alternative in expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 72. 10.1007/s10616-020-00404-9.

Kraevsky Apollinaryi., Doctor of Vet. Science, Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

Musienko Yurii., PhD of Vet. Science, Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

Chekan Olexandr, PhD of Vet. Science, Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

Bondarenko Iryna, PhD of Vet. Science, Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

Grebenik Natakyia. PhD of Vet. Science, Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

Cord blood and the prospects for the use of its components in the practice of veterinary surgery.

The article presents the results of studies of glycoproteins, glycosaminoglycans and ceruloplasmin in the blood plasma of cattle in the dynamics of healing of post-castration wounds using intraperitoneal injections of cord blood serum.

The aim of the study was to determine the effect of parenteral administration of cord blood serum on the metabolism of connective tissue in clinically healthy animals and in aseptic inflammation. The studies were conducted on gobies of Simmental breed

which were castrated by the closed method according to the generally accepted method. Subsequently, the animals were divided into two groups: control and experimental. Immediately after castration, animals of the experimental group were intraperitoneally injected with 5 ml of cryopreserved homologous cord blood serum. Intraperitoneal injections of homologous cord blood serum to animals of the experimental group were performed once a day for five days (5 injections in total).

Cord blood for serum was taken from the umbilical cord vessels during physiological delivery in cows. After centrifugation, the serum was poured into 5 ml sterile plastic tubes and cryopreserved in a freezer at 18–20 ° C, which was stored for 3-4 weeks.

Animals of the control group were intraperitoneally injected with 5 ml of physiological sodium chloride solution as a placebo.

Blood for studies in animals of both groups was taken before castration, on the 5th and 11th day of research.

In the blood plasma, the content of markers of connective tissue metabolism was determined - hexoses of glycoproteins (G-GP) and glycosaminoglycans (G-GAG) by the fractional method according to I.V. Neverov and N.I. Titarenko (1979) in an orcinol reaction with fractionation with ethanol and cetylpyridinium chloride.

The level of ceruloplasmin was determined by the method based on the oxidation of *n*-phenylenediamine with the participation of this metalloprotein.

The resulting digital material was processed by the methods of variation statistics using the parametric student criterion.

Intraperitoneal injections of cord blood serum help maintain the optimal ratio between the level of glycosaminoglycans and glycoproteins in the blood plasma of operated animals under conditions of the maximum manifestation of the inflammatory reaction in castration wounds

It has been established that the use of intraperitoneal administration of cord blood serum allows limiting the destruction of the connective tissue matrix and enhances and modulates the acute phase response of the body to the development of the inflammatory response.

Key words: cord blood, cattle, glycoproteins

ГІСТОАРХІТЕКТОНІКА ЛІМФОЇДНИХ УТВОРЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА МУСКУСНИХ КАЧОК

Логвінова Віта Володимирівна

кандидат ветеринарних наук, старший викладач
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, (Дніпро, Україна)

ORCID: 0000-0002-2084-6850

lohvinova.v.v@dsau.dp.ua

Оліяр Алла Вячеславівна

кандидат ветеринарних наук, доцент
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, (Дніпро, Україна)

ORCID: 0000-0002-8918-2693

oliiar.a.v@dsau.dp.ua

Особливості морфогенезу лімфоїдних структур кишечника свійської птиці, зокрема в період від народження до настання фізіологічної зрілості, коли відбувається інтенсивне формування імунної системи, необхідно враховувати в інтенсивному птахівництві, що визначає широке використання біологічних препаратів з активною антигенною дією. Від здорових не вакцинованих качок відбирали дванадцятипалу, порожню та клубову кишки, досліджували за загальними методиками: макро-мікроанатомію і топографію лімфоїдних структур слизової оболонки тонкої кишки, проводили за методикою Hellman, парафінові гістологічні зрізи забарювали гематоксиліном Ерліха та еозином, азур II-еозином та імпрегнували сріблом за Футом. Вік піддослідних качок: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 та 240 дб. Встановлено, що морфо-функціональна диференціація та спеціалізація лімфоїдних утворень тонкої кишки має вікові та регіональні особливості, відбувається в певній послідовності. В слизовій оболонці дванадцятипалої та клубової кишок качок з 25-добового віку паралельно з дифузною лімфоїдною тканиною відбувається формування ретикулярної стромы лімфатичних вузликів. У зрілому (реактивному) вузлику, зародковому центрі та периферійній частині чітко виділяються мантія, що складається, переважно, з дрібних лімфоцитів. Характерно, що кількість і розмір вузликів збільшується з віком. Ретикулярна сітка лімфатичних вузликів при цьому розріджується, до її часткового витончення, а в подальшому й фрагментації.

Ключові слова: дифузна лімфоїдна тканина, лімфатичні вузлики, агреговані лімфатичні вузлики, лімфоїдні клітини, дванадцятипала, порожня та клубова кишки, мускусна качка.

DOI: <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.5>

Вступ. У сучасних умовах актуальним є дослідження особливостей будови і функції імунної системи продуктивної птиці, зокрема, лімфоїдних структур, асоційованих із слизовою оболонкою трубочкоподібних органів, морфофункціональний статус яких визначає стан природної резистентності та реактивності органів апарату травлення (Birka, 2019; Kotsiumbas et al., 2019). Ця проблема набуває особливого значення в умовах промислового птахівництва, що спричинено негативним впливом антропогенних факторів на показники життєздатності птиці (Makhotina et al., 2020).

Через травну систему в організм птиці проходить величезний потік антигенного матеріалу, стимуляція яким відповідних утворень слизової оболонки кишечника сприяє розвитку, вдосконаленню і диференціації його лімфоїдних утворень, що забезпечують імунний захист як на рівні органа, так і в масштабах всього організму. Для забезпечення відносної сталості внутрішнього середовища травний канал птиці володіє потужними механізмами захисту (GALT – gut associated lymphoid tissue), основними з яких є клітинні (інтраепітеліальні лімфоцити, лімфоцити lamina propria, плазматичні клітини, макрофагоцити та ін.) і тканинні структурні елементи (поодинокі та агреговані лімфатичні вузлики (АЛВ)) (Mazurkevych & Khomych, 2017). Серед лімфоїдних утворень кишечника значне місце за масою лімфоїдної тканини належить АЛВ, які являють собою найбільш високоорганізовані компоненти імунної системи цього органа (Birka, 2019).

Особливості морфогенезу лімфоїдних структур кишечника свійської птиці, особливо в період від народження і до настання фізіологічної зрілості, коли відбувається інтенсивне становлення імунної системи, необхідно пильно враховувати

в умовах інтенсивного птахівництва, яке визначає широке використання біологічних препаратів, що мають активну антигенну дію. Проте, закономірності морфогенезу периферійних лімфоїдних органів найбільш детально досліджені в людини, лабораторних тварин та деяких видів продуктивних ссавців. Особливості будови лімфоїдних структур, асоційованих із слизовими оболонками трубочкоподібних органів мускусної качки до сьогодні залишаються не з'ясованими.

Незважаючи на те, що в останні роки в багатьох країнах Європи мускусні качки та їх гібриди широко використовують для промислового розведення, особливості морфологічного статусу їх лімфоїдних утворень, асоційованих із слизовою оболонкою трубочкоподібних органів, залишаються майже не з'ясованими. Відсутні також відомості щодо закономірностей архітекtonіки ретикулярного остова та динаміки клітинного складу на різних стадіях формування імунних структур тонкої кишки мускусних качок.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Місцева імунна система за твердженням (Makhotina D.S., 2020) травного каналу забезпечує дві функції: 1) розпізнавання та індукцію толерантності до кормових антигенів; 2) блокуючий ефект по відношенню до патогенних мікроорганізмів. Мигдалини здійснюють місцевий захист шляхом виділення в порожнину глотки імуноглобулінів, інтерферону, лізоциму, лімфоцитів, макрофагів і простагландинів. Вони сприяють формуванню імунної пам'яті шляхом утворення клону лімфоцитів, які готують імунну систему до повторної зустрічі з антигенами. Групові лімфатичні вузлики, або ПБ, будучи імунокомпітентними елементами тонкої кишки приймають участь у розпізнаванні кормових антигенів хімісу і формуванні місцевої

імунної відповіді. Імунокомпетентна (лімфоїдна) тканина ШКТ представлена організованими структурами (ПБ, апендикс, мигдалини, лімфатичні вузли) і окремими клітинними елементами (інтраепітеліальні лімфоцити, плазматичні клітини, макрофаги, тучні клітини, гранулоцити). Популяція клітин лімфоїдної тканини різномірна і складається з безлічі груп, підгруп і клонів клітин з різними функціональними властивостями і специфічністю рецепторів до антигенів.

В імунній системі розрізняють центральні і периферичні органи. До центральних органів птиці відносяться: ембріональний жовтковий мішок, кістковий мозок, тимус і клоакальна сумка, а до периферичних - селезінка, залоза Гардера, слізна залоза, дивертикул Меккеля, мигдалини сліпих кишок, ДЛТ трубкоподібних органів. Така розкиданість ЛТ пояснюється тим, що у курей, через відсутність лімфатичних вузлів, речовини, що володіють властивістю антигенів, фіксуються поблизу місць проникнення - в органах травлення і дихання - з подальшим розвитком у відповідь реакції у вигляді активної проліферації лімфоїдних клітин. Якщо ж антиген проникає в кров, то він елімінується і фіксується головним чином в селезінці. Загальна кількість ЛТ у птиць досягає 1% від маси тіла. Експериментально встановлено, що у птиці диференціювання і дозрівання лімфоцитів контролюються двома органами - тимусом і клоакальною сумкою. В тимусі дозрівають і диференціюються Т-лімфоцити. У клоакальній сумці - В-лімфоцити. Таку особливість імунної системи птиці підтвердили (Takeuchi, T., Kitagawa, H., Imagawa, T., & Uehara, M., 1998) при використанні антисироваток проти Т-лімфоцитів і В-лімфоцитів.

Багато робіт присвячено вивченню будови ЛТ тонкої кишки курчат, що по своїм гістологічним характеристикам відповідає пейеровим бляшкам ссавців (Kajiwaga, E., Shigeta, A., Horiuchi, H., Matsuda, H., & Furusawa, S 2003). Як стверджує у своїх дослідженнях Сапін М.Р. ЛТ складається з багаточисельних лімфатичних вузликів, розміщених у власній пластинці слизової оболонки. Поверхня ЛТ направлена в просвіт кишки, представлена ворсинками. Клітини епітелію, що лежать поверх ворсинок, морфологічно ідентичні клітинам ссавців. Як зазначають (Makhotina D.S., Kushch M.M., Miroshnikova O.S. 2020) ПБ — це добре організовані імунокомпетентні структури шлунково-кишкового тракту (ШКТ) птиці. ПБ тонких кишок необхідні для дозрівання Т- і В-лімфоцитів і забезпечення організму секреторним IgA, вони формують імунну відповідь на місцевому рівні й детермінують системну імунну відповідь (Takeuchi, T., Kitagawa, H., Imagawa, T., & Uehara, M., 1998).

В даний час велика увага приділяється лімфоїдним утворенням кишечника. До високоорганізованих утворень кишечника відносять пейерові бляшки, що були вперше описані у людини в 1677 році відомим швейцарським ученим Іоганом Пейером, який вважав, що вони є травними залозами кишечника. Але лише останнім часом було доведено їх участь в реакціях імунітету. У птиці лімфоїдні бляшки зустрічаються в області переходу стравоходу в залозистий відділ шлунку (стравохідна «мигдалина»), в клубовій кишці (пейерові бляшки) і на внутрішній стінці сліпих кишок (сліпокишкові «мигдалини») (Makhotina D.S., Kushch M.M., Miroshnikova O.S. 2020). Серед них найбільш виражені парні сліпокишкові лімфоїдні бляшки, які розташовуються в проксимальних ділянках сліпих кишок. Вони виступають в просвіт кишечника у вигляді округлих утворень, покритих ворсинками (Kalinovskaya, I.G., 2005). Площа, що зайнята сліпокишковими лімфоїдними бляшками, з віком збільшується з 9,0 мм² в 10-ти денному віці до 40,0

мм² в 30-ти денному віці.

ПБ беруть участь у формуванні імунної відповіді в лімфопоезі і рециркуляції лімфоцитів. Вони представлені скупченням ДЛТ і ЛВЗ, які щільно прилягають одне до одного і розміщуються в слизовій оболонці і підслизовій основі кишки. Макроскопічно, зі сторони просвіту кишки ПБ випинаються над поверхню слизової оболонки. На поверхні ПБ помітні ямки, в просвіті яких розміщуються купола групових ЛВЗ (Kalinovskaya, I.G., 2005). Наряду з червоподібним відростком, піднебінними і глотковими мигдалинами, ПБ відносять до високоорганізованих лімфоїдних утворень шлунково-кишкового тракту, що представляють невід'ємний і важливий елемент імунної системи організму. В найбільшій кількості ПБ розміщуються в тонкій кишці ссавців (Havrylin P.M., Nikitina M.O., 2017). В пренатальному періоді онтогенезу формування ПБ у людини характеризується загальними закономірностями: їх закладка починається у стінці клубової кишки.

Основна гістологічна особливість сліпокишкових бляшок - це лімфоїдні утворення, які разом із загальнокишковими залозами, розташовуються в товщі слизової оболонки (Makhotina D.S., Kushch M.M., Miroshnikova O.S., 2020). Лімфоїдна тканина, представлена дифузними скупченнями і вузликами (фолікулами), з'являється у курчат в 15-ти денному віці і досягає максимального розвитку до статевого дозрівання. Надалі відбувається зменшення кількості лімфоїдної тканини і розростання сполучних елементів.

