

Kasyanchuk V., Ushkalov V., Berhilevych O., Deryabin O., Efimova O., Kozii R. Detection and identification of shiga-toxin producing strain of the bacteria E. coli by polymerase chain reaction

The aim of this work is to develop tools for molecular genetic analysis (detection and identification) Shiga-producing strains of bacteria E. coli. Analysis of amplification products was performed by separation of DNA fragments on a 1,5 % agarose gel (Sigma, USA). A bundle of DNA bands on received and Registration elektroforegramme determined using "MolecularImageGelDocXR +".

Original specificity of oligonucleotide primers for the gene and stx2 gene eae were verified. Determine the characteristics of the gene and stx2 gene eae, as tools for molecular genetic analysis of Shiga-toxin-producing strains of E.coli bacteria for the purpose of detection and identification. From research that the optimal temperature conditions for both primer pairs is 65° C.

To determine the sensitivity of the designed primers were prepared by serial 10-fold dilutions of purified bacterial DNA. The concentration of the purified DNA positive samples was determined by spectrophotometry and amounted to strain O145 – 22,28 ng/0,001 cm³ (gene eae) and 20,70 ng/0,001 sm³dlya strain O157 (gene stx2)

Tested the specificity and sensitivity of the synthesized primers E. coli strains of serotypes O157, O145 and O111z National Collection of microbial strains. These primers to be used as a source of target genes: gene and gene stx2 eae. Stx2 gene was detected in strain E.coli serotype O157 and gene eae - strain E.coli O145 serotype.

Keywords: Polymerase chain reaction, E. coli, shyhatoksyn, Stx-toxins, nucleotide sequence, intimin, chromosomal gene, stx2 gene, eae gene.

Дата надходження до редакції: 23.03.2015 р.
Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В.Ю.

УДК 619:616.155.194.8:616-091

**ВПЛИВ НАДЛИШКУ МІДІ, ЗАЛІЗА, КОБАЛЬТУ НА МОРФОЛОГІЮ СЕЛЕЗІНКИ
ЗА КОЛІБАКТЕРІОЗУ У ПОРОСЯТ МОЛОЧНОГО ПЕРІОДУ**

М.В. Скрипка, д.вет.н., професор
І.Є. Запека, аспірантка
Полтавська державна аграрна академія

Довжина селезінки становила 8,2±0,3 см; ширина – 1,3±0,4 см. Капсула органу (ширина від 24,34±2,28 мкм до 88,56±6,54 мкм), з ознаками набряку та мукоїдного набухання, ширина трабекул від 13,43±1,16 мкм до 54,67±2,57 мкм. Відносна площа білої пульпи по відношенню до загальної площі зрізу становила від 9-13 % до 27 %. Кількість (1-3 вузлики в полі зору) і площа лімфатичних вузликів, яка становила від 2104,40±397,34 мкм² до 3101,88±213,87 мкм², на окремих ділянках площа вузликів складала до 26248,81±1263,38 мкм². Ширина периартеріальних піхв коливається від 25,47±1,53 мкм до 75,85±1,34 мкм.

Ключові слова: колібактеріоз, селезінка, червона та біла пульпа, лімфатичний вузлик, поросята, мікроелементи.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Незважаючи на те, що ветеринарна наука і практика накопичили великий арсенал засобів і методів профілактики та лікування інфекційних захворювань, вони продовжують наносити величезні економічні збитки. За статистичними даними, велику частку інфекційних захворювань у свинарстві займають шлунково-кишкові хвороби молодняка. Ними щорічно хворіє від 70 до 100 % поросят. В наслідок перехворювання молодняка на 20-25 % знижується потенціал їх продуктивності в дорослому віці. В свою чергу, значне місце серед них припадає на колібактеріоз – до 20-25 % від усіх інфекційних хвороб свиней. Смертність від цього захворювання досягає 70 %. Така ситуація – наслідок низької резистентності організму, рівень якої визначається станом імунної системи і проявом клітинних і гуморальних факторів захис-

ту. Великий вплив на морфологічні і функціональні показники, які характеризують стан імунної системи здійснює повноцінна годівля тварин, зокрема збалансованість кормів за мікроелементами [7, 8].

