

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ**  
**УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ЗДОРОВ'Я ТВАРИН**  
**ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

Спеціальність 211 «Ветеринарна медицина».

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Зав.кафедри фізіології та біохімії с.-г тварин  
к.біо.н., проф. \_\_\_\_\_ Л.М. Степченко  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

**ДИПЛОМНА РОБОТА**

**ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА ДІАГНОСТИКА ШЛУНКОВО-  
КИШКОВИХ ІНФЕКЦІЙ У ПІДСИСНИХ ПОРОСЯТ МЕТОДОМ  
ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В УМОВАХ НАУКОВО-  
ДОСЛІДНОГО ЦЕНТРУ БІОБЕЗПЕКИ ТА ЕКОЛОГІЧНОГО  
КОНТРОЛЮ РЕСУРСІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ  
ДНІПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНОГО  
УНІВЕРСИТЕТУ**

**26.06 – ДР. 1072 21 05 24. 050. ПЗ**

Студент-дипломник \_\_\_\_\_

М.Г. Супенко

Керівник дипломної роботи  
доктор вет. наук, доц. \_\_\_\_\_

проф. Д.М. Масюк

Консультанти:  
з охорони праці  
кандидат с.-г. наук, доц. \_\_\_\_\_

В.О. Сапронова

з економічних питань  
кандидат. вет. наук, доц. \_\_\_\_\_

В.В. Зажарський

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ .....	3
АНОТАЦІЯ .....	4
ВСТУП .....	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	8
1.1. Шлунково-кишкові хвороби свиней вірусної етіології.....	8
1.2. Шлунково-кишкові хвороби свиней бактеріальної етіології.....	15
1.3. Лабораторна діагностика шлунково-кишкових хвороб свиней...	26
2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	31
2.1. Матеріал і методи досліджень .....	31
2.2. Характеристика науково-дослідного центру .....	37
2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз.....	41
2.3.1. Видовий склад мікроорганізмів кишечника підсисних поросят різного віку з ознаками діареї .....	41
2.3.2. Генотипування мікроорганізмів методом полімеразної ланцюгової реакції .....	43
2.3.3. Розподіл мікроорганізмів у кишечнику підсисних поросят з ознаками діареї .....	46
2.3.4. Розрахунок економічної ефективності застосування методу ПЛР для диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у свиней.....	51
3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ .....	54
3.1. Аналіз стану охорони праці в умовах НДЦ.....	54
3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів.....	56
3.3. Пожежна безпека.....	57
ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ .....	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	61
ДОДАТКИ.....	72

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота виконана на 82 сторінках комп'ютерного тексту і містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їх аналіз, розрахунок економічної ефективності, охорону праці, висновки та пропозиції виробництву, список використаної літератури та додатки. Робота містить 8 рисунків та 8 таблиць. Список використаної літератури налічує 86 джерел, з яких 67 латиницею.

Метою роботи було провести диференціальну діагностику шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом полімеразної ланцюгової реакції. Об'єктом дослідження є шлунково-кишкова патологія у підсисних свиней.

У дипломній роботі розкрито вирішення завдань та узагальнено отримані результати щодо особливостей диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом полімеразної ланцюгової реакції. Встановлено, що етіологічними чинником діареї у поросят 3-5 добового віку є ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – коінфекція ротавірусу типу А та ентеротоксигенної *E. coli*. Проведення діагностики кишкових інфекцій підсисних поросят методом ПЛР є економічно вигідним та складає 166,42 грн чистого прибутку на одну пробу.

Для диференціальної діагностики етіології шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят виробництву рекомендовано проводити дослідження ректальних мазків від свиней з ознакам діареї методом ПЛР з детекцією результатів у режимі реального часу, який дає можливість визначити домінуючий у патологічному процесі патоген.

З метою формування ефективної схеми імунопрофілактичних заходів виробництву рекомендовано проводити генотипування ідентифікованих у біологічному матеріалі мікроорганізмів, що дає можливість точно визначити типи циркулюючих серед свиней мікробів та, відповідно, підібрати гомологічні вакцини.

## АНОТАЦІЯ

Дипломна робота Супенко М.Г. на тему «Диференціальна діагностика шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом полімеразної ланцюгової реакції в умовах науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету». У дипломній роботі розкрито вирішення завдань та узагальнено отримані результати щодо особливостей диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом ПЛР. Встановлено, що видовий склад мікроорганізмів кишечника клінічно здорових підсисних поросят представлений двома бактеріями *E. coli* та *Cl. perfringens*. У кишечнику свиней з ознаками діареї віком 3-5 діб життя на тлі вище зазначених бактерії додатково ідентифіковано В токсин синтезуючу *Cl. difficile* та ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – ротавірус типу А. За результатами генотипування встановлено, що ідентифікована *Cl. perfringens* відноситься до типу А, а *E. coli* є ентеротоксигенною.

У кишечнику клінічно здорових поросят підсисного періоду домінуючою бактерією є *E. coli*, у популяції якої присутні слідові кількості ентеротоксигенних форм. Серед мікроорганізмів кишечника поросят 3-5 добового віку з ознаками діареї домінуючим є ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – ротавірус типу А та ентеротоксигенні форми *E. coli*.

Економічна ефективність діагностики кишкових інфекцій підсисних поросят із застосуванням методу ПЛР складає 166,42 грн чистого прибутку на одну пробу.

**Ключові слова:** ПЛР, діагностика, цільові гени, діареї, поросята, генетичний матеріал.

## S U M M A R Y

Graduate work Supenko M.G. on the topic " Differential diagnosis of gastrointestinal infections in suckling piglets by polymerase chain reaction in the Scientific Research Centre of Biosafety and Environmental Control Agro-industrial Complex of Dnipro State Agrarian and Economic University".