Знання закономірностей морфогенезу лімфоїдних структур кишечника свійської птиці є необхідними для більш глибокого розуміння патогенезу хвороб органів травлення, а також створення ефективних методів імунокорекції, імуностимуляції та імунопрофілактики в умовах її інтенсивного вирощування. Аспекти морфогенезу периферичних лімфоїдних органів найбільш детально досліджені в людини, лабораторних тварин (Havrylin & Nikitina, 2017) та деяких видів продуктивних ссавців (Samoiliuk et al., 2019; Tishkina & Oliiar, 2013). Серед продуктивної птиці найбільш глибоко досліджені пейерові бляшки курей (Jung et al., 2010; Kalinovskaya, 2005), лімфатичні вузли гусей та качок (Birka, 2019). Лімфатичні вузли тонкої кишки – це клітинні скупчення округлої або овальної форми, які складаються з петель ретикулярної тканини, утвореної ретикулярними клітинами, волокнами і клітинами лімфоїдного ряду (лімфоцитів різної величини і ступеня зрілості, плазматичних, макрофагів). У зрілому вузлику розрізняють центр розмноження (гермінативний центр) та периферію (мантію), утворену дрібними клітинами, переважно, малими лімфоцитами, що формують скупчення навколо центру розмноження, в якому клітини лежать більш розріджено, ніж на периферії. Крім центральної і периферичної зон у зрілих лімфатичних вузликах слизової оболонки розрізняють субепітеліальну та навколівузликову зони (Mazurkevych, 2020), а також виділяється обідок з ретикулярних волокон, який утворює своєрідну капсулу і надає їм форму.

Мета. З'ясувати особливості постнатального морфогенезу лімфоїдних утворень слизової оболонки тонкого кишечника мускусних качок.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили в лабораторії гістології, імуноцитохімії та патоморфології Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету. Досліджували дванадцятипалу, порожню та клубову кишки клінічно здорових, не вакцинованих мускусних качок віком 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90,

120, 150, 180, 210 та 240 діб (по 5 голів у кожній групі), вирощених в умовах віварію.

Дослідження макро-мікроанатомії і топографії лімфоїдних структур слизової оболонки кишечника проводили із застосуванням методики тотального фарбування за Хелман. Відібрані органи фіксували у 10%-му розчині формаліну з подальшим виготовленням тотальних парафінових (3-5 мкм) гістологічних зрізів, їх забарвленням гематоксиліном Ерліха та еозином, азур II – еозином та імпрегнацією сріблом за Футом за загальноприйнятими методиками (Hogalskyi et al., 2019). Мікропрепарати досліджували під світловим мікроскопом Leica DM 1000, фото виготовляли з використанням програми LAS V4.12.

На площі зрізу визначали наявність лімфоїдної тканини та різних стадіях її диференціації (скупчення лімфоїдної тканини, лімфатичні вузлики, лімфатичні вузлики з центрами розмноження), стадії розвитку лімфатичних вузликів (дифузна лімфоїдна тканина, предвузлик, лімфатичний вузлик, лімфатичний вузлик з центром розмноження), якісні показники лімфатичних вузликів, характер розміщення лімфоїдної тканини та лімфатичних вузликів у товщі слизової оболонки, а також її особливості.

Експериментальні дослідження проведені із дотриманням вимог статті 26 Закону України №5456-VI від 16.10.2012 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Директиви ЄС 86/609/ЄЕС від 24.11.1986 р., узгоджуються з основними принципами Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986 р.), декларації «Про гуманне ставлення до тварин» (Гельсінкі, 2000 р.) і Першого Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ,

20.09.2001 р.).

Результати дослідження. Структура лімфоїдних утворень слизової оболонки тонкої кишки мускусних качок характеризується рядом закономірностей. Процес морфофункціональної диференціації і спеціалізації лімфоїдних утворень тонкої кишки в мускусних качок відбувається у певній послідовності: від стадії концентрації лімфоїдних клітин (5-, 10-, 15-добова птиця) до формування поодиноких, а в подальшому й агрегованих лімфатичних вузликів без центрів та з центрами розмноження (60-, 90-, 240-добова птиця).

Лімфоїдні структури слизової оболонки дванадцятипалої кишки в мускусних качок представлені виключно дифузною лімфоїдною тканиною (ДЛТ) та поодинокими лімфатичними вузликами (ЛВЗ), що з'являються, починаючи з 20-25-добового віку, кількість яких поступово збільшується до настання статевої зрілості.

Вторинні ЛВЗ, як основні морфологічні маркери імункомпетентності, в слизовій оболонці дванадцятипалої кишки качок виявляються, переважно, в статевозрілих (210-240-добових) особин. Характерні для даного органа ссавців агреговані ЛВЗ у качок у дванадцятипалій кишці не виявляються.

На відміну від дванадцятипалої кишки основними лімфоїдними структурами слизової оболонки порожньої і клубової кишок мускусних качок є агрегати лімфатичних вузликів або пейєрові бляшки (ПБ). В порожній кишці мускусних качок ПБ вперше виявляються в 25-добовому віці і містять всі характерні для даних структур паренхіматозні та стромальні компоненти. В період від 20- до 25-добового віку в слизовій оболонці дванадцятипалої кишки лімфоїдні структури характеризуються переважним розвитком ДЛТ з появою поодиноких ЛВЗ (рис. 1).

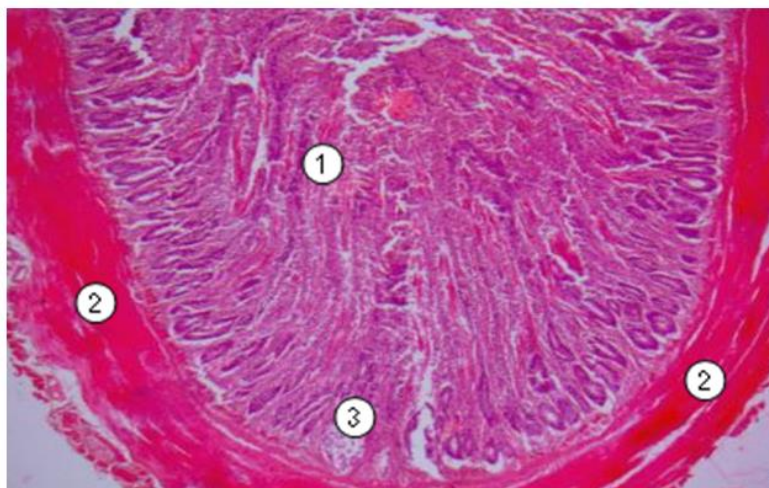


Рис. 1. Дванадцятипала кишка 25-добової мускусної качки: 1 – власна пластинка слизової оболонки, 2 – м'язова оболонка, 3 – лімфатичний вузлик. Заб. гематоксиліном і еозином, $\times 400$, Leica CX100.

У слизовій оболонці порожньої і клубової кишки качок, починаючи з 30-добового віку, паралельно з ДЛТ відмічається формування ретикулярної строми ЛВЗ, що представлена густою сіткою звивистих волокон, які, з'єднуючись між

собою, утворюють дрібні комірки. В подальшому формуються так звані «ретикулярні кошики» (рис. 2). Гермінативний центр ЛВЗ має більш розріджені ретикулярні волокна, між відростками яких розташовуються лімфоцити і макрофагоцити.

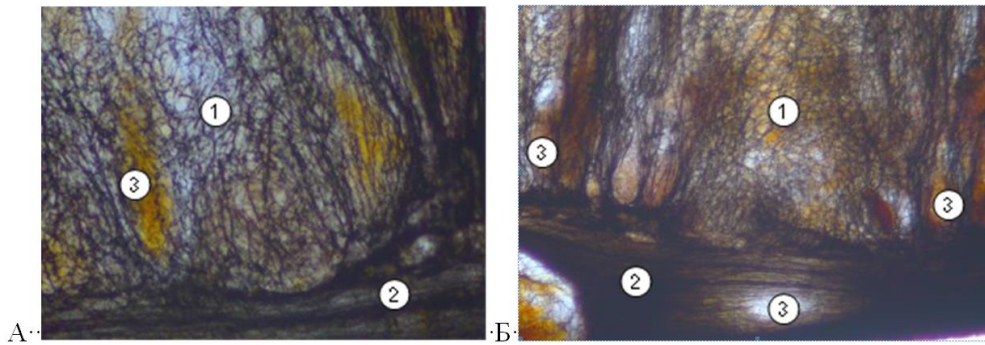


Рис. 2. Порожня кишка 25-добової (А) та 30-добової (Б) мускусної качки: 1 – власна пластинка слизової оболонки, 2 – м'язова оболонка, 3 – лімфатичний вузлик. Імпрегнація азотнокислим сріблом за Футом, $\times 400$, Leica CX100.

Архітектоніка ретикулярних волокон агрегованих ЛВЗ 30-добових мускусних качок характеризується формуванням рівномірних сіток ретикулярних волокон. До 60-добового віку ретикулярні волокна стають більш щільними, розташову-

ються без певної орієнтації. Поміж товстих волокон виявляються тонкі ретикулярні волокна. Переплітаючись між собою і товсті, і тонкі ретикулярні волокна утворюють густу сітку (рис. 3).

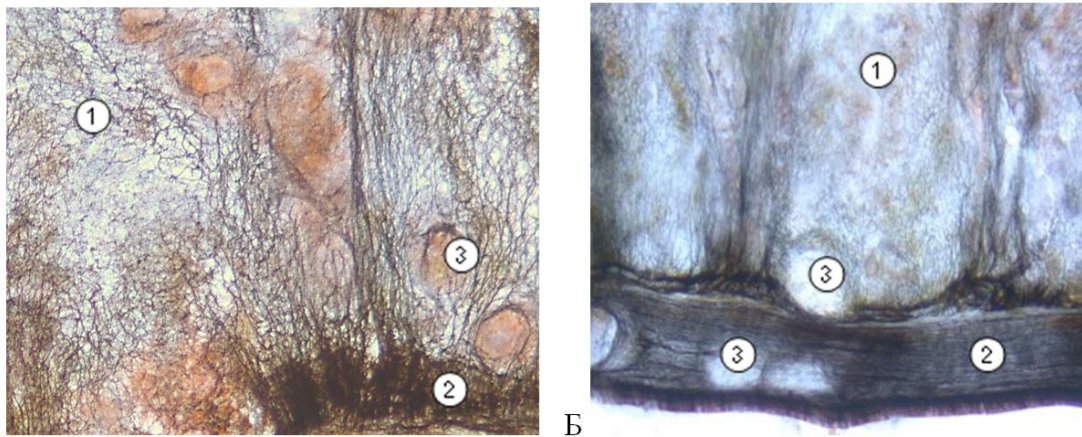


Рис. 3. Порожня кишка 60-добової (А) та 90-добової (Б) мускусної качки: 1 – власна пластинка слизової оболонки, 2 – м'язова оболонка, 3 – лімфатичний вузлик. Імпрегнація азотнокислим сріблом за Футом, $\times 400$, Leica CX100.

Слід відмітити, що повний комплекс морфологічних ознак імунологічної реактивності в ЛВЗ порожньої та клубової кишок виявляється у 60-добової птиці. На тканинному рівні кишкову бляшку формують ЛВЗ, що розміщуються у власній пластинці слизової оболонки, переважно, в ділянці основи кишкових ворсин. ЛВЗ локалізовані серед ДЛТ, яка заповнює проміжки між кишковими ворсинками та криптами, місцями

руйнуючи їх, що має вигляд своєрідних «септ» (рис. 4). Найбільш суттєве збільшення ДЛТ в агрегованих ЛВЗ порожньої кишки мускусних качок відбувається в період з 30- до 60-добового віку. Архітектоніка ретикулярного остова агрегованих та поодиноких ЛВЗ характеризується наявністю сіток ретикулярних волокон, які краще виражені в підслизовій основі.

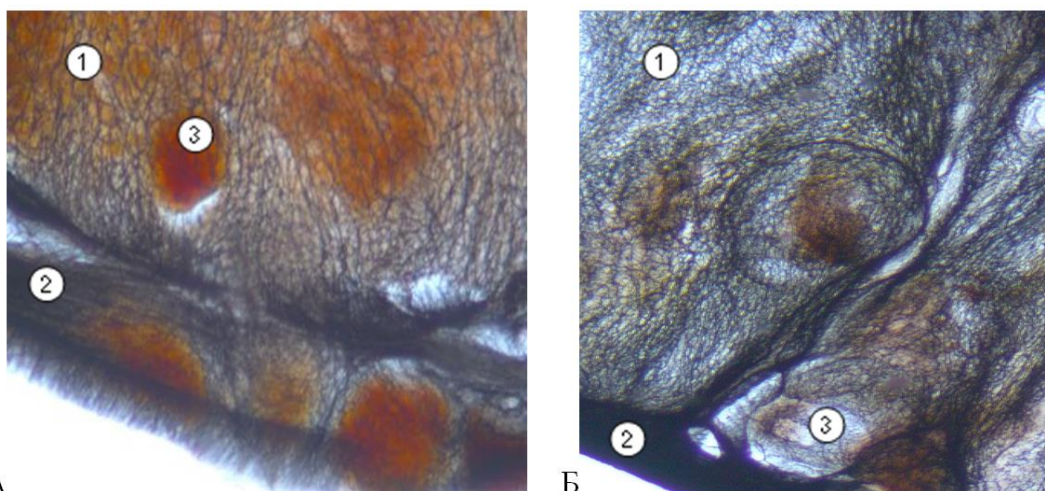


Рис. 4. Клубова кишка 60-добової (А) та 210-добової (Б) мускусної качки: 1 – власна пластинка слизової оболонки, 2 – м'язова оболонка, 3 – лімфатичний вузлик. Імпрегнація азотнокислим сріблом за Футом, $\times 600$, Leica CX100.