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Активізація клітинного і гуморального імунітету є основою профілактики захворювань травного каналу молодняка тварин та збереження генетичного потенціалу, їхньої продуктивності. Вітчизняний і зарубіжний досвід показує, що збереження здоров'я тварин і отримання високої продуктивності неможливо без ретельного балансування раціонів за мікроелементами. Значний вплив мікроелементів на фізіологічні процеси пояснюється тим, що вони входять до складу так званих акцесорних речовин: дихальні пігменти, вітаміни, гормони, ферменти і коферменти, що приймають

участь в регуляції життєвих процесів. Крім цього вони впливають на становлення клітинного імунітету новонароджених поросят [4, 15, 16].

При згодовуванні свиням кормів, які містять концентрації мікроелементів, які перевищують гранично допустимі концентрації, відбувається порушення обміну речовин і імунологічного статусу, спостерігаються субклінічні зміни в печінці, імункомпетентних органах, інших органах, створюються умови для активізації умовно-патогенної мікрофлори і розвитку патологічного процесу [4, 8, 10, 12, 13, 15, 16].

Знання особливостей мікроморфології селезінки як периферичного органу імунологічного захисту організму представляє великий науковий інтерес. Селезінка є великим лімфоїдним органом в організмі свавців, відіграє важливу роль в розвитку і підтримці клітинної і гуморальної відповіді, вродженого і набутого імунітету, кількісного і якісного складу імуніцитів крові, лімфи та інших лімфоїдних органів. Лімфодеструктивна, лімфодегенеративна лімфопроліферативна дія токсичних елементів здатна змінити цю взаємодію і призвести до тривалого порушення імунної відповіді [6, 9, 14].

Основним проявом стрес-асоційованих імуносупресивних зсувів в імунних органах, зокрема в селезінці як найбільшому компартменталізованому серед них, є гіпоцелюлярність лімфоїдної тканини, серед причин якої вказують порушення трафіку імуніцитів (як притоку, так і відтоку), надлишкову загибель, уповільнену проліферацію і порушення сигнальних взаємодій. При цьому було неодноразово продемонстровано, що по мірі старіння організму механізми пост стресової імуномодуляції зазнають певної динаміки, однак в ранньому постнатальному онтогенезі вона залишається мало вивченою. При цьому не досягнуто повного розуміння природи пошкоджуючого фактору, що пов'язано з недостатністю досліджень лімфоїдної і стромальної архітектоники органів імунігенезу, особливо у молодих тварин, і ускладнює розуміння закономірностей становлення ефективної імунної відповіді та імуномодуляційних процесів в ранньому постнатальному онтогенезі [1, 2, 8].

У зв'язку із вище зазначеним дослідження впливу на периферичну ланку імунної системи поросят патогенної мікрофлори на фоні дії токсичних елементів кормів в умовах виробництва є актуальним і потребує детального вивчення із застосуванням різноманітних, в тому числі гістологічних та морфометричних, методів дослідження.

Мета досліджень: дослідити особливості морфології селезінки поросят за колібактеріозу на фоні надлишку мікроелементів у кормах.

Матеріали і методи досліджень. Патологоанатомічний розтин трупів поросят віком 10 днів

проведено методом повної евісцерації [5]. Гістологічні дослідження селезінки проводили за загально прийнятною методикою [3].

Гістологічні препарати досліджували з використанням біологічного мікроскопу MICROmedXS 5520 при збільшенні окулярів 16х, об'єктивів 10х и 40х. Фотографували цифровою камерою-окулярном для мікроскопа MegaCMOS 5.0. Морфометрію проводили з використанням програми ImageJ Національного інституту здоров'я (США) і за допомогою окуляр-мікрометра. Визначали наступні морфометричні параметри: відносну площу білої селезінки до загальної площі зрізу (%), діаметр центральних артерій, ширину периартеріальних лімфатичних піхв площу лімфатичних вузликів, ширину капсули, ширину трабекул (мкм). Виміри проводили в десяти полях зору кожного зрізу, вивчалися шість зрізів з кожного об'єкту [3, 11]. Цифрові дані оброблені статистично з використанням програми Microsoft Excel 2010.