Ретикулярна основа вторинних ЛВЗ має великокоміркову структуру із слабо вираженими «ретикулярними кошиками» по периферії. Деякі ЛВЗ пронизують м'язову пластинку слизової оболонки та розміщуються в товщі м'язової оболонки групами по декілька штук, утворюючи скупчення, відмежовані один від одного м'язовими прошарками. Розмір ЛВЗ м'язової оболонки значно поступається тим, що розташовані у власній пластинці слизової оболонки.

Від 120- до 240-добового віку (настання статевої зрілості) в слизовій оболонці всіх відділів тонкої кишки завершується формування ЛВЗ як з центрами, так і без центрів розмноження. В порожній і клубовій кишках збільшується розмір та кількість агрегованих ЛВЗ, в складі яких превалюють ЛВЗ з центрами розмноження (рис. 5).

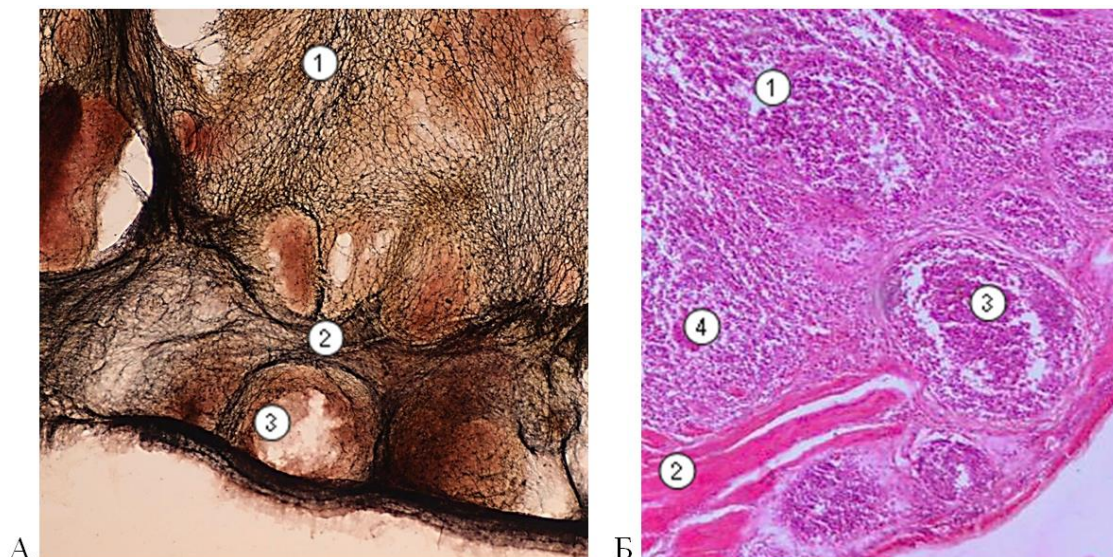


Рис. 5. Клубова кишки 240-добової мускусної качки: 1 – власна пластинка слизової оболонки, 2 – м'язова оболонка, 3 – лімфатичний вузлик, 4 – дифузна лімфоїдна тканина.

А – імпрегнація азотнокислим сріблом за Футом, $\times 400$;
Б – заб. гематоксилином і еозиним, $\times 400$, Leica CX100.

Обговорення та інтерпретація проведеного дослідження, порівняння з дослідженнями інших вчених. Сучасний етап досліджень травної системи визначний тим, що з'являється можливість вивчати процеси на клітинному рівні, а також взаємодію органів і тканин. Для нормального функціонування і виконання своїх фізіологічних функцій - органи травлення мають бути морфологічно сформовані. На особливу увагу заслуговує вивчення морфології і розвитку лімфоїдних структур органів травлення мускусних качок у віковому аспекті в нормі, в умовах наближених до природних, не використовуючи жодних препаратів для вакцинації птиці.

У вітчизняній і зарубіжній літературі по порівняльній анатомії хребетних і анатомії свійської птиці дані про особливості динаміки відділів кишечника птиці розрізнені і суперечливі. Всі дослідники і автори анатомії і фізіології свійської птиці вказують, що в період постембріонального онтогенезу зростання органів ШКТ йде нерівномірно (Kotsiumbas I.Ya., Zhyla M.I., Piatnychko O.M., Shkodiak N.V., 2019) встановили, що у курчат найбільше інтенсивне зростання органів ШКТ випереджає збільшення маси тіла спостерігається в перші 15 діб після вилуплення, а за даними (Polyshchuk, SV., 1991) в період від 30 до 90-денного віку курей.

Основу імунних утворень кишечника складає лімфоїдна тканина, яка в своєму розвитку послідовно проходить 4 рівні структурної організації: ДЛТ \rightarrow передвузлик \rightarrow первинний ЛВЗ \rightarrow вторинний ЛВЗ. Першим етапом є утворення лімфоїдних скупчень, щільність розташування яких по периферії менша, ніж в центрі і поки без чіткої межі між ними. Це так звана дифузна або передвузликова стадія. Другим етапом вважається поява щільних, округлої або овальної форми груп клітинних елементів, що формують ЛВЗ, які

прийнято розглядати як готовність лімфоїдної тканини до імунного захисту організму. Появу в ЛВЗ гермінативних або світлих центрів «Setory», або «реактивних центрів», що збільшуються в розмірах при антигенній дії на організм, прийнято вважати третім етапом становлення імуногенезу. Четвертим етапом є зворотний їх розвиток – зникнення ЛВЗ при віковій інволюції. На нашу думку, структурно-функціональні зони ПБ тонкої кишки мускусних качок ідентичні відповідним структурам ссавців (Lohvinova et al., 2020). Лімфоїдна тканина представлена ретикулярними елементами, малими і середніми лімфоцитами, плазматичними клітинами, макрофагами. В зрілих ЛВЗ кишечника (Batuev., 1984) виділяє обідок з ретикулярних волокон, які утворюють своєрідну капсулу і надають їм форму. ЛВЗ органів травлення – це клітинні скупчення округлої або овальної форми, які складаються з петель ретикулярної тканини, утвореної ретикулярними клітинами, волокнами і клітинами лімфоїдного ряду (лімфоцитів різної величини і ступеня зрілості, плазмоцитів, макрофагів) (Kajiwara et al., 2003).

Архітектоніка ретикулярних волокон не завжди однакова. В одних бляшках волокна розміщені по периферії вузликів, що формує волокнистий обідок сітчастої капсули. Цей обідок з ретикулярних волокон або повністю оточує вузлик, або переривається з боку вузлика, оберненого до епітеліального покриву кишки. В одній бляшці може зустрітись обидва види вузликів – з ретикулярними обідками і без них. Ретикулярний обідок (Batuev., 1984) розглядає як капсулу деяких вузликів і вважає, що саме обідок надає властиву їм форму. ЛВЗ з ретикулярним обідком є морфологічно більш зрілими. Формування ретикулярних обідків ЛВЗ у складі ПБ співпадає з морфофункціональною зрілістю даних органів.

У роботах (Kotsiumbas et al., 2019), (Mazurkevych &

Khomych., 2017) та (Kalinovskaya., 2005) підтверджується, що імунні утворення, які забезпечують специфічну імунологічну реактивність, активно формуються в перші тижні та місяці життя поступово, починаючи з лімфоїдних структур слизової оболонки органів травлення і закінчуючи лімфоїдними органами внутрішнього середовища організму.

Згідно даних (Batuev., 1984) в лімфоїдних бляшках, що локалізуються в дистальних відділах клубової кишки, лімфатичні вузлики розміщені в слизовій оболонці та в підслизовій основі, порушуючи цілісність м'язової пластинки слизової оболонки. Така ж картина спостерігається при їх розміщенні в декілька рядів або при наявності дуже великих вузликів. Ці дані співпадають з результатами наших досліджень, але не повністю. Відмінністю є те, що автор наголошує на особливостях будови лише в дистальному відділі клубової кишки, а в дослідженій нами птиці, дані особливості будови ПБ присутні як в порожній, так і в клубовій кишках. В інших відділах порожньої і клубової кишок, як стверджує (Batuev., 1984) лімфоїдні вузлики залягають

головним чином в товщі слизової оболонки і рідше в підслизовій основі. З цими даними співпадають дослідження (Mazurkevych & Khomych., 2017) та (Kalinovskaya., 2005).

Висновки з проведеного дослідження і перспективи подальших розвідок у цьому напрямку. Диференціація лімфоїдних структур порожньої та клубової кишок має особливості та відбувається в певній послідовності. Перший етап (5-25 діб) характеризується переважним розвитком ДЛТ; другий (25-60 діб) – формуванням ЛВЗ без центрів та з центрами розмноження; третій (60-240 діб) – активним утворенням агрегованих ЛВЗ, появою центрів розмноження і формуванням вторинних ЛВЗ; четвертий (90-240 діб) – збільшенням розмірів ЛВЗ та локалізацією майже по всій товщі власної пластинки слизової оболонки, що призводить до місцевого руйнування кишкових залоз та утворення своєрідних «септ». У подальшому ЛВЗ пронизують м'язову пластинку слизової оболонки та розміщуються також у м'язовій оболонці групами, відмежованими м'язовими прошарками.

References:

1. Batuev K.M. (1984). Yzmenenye kletochnoho sostava ahrehyrovannykh follykulov tonkoi kyshky beloï krisi pry kormlenyy preparatom DDT. Morfohenez lymfatycheskoi i krovenosnoi system v ykh tkanei v norme, pry patolohyy u v eksperymente [Changes in the cellular composition of the ahrehyrovannyh follicles of the small intestine of the white cress when fed the drug DDT. Morphogenesis of lymphatic and circulatory systems of tissues in norm, at pathology in experiment]. Perm, 23-25.
2. Birka E.V. (2019)/ Dynamyka morfoheneza lymfoydnoi tkany i ee topohrafiya v stenke lymfoydnoho dyvertykula husei. [Dynamics of morphogenesis of lymphoid tissue and its topography in the wall of the lymphoid diverticulum of Geese] *Uchenie zapysky uchrezhdeniya obrazovaniya «Vytebskaia hosudarstvennaia akademiya veterynarnoi medytsyni»*. 55(2). 7-10.
3. Havrylin P.M., Nikitina M.O. (2017). Mikroanatomichni osoblyvosti kyshechnyku ta imunnykh struktur, asotsiovanykh z yoho slyzovoiu obolonkoiu, u kroliv miasnoho napriamu vykorystannia. [Microanatomical features of the intestine and immune structures associated with the mucous membrane in rabbits for direct use]. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 7, №11. 42-46. doi.org/10.32819/2019.71008 (in Ukrainian).
4. Horalsky, L. P., Khomych, V. T., & Kononsky, O. I. (2019). Osnovy histolohichnoyi tekhniki i morfofunktsionalni metody doslidzen u normi ta pry patolohiyi [Fundamentals of histological techniques and morphological methods of investigation in normal and pathological conditions]. Zhytomyr, Polissya Publ (in Ukrainian).
5. Jung, C., Hugot, J.-P., & Barreau, F. (2010). Peyer's patches: The immune sensors of the intestine. *International Journal of Inflammation*, 823710, 1-12.
6. Kalinovskaya, I.G. (2005). Growth and development of Peyer's plaque of the ileum of chickens in the postnatal period of ontogeny. *News of Dnipropetrovsk State Agrarian University*. 2. 229-232 (in Ukrainian).
7. Kotsiumbas I.Ya., Zhyla M.I., Piatnychko O.M., Shkodiak N.V. (2019). Morfofunktsionalni osoblyvosti imunnoi systemy ptytsi. Naukovo-tekhnichnyi biuleten Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu veterynarykh preparativ ta kormovykh dobavok i Instytutu biolohii tvaryn. 20(1). 255-262.
8. Kajiwara, E., Shigeta, A., Horiuchi, H., Matsuda, H., & Furusawa, S. (2003). Development of Peyer's patch and cecal tonsil in gut-associated lymphoid tissues in the chicken embryo. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65(5). 607-614.
9. Lohvinova V. V., Oliiar A. V., Lieshchova M. O. (2020). Formuvannia imunnykh struktur tonkoi kyshky muskusnykh kachok. [Formation of immune structures of a small intestine of musk ducks] *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 8(1). 50-55. <https://doi.org/10.32819/2020.81008>
10. Mazurkevych T.A., Khomych V.T. (2017). Osoblyvosti lokalizatsii limfoidnoi tkany v imunnykh utvorenniakh stinky kyshechnyku, dyvertykuli mekkellia i slipokyshkovykh dyvertikulakh kachok [Features of localization of lymphoid tissue in the immune formation of the intestinal wall, diverticula of Meckellia and slipokyshkovykh diverticula of ducks]. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii imeni S.Z. Gzhytskoho*. 19 (82). S. 30-35.
11. Mazurkevych T.A. (2020)/ Morfofunktsionalni osoblyvosti imunnykh utvoren kyshechnyky sviiskoi kachky (Anas platyrhynchos var. domestica) u postnatalnomu periodi ontogenezu [Morphofunctional features of immune formations of intestinal duckweed (Anas platyrhynchos var. Domestica) in the postnatal period of ontogeny] : avtoref. dys. d-ra vet. nauk : 16.00.02. Kyiv, 2020. 44.
12. Makhotina D.S., Kushch M.M., Miroshnikova O.S. (2020). Osoblyvosti mikroskopichnoi budovy slipykh kyshok kachok. [Features of microscopic structure of blind duck guts]. *Veterynariia, tekhnolohiia tvarynnystva ta pryrodokorystuvannia. [Veterinary medicine, technology of animal husbandry and nature management]*. №6. 56-63.
13. Samoiliuk V.V., Havrylin P.M., Bilyi D.D., Kozii M.S., Maslikov S.M. (2019). Topohrafiia i mikrostrukturna orhanizatsiia limfoidnykh utvoriv, asotsiovanykh zi slyzovoiu obolonkoiu kyshechnyky porosiat [Topography and microstructural organization of lymphoid formations associated with the mucous membrane of the intestinal piglets]. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 7(4). 189-197.
14. Tishkina N.M., Oliiar A.V. (2013). Tsytoarkhitektonika parenkhimy limfatychnykh vuzliv shlunkovo-kyshkovoho traktu

porosiat u rannomu postnatalnomu periodi ontogenezu. [Cytoarchitectonics of parenchymal lymph nodes of the gastrointestinal tract of piglets in the early postnatal period of ontogeny]. *Problemy zoonzhenerii ta vet. medytsyny: Zb. nauk. prats Kharkivsk. derzh. zoovet. akad. Kharkiv [Problems of zooenigineering and vet. medytsyny]*, 27 (2). 40-43.

Vita Logvinova, PhD, Dnipro State Agrarian and Economic University, (Dnipro, Ukraine)

Alla Oliyar, PhD, Dnipro State Agrarian and Economic University, (Dnipro, Ukraine)

Histoarchitectonics of lymphoid formations of the mucosa of the small intestine of muscy ducks

Features of morphogenesis of intestinal lymphoid structures of poultry, especially in the period from birth to the onset of physiological maturity, when there is an intensive formation of the immune system, must be carefully considered in intensive poultry, which determines the widespread use of biological drugs with active antigenic action. From healthy unvaccinated ducks were selected duodenum and ileum, examined by general methods: macro-microanatomy and topography of lymphoid structures of the mucous membrane of the small intestine, performed by Hellman method, paraffin histological sections were stained Ehrlich hematoxylin and eosin, azure II-eosin and impregnated with silver by Foot. Age of experimental ducks: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 days. It is established that morpho-functional differentiation and specialization of lymphoid formations of the small intestine has age and regional features, occurs in a certain sequence. In the mucous membrane of the duodenum and ileum of ducklings from 25 days of age in parallel with the diffuse lymphoid tissue is the formation of the reticular stroma of the lymph nodes. In the mature (reactive) nodule, the embryonic center and the peripheral part, the mantle, which consists mainly of small lymphocytes, is clearly distinguished. Characteristically, the number and size of nodules increases with age. The reticular network of lymph nodes, at the same time is thinned, to its partial thinning, and further and fragmentation.

Key words: *diffuse lymphoid tissue, lymphatic nodules, aggregated lymphatic nodules, lymphoid cells, duodenal, caecal and jejunum, muscy ducks*

**ВИВЧЕННЯ ВІДТВОРЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ КРОЛЕМАТОК ГІБРИДНИХ КРОСІВ
ПРИ ВИКОРИСТАННІ ШТУЧНОГО ОСІМЕНІННЯ У КОМПЛЕКСІ З ГОРМОНОТЕРАПІЄЮ
В УМОВАХ ПРИВАТНОЇ КРОЛЕФЕРМИ**

Мирошниченко Інна Ігорівна

асистент

Дніпровський державний аграрно-економічний університет

ORCID: 0000-0003-3816-7036

hibert.i.i@dsau.dp.ua

Жоріна Любов Василівна

старша викладачка

Дніпровський державний аграрно-економічний університет

ORCID: 0000-0002-9472-0716

zhorina.l.v@dsau.dp.ua

У статті подано інформацію щодо технологічного процесу штучного осіменіння кроликів (ШО): отримання сперми, оцінка якості еякуляту та його розведення, оцінка технологій введення сперми у статеві шляхи самок що були проведенні на базі приватної кролеферми, яка спеціалізується на розведенні гібридних кросів кроликів, а саме ліній HYPLUS. Ефективність ШО залежить на сам перед від якості батьківського поголів'я та методу введення сперми. Вагінальне введення є найбільш простим і найменш інвазійним методом. Перед проведенням ШО усіх тварин необхідно обстежити з метою виключення фізіологічних відхилень. За для отримання максимальних показників усіх кролиць запліднюють у період статевої охоти, синхронізація якої досягається введенням гормональних препаратів на основі сироватки гонадотропіну жеребних кобил (ГСЖК). Ефективність використання препарату визначається за допомогою зовнішнього огляду статевих органів. Для осіменіння обираються кролиці з вираженою припухлюю, овальною петлею, яскраво червоного або бузкового кольору складчастість слизової оболонки якої добре виражена. Значним фактором в успішності ШО є вибір оптимального часу. Найбільш ефективним за часом осіменіння необхідно проводити не пізніше ніж за 30-60 хвилин після отримання сперми її оцінки і розведення. Оптимальна ступінь розведення сперми визначається за її якістю і густиною. Сперму у кроликів поділяють на три типи: густу, середню і рідку. Для розведення використовують різноманітні розчинники, які мають у своєму складі речовини для підтримання енергетичного балансу сперматозоїдів, буферні компоненти, солі, комплекс антибіотиків широкого спектру дії та компоненти для підтримання осмотичного тиску та стабілізації кислотності (pH). Для введення сперми використовують спеціалізовані одноразові катетери, після чого необхідне внутрішньо м'язове введення синтетичного нанопептиду, аналогу гонадотропін-релізінг гормону ЛГ-РТ-люберина для стимуляції виходу зрілих яйцеклітин з яєчників у статеві шляхи кролиці. Для одержання прибутків і швидкості відтворення поголів'я було розроблено найбільш ефективну методику відтворення з використанням гормональних засобів Фоллігон, Сергон 500 і Сурфагон за оптимальною схемою і дозами, та використання напів щільних окролів для максимальної ефективності і недопущення виснаження маточного поголів'я.

Ключові слова: кролі, сперма, сурфагон, сергон, фоллігон, лактуючі самиці

DOI: <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.6>

Вступ. Основною рушійною силою у розвитку кролівництва на сьогодні є масштабна селекційна робота, яка основана на оцінці та максимальному використанні для репродукції стад високо цінних плідників-поліпшувачів. Така методика прогресу реалізується насамперед завдяки використанню методу штучного осіменіння, творцем якого є *Ivanov (Ostashko F. I., Pavlenko M. P., Byelikov A. A., 1999)*. Штучне осіменіння сільськогосподарських тварин це одне з найбільш значущих та ефективних науково-технічних розробок в області тваринництва, що є невід'ємною складовою роботи, яка спрямована на отримання необхідних породних і продуктивних характеристик поголів'я. Результат роботи та її ефективність залежать на сам перед від кваліфікації фахівця, а також від забезпечення професійним ветеринарним інструментом. Ключове значення має правильна організація процесу в залежності від виду тварини. Успіх виконання завдань щодо наросування виробництва продуктів тваринництва поряд зі зміцненням кормової бази може бути тільки при інтенсивному використанні біологічних можливостей маточного поголів'я і цінних племінних виробників. Найбільш ефективний і швидкий метод підвищення продуктивності, та поліпшення пород-

них і племінних якостей тварин – це максимальне використання видатних самців і самок, що можливо тільки при широкому застосуванні штучного осіменіння у сільському господарстві (Studencov A.P., 1999).

Однією з основних цілей штучного осіменіння у кролівництві – поліпшення репродуктивної здатності кролика та збільшення кількості поголів'я. Використання штучного осіменіння як прогресивного методу розмноження одночасно як на невеликих приватних кролефермах, так і на масштабних підприємствах, дозволяє забезпечити необхідний підбір батьківських пар, виростити якісний ремонтний молодняк, здійснювати заходи з диспансеризації маточного поголів'я, та забезпечити правильну експлуатацію тварин зі збереженням їх продуктивних можливостей в умовах швидко зростаючого попиту. Актуальними проблемами в галузі кролівництва України на сьогодні були і залишаються, технологія штучного осіменіння і ритмічного відтворення кроликів, яку можливо успішно вирішити за умов належного утримання, повноцінної годівлі, селекційно-племінної роботи, та правильному технічному супроводі оскільки при низькому рівні цих вимог у господарствах, незалежно від форм їх власності, досягти високих показників відтворення практично не можливо (Norejko A. Y.,

2013).

Штучне осіменіння кроликів було розроблено і впроваджено впродовж останніх десятиліть, і все більше набирає популярності не тільки у масштабах кролеферм, а й у підсобних господарствах. Про те, зважаючи на деякі труднощі, що пов'язані з фізіологічними особливостями кроликів (необхідністю провокування овуляції), а також технічного і матеріального забезпечення, все ж таки існують невирішені питання для його повної інтеграції у господарствах з можливістю отримання максимальних показників продуктивності (Zdanovich, S. N., Dobudko, A. N., Kostenko, A. Yu., & Hohlova, T. N., 2019; Pecsí Tamás., 2007; V.M. Agij, F.K. Nod, N.P. Griga., 2011).

Аналіз останніх досліджень та публікацій. На сьогодні існують різні технічні і методологічні розробки щодо впровадження штучного осіменіння на великих кролефермах, та технології відбору, зберігання і використання сперми у подальшому. Інтенсифікація відтворної здатності кроликів практично неможлива без використання наступних заходів: стимуляція, синхронізація і відновлення статевої охоти та овуляції у кролематок з використанням різноманітних методів та фармакологічних препаратів, що впливають на фолікуло- і лютеогенез в яєчниках самок, а також методів відновлення і активації відтворної функції у самців-плідників (Pabat V.O., Vinnichuk D.T., Goncharenko I.V., Agij V.M., 2018; Lisin, V. I., & Sushko, A. B., 2013; V.M. Agij, F.K. Nod, N.P. Griga., 2011). Спираючись на велику кількість досліджень, вважається більш доцільним спаровування кролематок звичайних порід у віці 5–6 міс, а скоростиглих у віці від 4-х міс, коли вони досягають не менше 4–4,5 кг живої маси. В свою чергу самців можливо використовувати для спаровування у віці від 5–6 місяців. Фізіологічно у кроликів після трьох років відтворна здатність помітно знижується, у зв'язку з чим термін їх використання не повинен перевищувати 3–4 роки, а при інтенсивному промислового вирощуванні цей термін може скорочуватись вдвічі (Norejko A. Y., 2013; Pozdnyakova, V. F., Anfimova, A. M., Bravilova, E. A., & Pinkus, A. I., 2018). Отримання високоякісного біологічного матеріалу від самців-плідників є важливим критерієм майбутніх високих показників при використанні штучного осіменіння як в промислових господарствах, так і в умовах племінних кролеферм. Для відбору високоякісної сперми визначають необхідні показники якості: перлинно-білий або білий колір, без фізичних забруднень калом, сечою та шерстю, а також кількість еякуляту від 0,5 мл та більше. Правильне розведення сперми дозволяє зберегти її ефективність на протязі 12 годин. Використання високоякісного біологічного матеріалу при штучному осіменінні дозволяє значно знизити витрати та покращити показники плідності та продуктивності кроликів. Використання якісної сперми при штучного запліднення також забезпечує зниження витрат на утримання великої кількості самців (при використанні природного осіменіння 1 самець використовується на 4–6 самок, а при штучному осіменінні сперма від одного самця можливо використати для осіменіння 30–50 самок) (Moreva S.A., 2017; Ekimova A.A., 2020).

За рахунок використання методики штучного запліднення у кролівництві, згідно досліджень, можливо на 20% знизити вимушене вибракування самок, у зв'язку із зменшенням вірогідності контамінації патогенними мікроорганізмами через еякулят, що в подальшому може призвести до безпліддя або абортів. Успіх осіменіння взаємозалежний від здатності самиць приходити в стан еструса (статевої охоти). На сьогодні цьому питанню присвячена велика кількість досліджень та публікацій, що вивчають методи стимуляції статевої охоти у

самок за допомогою як гормональної терапії, так і альтернативні способи. Одночасно вивчаються фактори, що впливають на якість еякуляту у самців: методи відбору біологічного матеріалу, техніку зберігання, заморожування та розморожування сперми, частоту еякуляції та інше. Дослідження іспанських вчених довели, що комплектація самців у невеликі групи за декілька годин до відбору сперми сприяє збільшенню в об'ємі їх еякуляту, з одночасним збільшенням доз у 2–3 рази. Дослідження французьких вчених визначило, що оптимальний ступінь розбавлення сперми складає 1:5, при якому підвищується як ефективність запліднення, так і кількість новонароджених кроленят (Plotnikov V.G., 2010).

Необхідність гормональної терапії у кролівництві, при використанні штучного запліднення, обумовлене фізіологічними особливостями репродуктивної системи кролиць. В першу чергу, через те що, в природних умовах овуляція у самок виникає завдяки нейроендокринного рефлексу, який провокується під час коїтусу, та призводить, в свою чергу, до викиду лютеїнізуючого гормону (ЛГ). За допомогою дії ЛГ запускається процес дозрівання фолікулів та ооцитів, яке через 12 годин закінчується овуляцією. Тому, відповідно при використанні штучного запліднення, необхідно проводити гормональну стимуляцію для провокування штучного процесу овуляції (Lisin V.I., Sushko A.B., 2013). Серед гормональних препаратів для стимуляції дозрівання яйцеклітин в основному застосовують – ФСГ (фолікул стимулюючий гормон). Діюча речовина препарату – сироватковий гонадотропін жеребних кобил (СГЖК), який володіє як фолікулостимулюючою, так і лютеїнізуючою активністю, а також характеризується міжвидовою специфічністю. Гонадотропін стимулює ріст та розвитку фолікулів у кролиць, а також провокує скорочення матки, у самців, в свою чергу, підсилює функцію інтерстиціальних клітин у сім'яниках, підвищує синтез тестостерону, сперматогенез та статеву активність в цілому. Під час введення гонадотропіну, він досить швидко всмоктується у кров, при цьому максимальна концентрація діючої речовини у крові досягається через 2 години, та підтримується впродовж 6 годин після одноразової ін'єкції. Попередніми дослідженнями встановлено, що достатньо 20 І.О. для внутрішньо м'язового введення препарату на кролематку, в наслідок чого на протязі 48 год на поверхні яєчників утворюються дозрілі яйцеклітини. На сьогодні результати цих досліджень успішно використовують на практиці (Pabat V.O., Vinnichuk D.T., Goncharenko I.V., Agij V.M., 2018). Незважаючи на те, що метод штучного осіменіння для широкого використання у сільському господарстві був запропонований вченим *Ivanov* ще в 1899 році для лікування безпліддя у високоцінних сільськогосподарських тварин, він активно використовується і в сучасному тваринництві. В умовах як великих господарств, так і на дрібних фермах, ШО активно застосовується для покращення продуктивних якостей тварин (ВРХ, вівці, коні, свині) та планованого збільшення їх поголів'я (Studencov A.P. 1999).