Результати власних досліджень. Не зважаючи на комплексний підхід до ветеринарно-санітарного обслуговування дослідного господарства, на свинофермі протягом тривалого часу реєструється великий відсоток захворюваності та загибелі молодняку свиней. Проведеним хіміко-токсикологічним дослідженням зразків кормів нами було встановлено, що некваліфіковане використання добавок мікроелементів у раціонах і не завжди об'єктивна інформація про їх склад, призводять до надмірного надходження в організм тварин кобальту, заліза, міді. Інтоксикація викликана надлишком мікроелементів в організмі, сприяє розвитку вторинного імунodefіциту, що призводить до виникнення захворювань, викликаних умовно-патогенною мікрофлорою. Що ймовірно і обумовило особливості прояву колібактеріозу в дослідному господарстві і супроводжувалося летальністю серед поросят молочного періоду до 43 % [4, 15].

Проведеним патологоанатомічним дослідженням встановлено, що селезінка поросят дряблої консистенції, мала видовжено-овальну форму. Довжина органу становила $8,2 \pm 0,3$ см; ширина – $1,3 \pm 0,4$ см. На поперечному розрізі селезінка трикутна, темно-вишневого кольору, спостерігалось виразне кровонаповнення судин органу.

Гістологічним дослідженням встановлено добре розвинену фіброзну капсулу (ширина від $24,34 \pm 2,28$ мкм до $88,56 \pm 6,54$ мкм), від якої в середину органу відходять трабекули. Капсула з ознаками набряку та мукоїдного набухання. Ширина трабекул коливалася від $13,43 \pm 1,16$ мкм до $54,67 \pm 2,57$ мкм. Відсутній чіткий розподіл на червону і білу пульпу. Відносна площа білої пульпи по відношенню до загальної площі зрізу становила від 9-13 % до 27 %. Лімфатичні вузлики, в по-

Вісник Сумського національного аграрного університету

Серія «Ветеринарна медицина», випуск 7 (37), 2015

рівнянні з нормою, мають менші об'єми та меншу кількість. У переважній більшості вони не мали чітких меж. Спостерігалось спустошення лімфатичних вузликів, добре було видно ретикулярний остов.

В усіх випадках зареєстровано набряк строми селезінки, нерівномірне кровонаповнення судин і інфільтрацію еритроцитами червоної пульпи. Паренхіма селезінки має щілеподібну будову, в наслідок набряку. На великих ділянках органу зареєстровано дифузну інфільтрацію клітинами лімфатичного ряду червоної і білої пульпи. Більш інтенсивне скупчення лімфоцитів спостерігається під капсулою органу. На великих ділянках червоної пульпи відбувається відкладення гемосидерину. Слід зауважити, що більш інтенсивне кровонаповнення судин та утворення пігменту відбувається в підкапсулярній зоні органу.

Трабекули потовщені, з ознаками набряку та мукоїдного набухання колагенових та еластичних волокон із зруйнованою архітектонікою розташування волокон, паранекрозу та некрозу фіброцитів, фібробластів і досягала ширина в цих патологічних ділянках до $116,44 \pm 3,27$ мкм. В наслідок набряку в товщі трабекул утворюються мікрощілини.

Була зменшеною кількість (1-3 вузлики в полі зору) і площа лімфатичних вузликів, яка становила від $2104,40 \pm 397,34$ мкм до $3101,88 \pm 213,87$ мкм, на окремих ділянках площа вузликів складала до $26248,81 \pm 1263,38$ мкм. Переважна кількість лімфатичних вузликів не сформована; навколо центральних артерій обідок з 2-3 рядів лімфоцитів, між ними гранулоцити в кількості 3-4 клітин, крім того гранулоцити групами лежать в червоній пульпі, яка інфільтрована лімфоцитами. Спостерігається периваскулярний набряк центральних артерій. Зареєстровано гідропічну дистрофію ретикулоцитів та ендотеліоцитів центральних артерій. Спостерігається як різне розширення (діаметр – $13,13 \pm 0,75$ мкм) так і спазматичне звуження просвіту центральних артерій (діаметр – $2,97 \pm 0,31$ мкм).