Методика штучного осіменіння у кролівництві була запроваджена близько 50-ти років тому, перші розробки присвячені для використання в умовах великих кролеферм належать Науково-дослідному інституту хутрового звірівництва та кролівництва СРСР. В цьому науковому інституті були досліджені організаційні питання по впровадженню методики та розроблена технологія штучного запліднення що використовується й досі.

На сьогодні велика кількість публікацій щодо використання штучного запліднення у кролівництві носить узагаль-

нений та теоретичний характер, де описують техніку проведення штучного запліднення, формування та структурування стада, діагностику сукрольності, які здебільшого направлені на стандартні породи кролів сільськогосподарського призначення (Norejko A. Y., 2013; Moreva S. A., 2017; Pozdnyakova, V. F., Anfimova, A. M., Bravilova, E. A., & Pinkus, A. I., 2018).

Публікації щодо оцінки відтворної здатності гібридних кросів кролів з представленими даними щодо використання гормональних речовин Фолімагу (аналог Фолігону) у дозах 5 мл та Сурфагону у дозі 3 мл на тварину, на наш погляд не є достовірними та викликають запитання, щодо економічної доцільності використання таких доз препаратів та стан тварин після такої гормональної стимуляції (Zdanovich, S. N., Dobudko, A. N., Kostenko, A. Yu., & Hohlova, T. N., 2019). Данні щодо використання Сурфагону для індукції овуляції у кролематок в дозах 0,2 мл на тварину підтверджені дослідженнями на восьми приватних кролефермах України (Lisin, V. I., & Sushko, A. B., 2013).

При дотриманні раціональної методики відтворення кроликів, можливо досягнути значного приросту, за рахунок отримання 7 окролів на протязі року. Однією з основних причин для використання штучного осіменіння у кролівництві є фізіологія тварин даного віку. Внаслідок того, що ці тварини дуже чутливі до дії факторів зовнішнього середовища, агресивна дія яких може суттєво знизити статеву і фізичну активність як самців так і самок, їхньої схильності до парування а також виношування та турботі за приплодом. Зміна сезонів також може негативно вплинути на ймовірність вагітності та виношування кроленят. У природі кролі здатні знаходитись у стані статевої охоти від початку зими до середини весни, у літній період та восени досягти статевої охоти фізіологічно досить складно. Таким чином, фактично єдиним способом на сьогодні для усунення всіх небажаних обставин та факторів в умовах кролеферм, є використання штучного осіменіння. Цей метод дозволяє якомога точніше планувати роботу на підприємстві, зі значним зниженням збитків внаслідок дії різноманітних факторів при відтворенні.

Визначення факторів що впливають на статеву активність і якісні показники отриманої сперми, умов годівлі та утримання, правил і режиму експлуатації тварин, технології організації і проведення осіменіння та застосування ефективних методів лікування є однією з умов успішного отримання якісного поголів'я. Всі ці критерії неодмінно мають великий вплив на відтворну здатність кроликів яка безперечно пов'язана з багатоплідністю, скороспілістю, інтенсивністю росту самок і самців, живою вагою приплоду при відлученні та його збереженістю, а також середньодобовими приростами отриманого поголів'я на відгодівлі.

Мета роботи – вивчення відтворювальної здатності кролематок в умовах приватної кролеферми та порівняти результати при використанні гормональної терапії.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на базі приватної кролеферми у Запорізькій області, що спеціалізується на вирощуванні гібридних кросів HYPLUS, та має 450 голів маточного поголів'я і 20 самців. Усі тварини утримувались в оснащеному, добре вентильованому приміщенні, у спеціалізованих клітках, зі збалансованим раціоном, який сформували з урахуванням потреб кожної біологічної групи кроликів та спрямовані на інтенсивне вирощування продуктивного батьківського поголів'я, з постійним доступом до питної води. Згідно з технологією утримання, в приміщеннях підтримували постійний температурний режим 20-23 С, та

світловий день дорівнював 12 годин.

Дослідження передбачали апробацію у господарстві технологічних процесів відбору, оцінки, оптимального ступеня розведення сперми, кількість разової спермо-дозы для подальшого її використання, застосування біологічно-активних препаратів та гормонів для індукції овуляції у кролематок з метою інтенсифікації їх відтворної здатності, а також визначення оптимальної позиції для уникнення травмування чи дискомфорту при проведенні осіменіння. Для штучного осіменіння були відібрані клінічно здорової тварини - самиці, що відповідали наступним параметрам: вік від 120 діб, розвинуті статеві органи, добра вгодваність, жива вага від 3,5 кг та відсутність зовнішніх ознак захворювань, - самці в свою чергу були віком від 7 місяців та вагою від 5 кг, функціонально активні щодо самиці. Тварини були розділені на дві гомогенні групи по 25 самиць у кожній. У першій дослідній групі були використані два гормональних препарати: Фолігон (для стимуляції овуляції у дозі 40 МЕ на одну тварину) та Сурфагон (фолікул стимулюючий гормон у дозі 0,2 мл на тварину), а у другій дослідній групі для стимуляції овуляції використовували препарат Сергон 500 (у дозі 50 МЕ на одну тварину) а для стимуляції фолікулів також використовували Сурфагон у аналогічній дозі порівняно з першою групою. Препарати дослідним тваринам вводили одноразово, за допомогою внутрішньо м'язових ін'єкцій. За 48 годин перед ШО самиць в обох групах оглядали на прояв ознак статевої охоти. Після народження кроленят були проведені дослідження їх якісних та кількісних характеристик. Для порівняння досліджуваних показників та їхніх між групових різниць використовували Т – критерій Ст'юдента, а результат вважали вірогідним після $p < 0,05$. У таблиці прийняті такі умовні позначення: * - $p < 0,05$, **.

Результати та обговорення. У кролівництві існує декілька основних технологій, до яких відноситься щільні (на 7-14 день після попередніх пологів) та на пів щільні окроли (на 18-21 день після попередніх пологів). Для недопущення швидкого виснаження самок та максимального збереження поголів'я було вирішено здійснювати штучне осіменіння у господарстві на 18 день після попередніх пологів. Групи тварин сформували з 50 самиць після першого вдалого окролу. За тиждень до осіменіння самок було суттєво знижені втручання, які могли б викликати стрес у кролиці, за винятком тих, що стимулювали функцію відтворення, та включали в себе:

1. Збільшення світлового дня — зміна програми освітлення з 12-ти на 16-годинний світловий день.
2. Збільшення норми годування за 7 днів до штучного осіменіння.
3. Вітамінізація — додавання до води підвищених доз вітаміну Е.
4. Синхронізація статевої охоти - в/м введення гормону «Фолігон» та «Сергон» за 48 години до осіменіння в дозах 40 МЕ та 50 МЕ відповідно з метою стимуляції фолікулярного дозрівання.

У день штучного осіменіння у самців був проведений відбір сперми, з оцінкою її якості та її розведення. Збір еякуляту проводили з використанням штучної вагіни, яку заправляли гарячою водою температурою 55-60 С. Перед використанням до штучної вагіни приєднали спеціальні скляні флакони (спермо приймачі), що використовуються для кожного самця окремо, після чого змастили вазеліном для зниження травматизації (Рис. 1).



Рис.1 Штучна вагіна з одноразовим скляним спермо приймачем

Відбір сперми відбувається за допомогою підсадних самців, у яких відсутній рефлекс садки. Після взяття сперми смермоприймач переносять в лабораторне приміщення з температурою не нижче 25 С. Для збереження якості сперми і виконання всіх необхідних вимог асептики та антисептики,

лабораторія кролеферми обладнана необхідним наступним забезпеченням: мікроскоп, столик з підігрівом, піпетка з одноразовими насадками, одноразові шприци для зручності у дозуванні розчинника (Рис. 2).

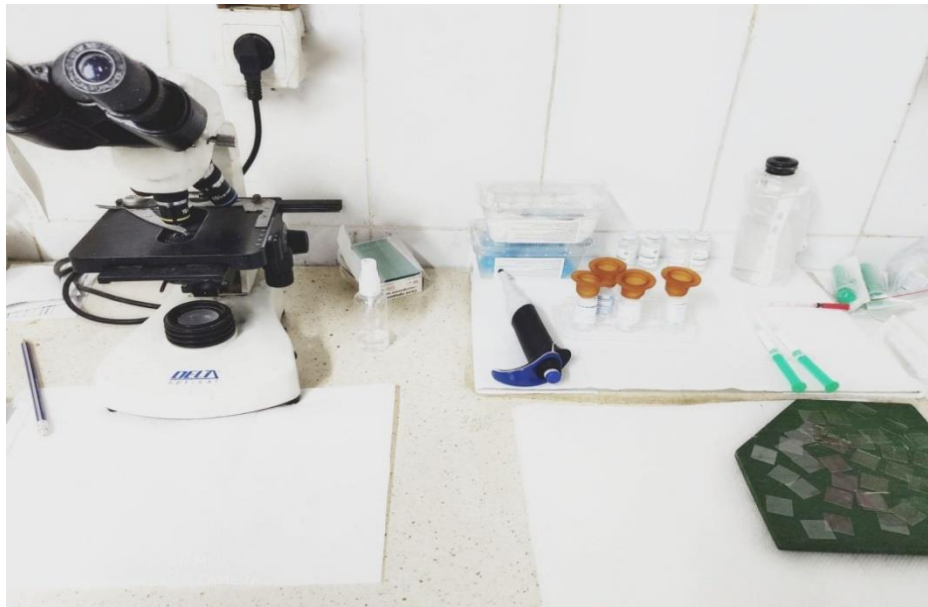


Рис.2 Обладнана лабораторія для оцінки якості сперми

Оцінка якості сперми проводилась в наступні етапи:

1. Оцінювання нерозведеної сперми при збільшенні мікроскопа 1: 100.
2. Оцінювання розбавленої сперми кожного самця при збільшенні мікроскопа 1: 200 методом роздавленої краплі.
3. Оцінювання розбавленої сперми від 3 самців (змішана), з нанесенням трьох крапель на предметне скло.
4. Результати оцінки сперми заносили в індивідуальну картку самця.

Ступінь розведення сперми залежить від її оцінки і розбавляється згідно якості: густу в 10 разів (1: 9), середню в 8 (1:7) і рідку в 5 разів (1: 4).

Для розведення сперми використовували спеціалізований розчинник у складі якого: глікокол – 1,7 г, ЕДТА – 0,8 г, бікарбонат натрію – 0,2 г, полівініловий спирт – 1 г, жовток свіжого курячого яйця – 5 мл, вода дистильована – 100 мл.

Відомо, що статева система у кролематок має анатомічні особливості, які характеризуються наявністю подвійної

матки (у якій відсутнє тіло і є два роги та дві шийки), тому вагітність може перебігати у обидвох або у одному з них, що має великий вплив на відтворювальну здатність тварин. В наслідок цієї особливості для успішного штучного осіменіння сперму необхідно вводити безпосередньо в шийку матки.

Перед початком осіменіння був проведений зовнішній огляд статевих органів самок та візуально дана оцінка готовності самиць до запліднення. Давати оцінку готовності кролиць до покриття за станом зовнішніх статевих органів було запропоновано Borsuk (1945). Ним була розроблена і запропонована п'ятибальна система оцінки цього стану. Для визначення ступеня готовності самки до покриття за цим способом, слід натискаючи на червний кут статевої щілини, розкрити її. Під час огляду тварин було з'ясовано, що всі піддослідні самки були готові до покриття, та мали оцінку від 3 до 5 балів з відповідним кольором петлі (Таблиця 1).

Визначення готовності кролематок до парування

Групи самок	Форма петлі	Колір петлі	Оцінка	
I	7	Овальна, кут практично не візуалізується, відмічаються складки слизової	Яскраво-червона, кут червоний	4
	18	Припухла, складчастість слизової різко виражена, кут відсутній	Бузова (фіолетова)	5
II	8	Дещо збільшена у нижній частині кута	Червона, кут білий	3
	10	Овальна, кут практично не візуалізується, відмічаються складки слизової	Яскраво-червона, кут червоний	4
	7	Припухла, складчастість слизової різко виражена, кут відсутній	Бузова (фіолетова)	5

Для штучного осіменіння відбирали самок з оцінкою статевих органів від 3 до 5 балів, у яких вірогідність успішної

вагітності найвища (Рис. 3).

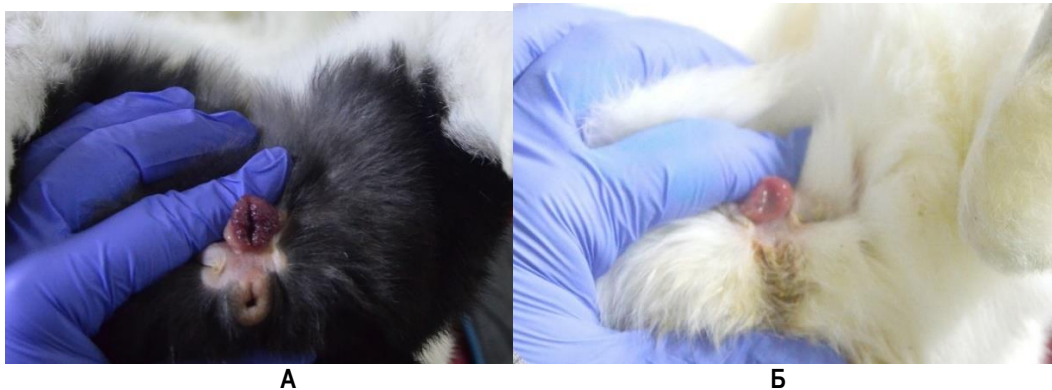


Рис 3. Статеві органи самиць перед осіменінням: А- оцінка 5, Б- оцінка 4

Після фіксації самки за вуха, холку та круп, проводили осіменіння з використанням спеціального шприца з одноразовим катетером, який змінювався після кожної самки. Для осіменіння кролиць використовували катетери, якими запліднюють овець. Звужений кінець катетера обрізали кінець (2 см) та зігнули під кутом 45°. Далі в шприц набирали 0,5 мл

розведеної сперми і вводили у піхву. Катетер шприца вводили на всю його довжину і з натисканням поршня виливали сперму у піхву. Відразу після введення сперми здійснювали ін'єкцію гормону «сурфагону» в дозі 0,2 мл, для стимуляції овуляції (Рис.4).



Рис 4. Техніка штучного осіменіння

Після осіменіння самиць повертали у клітку і заносили данні (дату і номер самця) у особову картку. Тривалість вагітності у кролематок складає 30-32 дні. Зазвичай, початок окролу настає на 31 день після проведення штучного запліднення. Для синхронізації окролів в обох групах за один день,

ми використовували ін'єкцію Окситоцину у дозі 0,5 мл на самицю (для тих самиць які самостійно не народили). Після пологів, було проведено клінічний огляд кролиць та кроленят. Ефективність застосування штучного осіменіння в умовах приватної кролеферми в Запорізькій області, представлена в таблиці 2.

Таблиця 2.

Ефективність штучного осіменіння при застосування гормональної терапії (n = 25, X ± SD)

Показники ефективності ШО (5 серій)	I група	II група
Покрито самок	25	25
З них окролилося (в середньому за 5 серій)	22,8 ± 1,32 (90 %)	20 ± 1,67 (80 %)
Кількість кроленят за всіма новонародженими	9,68 ± 1,52*	8,16 ± 0,92*
Кількість за живими новонародженими	8,84 ± 1,19*	7,52 ± 0,94*

Примітка: * P > 0,05; у порівнянні між групами

Аналіз отриманих результатів показує, що використання препаратів Фолігону та Сурфагону (перша дослідна група) забезпечує ефективність штучного осіменіння в межах 90 % ($22,8 \pm 1,32$ в середньому за 5 осіменінь), при цьому середнє значення приплоду дорівнює $9,68 \pm 1,52$ кроленят на самку, показник живих новонароджених склав $8,84 \pm 1,19$. Ефективність застосування для штучного осіменіння послідовно препаратів Сергон 500 та Сурфогон (друга дослідна група) склала 80% ($20 \pm 1,67$ в середньому за 5 осіменінь), показники приплоду дорівнювали - $8,16 \pm 0,92$ кроленят на самку, показник живих новонароджених склав відповідно $7,52 \pm 0,94$.

Таким чином, застосування для штучного запліднення кролиць препаратів Фолігон (доза 40 МЕ на одну тварину) та

Сурфогон (доза 0,2 мл на тварину) більш ефективно, ніж введення самицям кролів Сергону 500 (доза 50 МЕ на одну тварину) та Сурфогону (доза 0,2 мл на тварину).

Висновки:

1. Методом штучного осіменіння можливо запліднити більшу кількість самок за один день, і виключити ймовірні розповсюдження захворювань у межах кролеферми.

2. Технологія осіменіння дозволяє здійснювати ефективний облік стану стада продуктивних кролів і його структуру.

3. При використанні препаратів Фолігон у дозі 40 МЕ на одну тварину за 48 годин до осіменіння і Сурфагону у дозі 0,2 мл на тварину для індукції овуляції після осіменіння можливо досягти високих показників і отримати високої вихід здорових кроленят.

References:

- Ostashko, F.I., Pavlenko, M.P., Byelikov, A.A. (1999). Teoriya i praktika biologiyi rozmnozheniya ta shtuchnogo osimeninnya silskogospodarskih tvarin. [Theory and practice of reproductive biology and artificial insemination of agricultural animals]. *Zbirnik naukovih prac. – Institut tvarinnictva UAAN [Collection of scientific works. - Institute of Animal Husbandry UAAS]*, 40, 38–39.
- Studencov, A.P. (1999). Veterinarnoe akusherstvo, ginekologiya i biotekhnika rozmnozheniya. [Veterinary obstetrics, gynecology and biotechnology of reproduction.], Kolos. 495.
- Norejko, A.Y. (2013). Iskusstvennoe osemnenie-perspektivnoe napravlenie pri razvedenii myasnyh porod krolikov. [Artificial insemination-promising direction in the breeding of meat breeds of rabbits]. *Naukovij visnik Nacionalnogo universitetu biosursiv i prirodokoristuvannya Ukraini. Ser.: Tehnologiya virobництва i pererobki produkciyi tvarinnictva [Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Ser.: Technology of production and processing of products of farming]*, 190, 279-286.
- Moreva S.A. (2017). Isskustvennoe osemnenie krolikov [Artificial insemination of rabbits]. *Molodezh i nauka [Youth and science]*, 4.1, 48-48.
- Ekimova A.A. (2020). Iskusstvennoe osemnenie krolikov. [Artificial insemination of rabbits]. *Molodezh i nauka [Youth and science]*, 2, 18.
- Pabat V.O., Vinnichuk D.T., Goncharenko I.V., Agij V.M. (2018). Krolivnictvo z osnovami genetiki ta rozvedennya : navch. posib [Rabbit breeding with the basics of genetics and breeding: textbook]. Kyiv: Lira Publishing House, 164.
- Plotnikov, V. G. (2010). Evolyuciya tehnologij v krolikovodstve [Evolution of technologies in rabbit breeding]. *Krolikovodstvo i zverovodstvo [Rabbit breeding and fur animal husbandry]*, 1, 17-22.
- Pozdnyakova, V. F., Anfimova, A. M., Bravilova, E. A., & Pinkus, A. I. (2018). Iskusstvennoe osemnenie krolchih na promyshlennyh kompleksah. [Artificial insemination of rabbits on industrial complexes]. www.issledo.ru Redakcionnaya kollegiya, 94.
- Zdanovich, S. N., Dobudko, A. N., Kostenko, A. Yu., & Hohlova, T. N. (2019). Ocenka vosproizvoditelnoj sposobnosti krolchih porody Hicol, myasnogo napravleniya produktivnosti, pri ih iskusstvennom osemnenii [Estimation of reproductive ability of rabbit breeds Hicol, meat direction of productivity, at their artificial insemination]. *Aktualnye voprosy selskohozyajstvennoj biologii [Current issues of agricultural biology]*, (3), 48-58.
- Lisin, V. I., & Sushko, A. B. (2013). Rezultaty primeneniya Surfagona v praktike iskusstvennogo osemneniya krolikov [The results of the use of Surfagon in the practice of artificial insemination of rabbits]. *Naukovo-tehnichnij byuleten [Scientific and technical bulletin]*, Lviv, 109 (1), 174-181.
- Peci Tamas (2007). Hazi emlosallatok mesterseges termekenyitese. Debrecen. Mezogazda Kiado, 411.
- Agij, V.M., Nod, F.K., Griga, N.P. (2011). Teoriya ta praktika novoyi reproduktivnoyi tehnologiyi u krolivnictvi [Theory and practice of new reproductive technology in rabbit breeding]. *Naukovo-tehnichnij byuleten [Scientific and technical bulletin]*, Lviv, 1–2, 394–398

Inna Myroshnychenko, Dnipro State Agrarian and Economic University

Lyubov Zhorina, PhD, Dnipro State Agrarian and Economic University

Determination of the reproductive capacity of rabbits of hybrid crosses when using artificial insemination in combination with hormone therapy in a private rabbit farm

The article provides an information on the technological process of artificial insemination of rabbits: obtaining sperm, evaluating the quality of ejaculate and its breeding, evaluation of technologies for the introduction of sperm into the genital tract of females that were carried out on the basis of a private rabbit farm, specializing in breeding hybrid rabbits, namely HYPLUS lines. The effectiveness of artificial insemination depends on the quality of the parent stock and the method of semen administration. Vaginal injection is the simplest and least invasive method. Before artificial insemination, all animals should be inspected to avoid physiological abnormalities. In order to obtain maximum performance, all rabbits are fertilized during the period of sexual hunting, synchronization of which is achieved by the introduction of hormonal preparations based on the serum of gonadotropin foal mares (GSHK). The effectiveness of the drug is determined by an external examination of the genitals. For fertilization, rabbits with a pronounced swollen, oval loop, bright red or lilac color, the foldability of the mucous membrane of which is well expressed are selected. A significant factor in the success of artificial insemination is the choice of the optimal time. The most effective time of fertilization should be performed no later than 30-60

minutes after receiving semen for evaluation and breeding. The optimum degree of sperm breeding is determined by its quality and density. Rabbit semen is divided into three types: thick, medium and rare. Various solvents are used for dilution, which include substances to maintain the energy balance of sperm, buffer components, salts, a broad spectrum of antibiotics, and components to maintain osmotic pressure and acid stabilization (pH). Specialized disposable catheters are used for semen administration, followed by the intramuscular administration of a synthetic nanopeptide, an analogue of gonadotropin-releasing hormone LH-RH-Luliberin, to stimulate the exit of mature ovarium from the ovaries into the reproductive tract. The most effective reproduction technique was developed using the Folligon and Surfagon hormonal drugs for optimal profitability and rate of reproduction of rabbit, and the use of semi-dense birth for maximum efficiency and to prevent rabbit depletion.

Key words: rabbits, sperm, surfagon, sergon, folligon, lactating females

МОНІТОРИНГ РІЗНИХ ФОРМ МАСТИТУ У ГОСПОДАРСТВАХ СУМСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Титух Ярослав Вікторович

аспірант

Сумський національний аграрний університет (м. Суми, Україна)

ORCID: 0000-0002-2504-0928

yaroslavvet@gmail.com

В статті викладені результати моніторингу маститу корів у Сумській області. Мастит, спричинений інфекційними збудниками, досі вважається згубним для молочних тварин, впливає на їх добробут, а також несе величезні економічні збитки молочній галузі через зниження продуктивності та збільшення вибракування.

Дослідження проводили на молочних фермах Сумської області. Процедури поводження з тваринами в рамках дослідження були затверджені Комітетом з етики Сумського національного аграрного університету. Тварин утримують у вільних стійлах. Доїння відбувається тричі на день. Досліди проводили на коровах у 1-5 лактації, що належали до стада голштинської породи великої рогатої худоби.

В результаті проведення досліджень було встановлено, що субклінічні форми маститу у молочних господарства виявляються набагато частіше, ніж клінічні. Захворювання корів на субклінічний мастит контролювали за кількістю соматичних клітин (КСК) у молоці. Найчастіше корови уражуються на субклінічний мастит (СМ) у перші місяці після отелення через виникнення фізіологічного стресу у тварини. Захворювання поступово зменшуються під кінець періоду лактації і знову виникає рецидив в період запуску. Однак у здорових корів кількість соматичних клітин в молоці може коливатись протягом всього періоду лактації в межах фізіологічної норми. У хворих тварин КСК різко збільшується і може переходити мастит з субклінічної форми у клінічну через ненадання своєчасного лікування.

При проведенні моніторингу маститу різної форми у корів в господарствах Сумської області встановлено, що субклінічна форма маститу діагностувалась частіше ніж клінічна у Сумському районі на 33,4 %; у Лебединському – на 17,8 %; у Конотопському – на 45,4 %; у Шосткінському – на 42,8 %; у Роменському – на 34,3 %; у Охтирському – на 21,9 %. Встановлено, що пік розвитку субклінічного маститу приходиться на 7-10 добу запалення і повертається до початкових значень за два тижні. За результатами визначення основного складу мікрофлори у молоці корів встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %).

Ключові слова: корови, субклінічний мастит, клінічний мастит, збудники субклінічного маститу, лактація.

DOI: <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.7>

Вступ. Мастит, спричинений інфекційними збудниками, досі вважається згубним для молочних тварин, впливає на їх добробут, а також несе економічно величезні збитки молочній галузі через зниження продуктивності та збільшення вибракування. Мастит великої рогатої худоби - це запалення молочних залоз (вимиені) великої рогатої худоби в більшості випадків спричинене бактеріальними збудниками. Звичайна діагностика ґрунтується на розпізнаванні клінічної та субклінічної форм захворювання. Це підкреслює важливість ранньої та швидкої ідентифікації / виявлення етіологічних агентів на рівні ферми, для якої розроблено декілька діагностичних методик. Існує багато причин, які сприяють виникненню та поширенню маститу у господарствах серед молочного стада. Не належний санітарний стан приміщень та нехтування проведенням санації вим'я перед доїнням може поширювати збудників маститу у стаді. Дезінфекція доїльних апаратів та обладнання також має важливе значення. Своєчасна діагностика та терапія субклінічного маститу у тварин в господарствах зменшує ризик поширення цього захворювання.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Мастит - це хвороба, яка має великий вплив на добробут тварин. Також це негативно позначається на прибутках фермерів і призводить до великих втрат виробництва в молочному секторі в усьому світі (Bardhan, 2013; Sinha et al., 2014).