Простежуються окремі вузлики, але відсутні сформовані зони (периартеріальна, мантійна, крайова, а також гермінативний центр). Контури таких вузликів згладжені, клітини в самих вузликах розташовуються розріджено. В полі зору зустрічаються лімфатичні периартеріальні піхви, як із великою кількістю клітин (широкі муфти) так із малою кількістю. Ширина периартеріальних піхв коливається від $25,47 \pm 1,53$ мкм до $75,85 \pm 1,34$ мкм. Останні в периартеріальній зоні містяться скупчення еозинофілів. Гранулоцити розташовуються по всій тканині, їх скупчення реєструються в стромі, в ділянках біля судин, тяжів (лімфоцити, гранулоцити).

Навколо окремих центральних артерій вузликова зона взагалі не виражена, в ділянках із дифузною лімфоцитарною інфільтрацією пульпи, контури вузликів відсутні, вони зливаються з вище зазначеними інфільтратами. В ділянках з помірним кровонаповненням судин стінки центральних артерій без змін, лімфатичні вузлики слабо виражені, межі не простежуються, розріджений вигляд, невеликих розмірів, зони вузлика різко згладжені із малим скопичення клітин.

Висновок. В селезінці поросят, які захворіли на колібактеріоз, на фоні токсичного впливу мікроелементів спостерігається зменшення кількості лімфоїдної тканини, зниження кровотоку у вузликових артеріях. Зниження морфометричних показників селезінки, а саме зменшення відносної частки білої пульпи паренхіми за рахунок зменшення лімфатичних вузликів і їх розмірів, відсутність в них світлих центрів, може свідчити про виражене пригнічення структур, які приймають участь в реалізації реакцій гуморального і клітинного імунітету, про затримку становлення неспецифічної резистентності їх організму.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку. Планується дослідження особливостей морфології імунних утворень слизових оболонок стінки кишечника за колібактеріозу поросят в умовах надлишку міді, заліза та кобальту.

Список використаної літератури:

1. Бут В.И. Морфофункциональное исследование лимфоидной ткани поросят при вторичных иммунодефицитных состояниях: автореф. дис. канд. мед. наук: 16.00.02 / Бут В.И. – Воронеж. – 1992. – 22 с.
2. Верина И.С. Проблема выявления иммунодефицитных состояний свиней в постнатальный период / И.С. Верина, С.Н. Магер, Н.А. Осипова // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: материалы VIII Сиб. Вет. Медицины (14-15 февр. 2008 г.) Новосибир. Гос. аграр. у-т. – Новосибирск, 2008. – С.175-176.
3. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. – Житомир: «Полісся», 2011. – 288 с.
4. Запека І.Є. Вміст мікроелементів в органах та тканинах молодняка свиней за їх надлишку в кормах / І.Є. Запека, М.В. Скрипка // Вісник ЖНАЕУ. Серія: Ветеринарна медицина. – 2014.
5. Зон Г.А. Патологоанатомічний розтин тварин: навчальний посібник / Г.А. Зон, М.В. Скрипка,

Л.Б. Ивановська. – Донецьк: ТОВ «Таркус», 2010. – 222 с.

6. Клейменов И.С. Отдельные аспекты морфологии селезенки у новорожденных поросят в норме и при иммунодефиците / И.С. Клейменов, Н.В. Клейменова // Режим доступа: <http://www.stgau.ru/science/conference/internet-conference/materials/y12.pdf>

7. Масьянов Ю.Н. Иммуноморфология у поросят-сосунов в норме и при экспериментальной колониарее: автореф. дис. канд. вет. наук: 06.00.02 / Масьянов Ю.Н. – Воронеж, – 1992. – 25 с.

8. Михайлов Е.В. Морфофункциональное состояние органов лимфоидной системы у поросят при иммунодефиците и его фармакоррекция селадантом: автореф. дис. канд. мед. наук: 16.00.02 / Михайлов Е.В. – Воронеж. – 2007. – 25 с.

9. Нестерова А.А. Морфологическая и иммуногистологическая характеристика селезенки при хроническом стрессе в раннем постнатальном онтогенезе: Автореф. дис. канд. мед. наук: 03.00.25 / Нестерова А.А. – Волгоград. – 2007. – 27 с.