Мастит великої рогатої худоби - це запалення молочних залоз (інтрамаммарне запалення) у корів. Захворювання спричинений в основному бактеріальними інфекціями, і на підставі епідеміології підрозділяється на два типи: контагіозний мастит і мастит, викликаний бактеріями з навколишнього середовища (Das et al., 2018). Перший викликається заразними

бактеріями, в тому числі *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) і *Mycoplasma spp.* які передаються від інфікованої корови здоровій корові зазвичай під час доїння через руки, рушники або доїльний апарат, який діє як резервуар для бактерій. І навпаки, екологічний мастит викликається бактеріями, які поширюються в основному за межами доїльного залу, тобто бактерії-збудники потрапляють з навколишнього середовища. Для них природнім субстратом розмноження є підстилка, ґрунт, гній, фекалії і вода (Halasa et al., 2007).

Мастит великої рогатої худоби призводить до збільшення витрат на отримання молока в тому, що стосується виробництва молока. Більш того, це також негативно впливає на склад молока, а також на його цінність (Kalinska et al., 2017). Мастит в значній мірі залежить від методів лікування; і, таким чином, вимагає більш досконалих технічних і біологічних методів, а також відповідних заохочень і стимулів. Фермери та ветеринарні лікарі повинні працювати відповідно до офіційних інструкцій по використанню обов'язкових протимікробних засобів (Klaas and Zadoks 2018). Протягом останнього століття були досягнуті значні успіхи в боротьбі з маститом; але через мінливу динаміку популяції, структури стада і більш суворих стандартів переробників, мастит стає складною хворобою і залишається головною проблемою молочної промисловості. Таким чином, необхідні подальші дослідження в цій області (Ruegg, 2017).

Мастит у великої рогатої худоби є важливою економічною проблемою в усьому світі, включаючи Канаду (Aghamohammadi et al., 2018), Німеччину (Hamann, 2001), Сполучене Королівство (Bennett et al., 1999), Нідерланди (Hogeveen et al., 2011) і Сполучені Штати Америки (Hadrach et

al., 2018). Мастит великої рогатої худоби пов'язаний зі щоденною втратою від 1,0 до 2,5 кг молока протягом перших двох тижнів після початку і загальної втратою від 110 до 552 кг протягом всієї лактації в залежності від кількості і часу виникнення. Мастит також має тривалий вплив на надої, оскільки корови не відновлюють свій піковий уділ в решту лактації. Незважаючи на різні передові методи управління розведенням великої рогатої худоби в молочному секторі, мастит і зараз залишається серйозною хворобою і однією з основних економічних проблем фермерів і власників молочних господарств. Крім того, споживання молока, ураженого маститом, може бути шкідливим для людини, оскільки патогени, стійкі до протимікробних препаратів, можуть передаватися через заражене непастеризоване молоко; отже, це також серйозна небезпека для громадської охорони здоров'я (Oliver and Murinda, 2012). Крім того, ризики для здоров'я, пов'язані з підвищеною стійкістю мікробів і залишками антибіотиків в молоці, призвели до збільшення споживчого попиту на органічні продукти, оскільки вони вироблені з допомогою традиційних сільськогосподарських систем, більш здорові і безпечні для споживання (Ruegg, 2009). Через зоонозної загрози молоко при маститі не можна вживати і продавати, що призводить до великих економічних втрат (Sharun et al., 2021). Заражене вим'я знижує вартість тварин на ринку і лягає економічним тягарем на власника через витрати на лікування.

Метою роботи було провести моніторинг поширеності маститу у молочних господарствах Сумської області.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на молочних фермах сумської області. Процедури поводження з тваринами в рамках дослідження були затверджені Комітетом з етики Сумського національного аграрного університету (затвердження №: 2017/01). Тварин утримують у вільних стійлах. Доїння відбувається тричі на день. Досліди проводили на коровах у 1-5 лактації, що належали до стада голштинської породи великої рогатої худоби.

Експериментальних тварин розподіляли в окремі короби після підтвердження тесту на субклінічний мастит. Зразки молока для дослідження збирали під час ранкового доїння з кожної чверті вимені у кількості 50 мл щотижня, починаючи з 7-го дня після отелення. Все дослідження проводилось відповідно до відповідних рекомендацій та норм.

Каліфорнійський тест на мастит використовували для вивчення тварин на субклінічний мастит (Bhulto et al., 2012) та мікроскопічний тест для підрахунку соматичних клітин (Prescott and Breed, 2010). Також у молоці мікробіологічними методами визначали мікроорганізми-збудники субклінічного маститу.

Результати та обговорення. У роботі був проведений діагностичний моніторинг поширеності маститу у молочних господарствах Сумської області.

Таблиця 1

Поширеність захворювань корів на мастит у господарствах Сумської області за період 2017–2020 роки

Господарства	Кількість хворих тварин на мастит(%)	
	Клінічна форма	Субклінічна форма
Сумський район	23,5	56,9
Лебединський район	18,7	36,5
Конотопський район	36,3	81,7
Шосткінський район	25,4	68,2
Роменський район	22,3	56,6
Охтирський район	21,5	43,4

В результаті проведених досліджень з'ясовано, що субклінічні форми маститу у молочних господарства виявляються набагато частіше, ніж клінічні. Так на молочно-товарних фермах субклінічна форма маститу діагностувалась частіше у Сумському районі на 33,4 %; у Лебединському – на 17,8 %; у Конотопському – на 45,4 %; у Шосткінському – на 42,8 %; у Роменському – на 34,3 %; у Охтирському – на 21,9 %. Отримані результати обумовлені санітарними умовами утримання корів, технологією доїння та періодом лактації.

Захворювання корів на субклінічний мастит контролю-

вали за кількістю соматичних клітин (КСК) у молоці. Найчастіше корови уражуються на субклінічний мастит (СМ) у перші місяці після отелу через виникнення фізіологічного стресу у тварини. Захворювання поступово зменшуються пі кінець періоду лактації і знову виникає рецидив в період запуску. Однак у здорових корів кількість соматичних клітин в молоці може коливатись протягом всього періоду лактації в межах фізіологічної норми. У хворих тварин КСК різко збільшується і може переходити мастит з субклінічної форми у клінічну через не надання своєчасного лікування.

Таблиця 2

Кількість соматичних клітин у молоці корів за субклінічного маститу (M ± m, n = 10)

Лактація	Кількість соматичних клітин в молоці, тис/см ³				
	Контроль (здорові тварини)	Період захворювання тварин (доба)			
		Початок	7	10	15
1	75,3 ±4,3	8234,3* ±123,5	15432,7* ±116,5	20012,4* ±275,0	9634,4* ±132,2
2	80,5 ±4,2	9672,8* ±129,2	17236,6* ±118,8	23412,4* ±156,2	10453,6* ±120,3
3	78,5 ±3,5	10032,3* ±145,0	14784,3* ±123,5	25345,2* ±135,5	11234,5* ±164,3
4	79,5 ±4,5	9340,5* ±136,2	14355,2* ±128,7	21138,2* ±175,6	9543,9* ±112,5
5	82,6 ±4,5	10006,5* ±153,6	16322,8* ±145,3	23546,8* ±175,1	11456,4* ±128,7

Примітка.* – P ≤ 0,05 порівняно з контролем

За результатами проведених досліджень встановлено, що в першу лактацію у корів спостерігали збільшення

КСК на сьому добу захворювання на 87,4 %; на десяту – на

143,0%; на п'ятнадцяту – на 17,0 %, порівняно до початку хвороби. У корів другої лактації також прослідковується тенденція збільшення запалення вим'я на сьому добу на 78,2 %; на десяту – на 142 %; на п'ятнадцяту – на 8,0 %. Крім того, можна зазначити, що найбільший рецидив захворювання на субклінічний мастит приходить з сьомої по десяту добу. На п'ятнадцяту добу захворювання запалення дещо зменшується, на що вказує рівень соматичних клітин в молоці корів. Так у корів третьої лактації на сьому добу спостерігали збільшення КСК на 47,3%; на десяту – на 152,6 %; на п'ятнадцяту – на 11,9 %.

Дослідження кількості соматичних клітин в молоці корів дає можливість визначати фізіологічний стан вим'я та початок розвитку запальних процесів. Однак показник КСК необхідно визначати у кожній чверті молочної залози окремо, тому що запалення може виникати в кожній долі окремо. На початку розвитку субклінічного маститу локалізація запального процесу в ураженій долі вимені дає можливість запобігти

розвитку хвороби в здорових чвертях молочної залози.

У корів четвертої лактації хворих на СМ кількість соматичних клітин в молоці збільшується на сьому добу захворювання на 53,6 %; на десяту – на 126,3 %; на п'ятнадцяту – на 2,2 %. За виробничими даними корови можуть хворіти на субклінічний мастит тривалий час і без ефективного лікування може переходити у хронічну форму запалення, що в свою чергу може призвести до виникнення гіпо- та агалакції у тварин.

У тварин п'ятої лактації відбувається підвищення показника КСК у ураженій долі вимені на сьому добу на 63,12 %; на десяту – на 135,3 %; на п'ятнадцяту – на 14,4 %.

Також важливим показником у молоці є кількісний та видовий склад мікроорганізмів, що сприяють розвитку запальних процесів у вимені корів. У господарствах Сумської області при відборі проб молока також були виділені та ідентифіковані мікроорганізми, які і є основними збудниками субклінічного маститу корів.

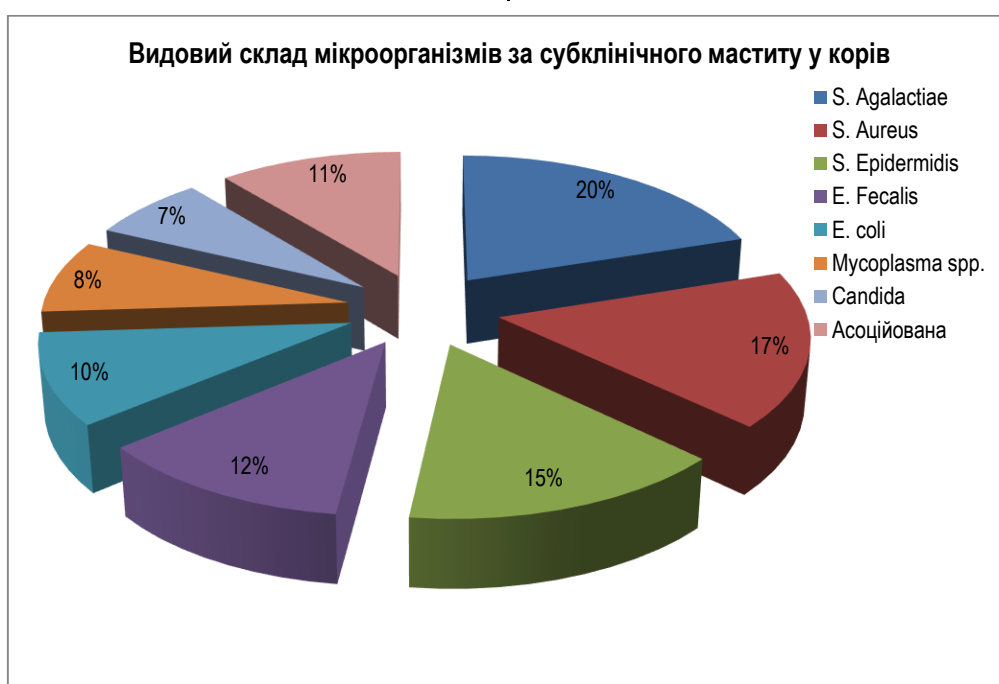


Рис.1. Видовий склад мікроорганізмів за субклінічного маститу у корів

За результатами визначення основного складу мікрофлори у молоці корів встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %).

Обговорення. В результаті проведених досліджень з'ясовано, що субклінічні форми маститу у молочних господарств виявляються набагато частіше, ніж клінічні. Так на молочнотоварних фермах субклінічна форма маститу діагностувалась частіше, ніж клінічна форма. Господарства практикують лікувати клінічні прояви маститу. Однак не звертають належної уваги на субклінічні форми маститу, які згодом можуть переходити у хронічну форму запалення. Отримані результати обумовлені санітарними умовами утримання корів, технологією доїння та періодом лактації.

Хоча зв'язок між маститом та патогенними мікроорганізмами був доведений в 1887 році, основні патогени були виявлені лише протягом 1940-х років. Висновок про багатofакторну етіологію маститу великої рогатої худоби відкрив

шлях для подальших досліджень маститу, включаючи визначення загальних етіологічних агентів, які були визнані як грам-позитивними, так і грам-негативні бактерії, такі як *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*) та *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*); молекулярна епідеміологія збудників збудників; порівняльні методи типізації збудників на підвиді; масиви генів вірулентності; секвенування цілого геному та дослідження структури сприйнятливості антибіотиків *in vitro*.

За результатами визначення складу мікрофлори у молоці корів у господарствах Сумської області встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %) (Naqvi et al., 2018).

Як правило, субклінічний мастит у корів під час отелення переважно спричинені головними патогенами, а саме коагулазонегативними стафілококами, що призводять до маститів телиць. На початку лактації на впливають багато факторів, включаючи природу захворювання, вірулентність збудника, час початку відношення до отелення, стійкість інфекції,

імунітет тварини, термін вагітності та управлінські практики, включаючи ризик, пов'язаний із сезоном та розташування стада. Короткочасне передпологове лікування антибіотиками є ефективним заходом для боротьби з маститом телиць, але воно рідко рекомендується через тривалий несприятливий вплив на здоров'я вимені та виробництво молока, тим самим знижуючи прибуток фермерів (De Vliegher et al. 2012).

Також дослідженнями було доведено, що захворювання корів на субклінічний мастит можна визначати за кількістю соматичних клітин (КСК) у молоці. Пік захворюваності припадає на перший місяць лактації. При цьому в першу лактацію у корів спостерігали збільшення КСК на сьому добу захворювання на 87,4 %; на десяту – на 143,0%; на п'ятнадцяту – на 17,0 %, порівняно до початку хвороби. У корів другої лактації також прослідковується тенденція збільшення запалення вим'я на сьому добу на 78,2 %; на десяту – на 142 %; на п'ятнадцяту – на 8,0 %. Крім того, можна зазначити, що найбільший рецидив захворювання на субклінічний мастит приходить з сьомої по десяту добу. На п'ятнадцяту добу захворювання запалення дещо зменшується, на що вказує рівень соматичних клітин в молоці корів. Так у корів 1-5 лактації отримували подібний патогенез захворювання, не залежно від лактації. Однак захворювання поступово зменшуються під кінець періоду лактації і знову виникає рецидив в період запуску. Однак у здорових корів кількість соматичних клітин в молоці може коливатись протягом всього періоду лактації в межах фізіологічної норми. У хворих тварин КСК різко збільшується і може переходити мастит з субклінічної форми у клінічну через не надання своєчасного лікування.

Мастит може бути епідеміологічно класифікований на заразний та екологічний мастит і викликаний широким спектром патогенів. Крім цього, мастит також можна класифікувати як клінічну, так і субклінічну форму (Abebe et al. 2016). Будь-яке підвищення рівня вологості та забруднення навколишнього середовища сараю також збільшує навантаження бактеріальних збудників у навколишнє середовище. Одне з досліджень показало поширеність маститу на рівні стада 74,7%, а на рівні корів - 62,6%. Що стосується субклінічного та клінічного маститу, перший тип, як видається, відповідальний за більшість випадків (59,2%), ніж другий (3,4%) (Abebe et al. 2016). Клінічний мастит можна легко ідентифікувати на основі видимих симптомів з точки зору запалення вимені, що показує почервоніння в ураженій частині або цілому вимені, тепло, набряк, біль при дотику, згустки молока, зміна кольору та зміна консистенції молока. Загальними симптомами є пірексія (> 39,5 ° C) та втрата апетиту.

Порівняно з клінічною формою, ніяких клінічно видимих симптомів при субклінічному маститі не спостерігається, хоча зміна складу молока може бути показником. Отже, це визнається та підтверджується лабораторним дослідженням молока або тестами на стороні тварин, такими як каліфорнійський тест на мастит (СМТ) з подальшим лабораторним виділенням збудника.

Кількість соматичних клітин (КСК) у молоці повинна бути менше 200000 на мл у здорової корови. Соматичні клітини - це переважно білі кров'яні клітини (WBC), тобто інфільтровані нейтрофіли, а також макрофаги в тканину молочної залози через запалення (Steenefeld et al. 2011). *S. agalactiae* в основному локалізується у вимені та викликає стійкі інфекції з вищим SCC.

Діагностика маститу є основною вимогою молочної галузі до чистого виробництва молока не тільки з економічних

причин та з точки зору громадського здоров'я, але й щодо добробуту тварин. Діагностика повинна бути ранньою, швидкою та точною для запобігання маститу або раннього виявлення маститу для лікування або терапевтичних цілей. Це передбачає застосування звичайних, а також вдосконалених діагностичних тестів. Звичайні методи відносно дешеві, легкі, швидкодоступні та застосовуються на місцях, але зазвичай неспецифічні. Розширені тести є дорогими, вимагають технічних навичок та складної інфраструктури та обладнання, але, як правило, точні та специфічні для різних форм маститу (Hussein et al., 2018; Chakraborty et al., 2019).

Вибракування та чітко визначені протоколи біозахисту є ефективними заходами для контролю та запобігання повторному зараженню тварин вірулентними штамми *S. agalactiae* та *S. aureus*). Крім того, поєднання лікування антибіотиками та вибракування корів, що не реагували на протимікробні засоби, продемонструвало зниження швидкості передачі та зменшення проявів субклінічного маститу (Halasa 2012). Для лікування маститу доступні кілька режимів звичайних та вдосконалених терапевтичних заходів, які включають антибіотики, вакцинацію, терапію на основі наночастинок, трав'яну терапію та бактеріоцини (Gomes and Henriques 2016). Різні агенти сприяють зменшенню інфекцій вимені, особливо маститу у корів, а також сприяють поліпшенню якості молока (Skowron et al. 2019). Серед них антибіотикотерапія та вакцинація є загальнозживаними методами лікування маститу. Широке та неконтрольоване використання антибіотиків для лікування поряд із індукцією та збереженням стійкості до антибіотиків при маститі призвело до зменшення реакції на антибіотикотерапію (Park et al. 2012; Babra et al. 2013). Хоча вакцинація неефективна проти маститу великої рогатої худоби, оскільки до її розвитку беруть участь різноманітні мікроорганізми; тим не менш, *S. aureus*, *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) та *E. coli* вважалися основними збудниками для створення вакцин (Bradley et al. 2015; Collado et al. 2016; Ashraf and Imran 2020). Незважаючи на те, що доступні декілька комерційних вакцин, більшість з них не продемонстрували достатнього захисту і водночас є дорогими (Côté-Gravel and Malouin 2019).

Через ці недоліки антибіотиків та вакцин з'явилося кілька інших способів терапії, які можуть заповнити пробіли. Технологія використання пробіотичних штамів мікроорганізмів, які є перспективними для профілактики та лікування субклінічних форм маститу.

Перспектива подальшого дослідження: провести випробування пробіотичних штамів мікроорганізмів для лікування субклінічних форм маститу у корів.

Висновки:

1. При проведенні маститу різної форми у корів в господарствах Сумської області встановлено, що субклінічна форма маститу діагностувалась частіше ніж клінічна у Сумському районі на 33,4 %; у Лебединському – на 17,8 %; у Конопольському – на 45,4 %; у Шосткінському – на 42,8 %; у Роменьському – на 34,3 %; у Охтирському – на 21,9 %.

2. Встановлено, що пік розвитку субклінічного маститу приходить на 7-10 добу запалення і повертається до початкових значень за два тижні.

3. За результатами визначення основного складу мікрофлори у молоці корів встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %).

References:

1. Bardhan D. (2013). Estimates of economic losses due to clinical mastitis in organized dairy farms. *Indian J Dairy Sci.* 66:168–172. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.v13i01.8732>
2. Sinha, M. K., Thombare, N. N., & Mondal, B. (2014). Subclinical mastitis in dairy animals: incidence, economics, and predisposing factors. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 523984. <https://doi.org/10.1155/2014/523984>
3. Das, D, Panda, S.K., Jena, B., Sahoo, A.K. (2018). Economic impact of subclinical and clinical mastitis in Odisha, India. *IntJCurrMicrobiolAppSci.* 7(03):3651–3654. <https://www.ijcmas.com/7-3-2018/D.%20Das2,%20et%20al.pdf>
4. Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *The veterinary quarterly*, 29(1), 18–31. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>
5. Kalińska, A., Jaworski, S., Wierzbicki, M., & Gołębiowski, M. (2019). Silver and Copper Nanoparticles-An Alternative in Future Mastitis Treatment and Prevention?. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1672. <https://doi.org/10.3390/ijms20071672>
6. Klaas, I. C., & Zadoks, R. N. (2018). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and emerging diseases*, 65 Suppl 1, 166–185. <https://doi.org/10.1111/tbed.12704>
7. Ruegg P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*, 100(12), 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
8. Aghamohammadi, M., Haine, D., Kelton, D. F., Barkema, H. W., Hogeveen, H., Keefe, G. P., & Dufour, S. (2018). Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Frontiers in veterinary science*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>
9. Hamann, J. (2001). Mastitis notes from members countries. Germany Bullt IDF367: 18-21.IDF (1987) Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. Bull IDF. 211:24. https://scholar.google.com/scholar?q=related:eDfXv8M_2tsJ:scholar.google.com/&scioq=&hl=uk&as_sdt=0,5
10. Bennett, R., Christiansen, K., & Clifton-Hadley, R. (1999). Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Preventive veterinary medicine*, 39(3), 155–171. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(99)00003-3)
11. Hogeveen, H., Pyorala, S., Waller, K. P., Hogan, J. S., Lam, T. J., Oliver, S. P., ... & Hillerton, J. E. (2011). Current status and future challenges in mastitis research. In *Proceedings of the 50th Annual Meeting of the National Mastitis Council*, 23-26 January, 2011, Arlington, USA (pp. 36-48).
12. Hadrich, J. C., Wolf, C. A., Lombard, J., & Dolak, T. M. (2018). Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. *Journal of dairy science*, 101(4), 3588–3596. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13840>
13. Oliver, S. P., & Murinda, S. E. (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 28(2), 165–185. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>
14. Ruegg P. L. (2009). Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *Journal of animal science*, 87(13 Suppl), 43–55. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1217>
15. Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *The veterinary quarterly*, 41(1), 107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
16. Bhulto, A.L., Murry, R.D., Woldehiwet, Z (2012): California Mastitis Test scores as indicators of subclinical intramammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Res Vet Sci*, 92, 13-17.
17. Prescott, S.C., Breed, R.S. (2010): The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *American J Pub Hyg*, 20, 662-640.
18. Naqvi, S. A., De Buck, J., Dufour, S., & Barkema, H. W. (2018). Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. *Journal of dairy science*, 101(4), 3233–3247. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13579>
19. De Vlieghe, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H. W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of dairy science*, 95(3), 1025–1040. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4074>
20. Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC veterinary research*, 12(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
21. Steeneveld, W., van Werven, T., Barkema, H. W., & Hogeveen, H. (2011). Cow-specific treatment of clinical mastitis: an economic approach. *Journal of dairy science*, 94(1), 174–188. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3367>
22. Andrews, T., Neher, D. A., Weicht, T. R., & Barlow, J. W. (2019). Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. *PloS one*, 14(11), e0225001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225001>
23. Hussein, H. A., El-Razik, K., Gomaa, A. M., Elbayoumy, M. K., Abdelrahman, K. A., & Hosein, H. I. (2018). Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Veterinary world*, 11(1), 34–41. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.34-41>
24. Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Iqbal Yattoo, M., Khurana, S. K., Khandia, R., Munjal, A., Munuswamy, P., Kumar, M. A., Singh, M., Singh, R., Gupta, V. K., & Chaicumpa, W. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. *The veterinary quarterly*, 39(1), 76–94. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1642546>
25. Halasa T. (2012). Bioeconomic modeling of intervention against clinical mastitis caused by contagious pathogens. *Journal*

of dairy science, 95(10), 5740–5749. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5470>

26. Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current microbiology*, 72(4), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

27. Skowron, K., Sękowska, A., Kaczmarek, A., Grudlewska, K., Budzyńska, A., Białucha, A., & Gospodarek-Komkowska, E. (2019). Comparison of the effectiveness of dipping agents on bacteria causing mastitis in cattle. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 26(1), 39–45. <https://doi.org/10.26444/aaem/82626>

28. Park, Y. K., Fox, L. K., Hancock, D. D., McMahan, W., & Park, Y. H. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. *Journal of veterinary science*, 13(1), 103–105. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.1.103>

29. Babra, C., Tiwari, J. G., Pier, G., Thein, T. H., Sunagar, R., Sundareshan, S., Isloor, S., Hegde, N. R., de Wet, S., Deighton, M., Gibson, J., Costantino, P., Wetherall, J., & Mukkur, T. (2013). The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia microbiologica*, 58(6), 469–474. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0232-z>

30. Bradley, A. J., Breen, J. E., Payne, B., White, V., & Green, M. J. (2015). An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. *Journal of dairy science*, 98(3), 1706–1720. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8332>

31. Collado, R., Prenafeta, A., González-González, L., Pérez-Pons, J. A., & Sitjà, M. (2016). Probing vaccine antigens against bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*. *Vaccine*, 34(33), 3848–3854. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.044>

32. Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal health research reviews*, 21(1), 36–49. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>

33. Côté-Gravel, J., & Malouin, F. (2019). Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *Journal of dairy science*, 102(5), 4727–4740. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15272>

Yaroslav Tytukh, PhD Student, Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

Performance monitoring includes various forms of mastitis in Sumy region farms

The article presents the results of monitoring of cows mastitis in Sumy region. Mastitis (Mastitis is inflammation of the udder,) caused by infectious agents is still considered destructive to dairy animals, affecting animal welfare and causing huge economic losses to the dairy industry due to reduced productivity and increased culling.

The study was conducted on dairy farms in Sumy region. The procedures of human behavior with animals were approved by the Ethics Committee of Sumy National Agrarian University (approval №: 2021/01). Animals are kept in ox stalls with three times a daily milking. The experiments were performed on Holstein cattle during 1-5 lactations.

It was found that subclinical forms of mastitis are registered much more often than clinical ones. Subclinical mastitis was monitored by the somatic cell count (SCC) in milk. In the first months after calving cows are most often affected by subclinical mastitis due to physiological stress. The disease gradually decreases at the end of lactation and recurrence occurs again during completed lactation. However, the somatic cell count in milk of healthy cows can fluctuate throughout the lactation period within the physiological norm. The somatic cell count in sick animals sharply increases and mastitis can change from a subclinical form to clinical.

*Performance monitoring includes various forms of mastitis in Sumy region farms, demonstrated that the subclinical form of mastitis was diagnosed more often than the clinical one: in Sumy district by 33,4%; in Lebedyn district by 17,8%; in Konotop district by 45,4%; in Shostka district by 42,8%; in Romny district by 34,3%; in Okhtyrka district by 21,9%. It was found that the peak of subclinical mastitis occurs on day 7-10 of inflammation and returns to baseline in two weeks. The main pathogens of subclinical mastitis were: *S. agalactiae* (20%), *S. aureus* (17%), *S. epidermidis* (15%), *E. fecalis* (12%), *E. coli* (10%), *Mycoplasma spp.* (8%), *Candida fungi* (7%) and associated microflora (11%), according to the results of the milk microflora composition.*

Key words: cows, subclinical mastitis, clinical mastitis, pathogens of subclinical mastitis, lactation