10. Нотова С.В. Изучение уровня тяжелых металлов в организме при различных патологических состояниях, связанных с нарушением функционирования иммунной системы / С.В. Нотова, С. А. Лебедев, Г. В. Дубровина // Вестник ОГУ. – 2009. – № 6. – С. 496-498.

11. Овчаренко В.В. Использование компьютерных методов морфометрии в морфологических исследованиях селезенки / А.В. Карпович, Ю.А. Рыкова, В.С. Терещенко, Т. Н. Соленая // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9 (№ 1). – С. 93-93.

12. Слюсаренко А.Е. Иммунотропное действие железа, кобальта, марганца, молибдена, никеля, кальция и свинца в условиях фонового загрязнения городской среды / А.Е. Слюсаренко, Е.В. Евстафьева // Патологія. – 2011. – Том 8 (№ 2). – С. 124-126.

13. Тарасенко Л.О. Санітарно-гігієнічна оцінка кумулятивних властивостей важких металів та їх дія на морфологічні структури організму поросят // Науковий вісник ЛНУВМ та БР ім. С.З. Ґжицького, Львів. – 2007. – Т. 9, № 4 (35). – С. 134-139.

14. Тестов Б.В. Тимус и селезенка как индикаторы энергетического состояния животных / Б.В. Тестов, Д.А. Пьянкова, Т.Д. Афонина // Вестник Перм. университета – 2004. – Вып. 2. – С. 185-186.

15. Ушкалов В. О. Надлишок мікроелементів у кормах – фактор ризику для здоров'я молодняку свиней / В. О. Ушкалов, М.В. Срипка, І. Є. Запека // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – Вип. 23. – С. 268-270.

16. Шейко И.П. Организация полноценного кормления сельскохозяйственных животных с использованием органических микроэлементов // Весці НАН Беларусі, Мінск. – 2014. – № 3. – С. 80-85.

Срипка М.В., Запека И.Е. Влияние избытка меди, железа, кобальта на морфологию селезенки при колибактериозе у поросят молочного периода

Длина селезенки составляла $8,2 \pm 0,3$ см; ширина – $1,3 \pm 0,4$ см. Капсула органа (ширина от $24,34 \pm 2,28$ до $88,56 \pm 6,54$ мкм), с признаками отека и мукоидного набухания, ширина от $13,43 \pm 1,16$ мкм до $54,67 \pm 2,57$ мкм. Относительная площадь белой пульпы по отношению к общей площади среза составила от 9-13 % до 27 %. Количество (1-3 узелка в поле зрения) и площадь лимфатических узелков, которая составляла от $2104,40 \pm 397,34$ мкм² до $3101,88 \pm 213,87$ мкм². Ширина периартериальных влагалищ колебалась от $25,47 \pm 1,53$ мкм до $75,85 \pm 1,34$ мкм.

Ключевые слова: колибактериоз, селезенка, красная и белая пульпа, лимфатические узелки, поросята, микроэлементы.

Sryпка M., Zapeka I. The impact of excess copper, iron, cobalt on the morphology spleen colibacillosis in neonatal piglets.

Spleen length was $8,2 \pm 0,3$ sm and width – $1,3 \pm 0,4$ sm. The capsule organ (width from $24,34 \pm 2,28$ μm to $88,56 \pm 6,54$ μm), with signs of edema and mucoid swelling, width of $13,43 \pm 1,16$ μm to $54,67 \pm 2,57$ μm. The relative area of the white pulp relative to the total cut area is ranged from 9-13 % to 27 %. Number (1-3 nodules in sight) and the area of the lymph nodules, which ranged from $2104,40 \pm 397,34$ μm² up to $3101,88 \pm 213,87$ μm². Width of periarterial sheaths ranged from $25,47 \pm 1,53$ μm to $75,85 \pm 1,34$ μm.

Keywords: colibacillosis, spleen, red and white pulp, lymph nodules, pigs, trace elements.

Дата надходження до редакції: 27.03.2015 р.

Рецензент: к.вет.н., професор Зон Г.А.