The graduate work reveals the solution of problems and summarizes the results on the features of the differential diagnosis of gastrointestinal infections in suckling piglets by PCR.

It was found that the intestinal microbiome of clinically healthy suckling piglets is represented by two bacteria *E. coli* and *Cl. perfringens*. Also, in the intestines of pigs with symptoms of diarrhea aged 3-5 days of life additionally identified *Cl. difficile* and rotavirus type C, and in piglets 17-21 days of age - rotavirus type A.

According to the results of genotyping, it was found that *Cl. perfringens* is type A and *E. coli* is enterotoxigenic.

In the intestinal microbiome of clinically healthy suckling piglets, the dominant bacterium is *E. coli*, in the population of which there are trace amounts of enterotoxigenic forms.

In the intestines of piglets 3-5 days of age with signs of diarrhea, rotavirus type C is dominant, and in piglets 17-21 days of age - rotavirus type A and enterotoxigenic forms of *E. coli*.

The economic efficiency of the diagnosis of intestinal infections of suckling piglets using the PCR method is 166.42 UAH net profit per sample.

**Key words:** PCR, diagnosis, target genes, diarrhea, piglets, genetic material.

## ВСТУП

Кишкові інфекції є однією з найпоширеніших патологій свиней у всьому світі, що сприяє формуванню значних економічних збитків свинарській галузі [78]. Найбільш чутливими до патогенного впливу мікроорганізмів є поросята підсисного періоду та після відлучення, що пов'язано із становленням імунної системи у поросят в неонатальний період та катаболізмом колостральних антитіл, а також імуносупресивною дією стресових факторів на організм свиней [63].

З огляду на те, що кишечник колонізують як мікроорганізми-коменсали так і патогенні форми бактерій, останні зазвичай ускладнюють перебіг патологічного процесу та ускладнюють діагностику. Слід відзначити, що індукуючи запалення кишечника мікроорганізми порушують процеси травлення та всмоктування, що обумовлює розвиток діарейного синдрому, на тлі чого тварини швидко худнуть і гинуть [59]. Саме тому важливим завданням у лабораторній діагностиці кишкових інфекцій є не лише визначення етіологічного спектру ентероколіту у поросят, а й встановлення первинного та домінуючого у патологічному процесі патогенів.

На сьогодні одним з найбільш розповсюджених методів лабораторної діагностики є полімеразна ланцюгова реакція, принцип якої базується на реплікації генетичного матеріалу мікроорганізму *in vitro*. Здатність цього методу враховувати результати дослідження у режимі реального часу дозволяє визначити кількість геном-еквівалентів збуднику, що вказує на домінування того чи іншого мікроорганізму у патологічному процесі [64].

З огляду на це особливої актуальності набувають дослідження з диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом полімеразної ланцюгової реакції.

**Об'єкт дослідження** – шлунково-кишкова патологія у підсисних поросят.

**Предмет дослідження:** мікроорганізми кишечника підсисних поросят клінічно здорових і з ознаками діареї та гени вірусів і факторів вірулентності бактерій.

**Мета роботи:** провести диференціальну діагностику шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом полімеразної ланцюгової реакції.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні **завдання:**

- Визначити видовий склад мікроорганізмів кишечника підсисних поросят різного віку з ознаками діареї за допомогою полімеразної ланцюгової реакції;

- З'ясувати генотип ідентифікованих мікроорганізмів методом полімеразної ланцюгової реакції;

- Встановити домінуючі мікроорганізми у кишечника підсисних поросят різного віку з ознаками діареї за допомогою полімеразної ланцюгової реакції;

- Розрахувати економічну ефективність застосування методу ПЛР для диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у свиней.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Шлунково-кишкові хвороби свиней вірусної етіології

На сьогодні у світі відомо понад 11 кишкових вірусів, що належать до 6 різних сімейств: *Adenoviridae* (*Adenovirus*), *Astroviridae* (*Astrovirus*), *Caliciviridae* (*Calicivirus*), *Coronaviridae* (*Transmissible gastroenteritis virus*; *Porcine epidemic diarrhea virus*; *Porcine deltacoronavirus*), *Parvoviridae* (*Enteric Parvovirus*) та *Reoviridae* (*Rotavirus* груп А, В, С, Е), які здатні викликати діарею у свиней переважно у підсисний період та після відлучення. Більшість з них інфікують ентероцити тонкої кишки, викликаючи різну ступінь атрофії ворсинок, що призводить до зниження абсорбції та порушення травлення. Окрім того, деякі віруси під час реплікації продукують ентеротоксин, який викликає секреторну діарею [1].

Всі ці віруси відрізняються між собою за тропністю до різних ділянок кишечника як по вертикалі – ворсинки / крипти, так і по горизонталі – дванадцятипала кишка, тонка кишка, клубова кишка, товста кишка, а інтенсивність діареї часто залежить від ступеня реплікації вірусу на цих ділянках. Крім того, інфекції індуковані декількома кишковими вірусами можуть мати синергічні або адитивні ефекти, що призводять до більш глобальної атрофії ворсинок у кишечнику та більш важкої та тривалої діареї. Саме тому знання місць реплікації кишкових патогенів та особливостей їх взаємодії під час індукції патологічного процесу дасть можливість діагностувати максимальну кількість мікроорганізмів, які є етіологічними чинниками гастроентероколітів у поросят, що у свою чергу дасть можливість сформувати ефективну схему заходів для профілактики або лікування цієї патології.



*Coronaviridae. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)* – це один з представників вірусів родини *Coronaviridae*, який викликає кишкову хворобу свиней – трансмісивний гастроентерит свиней (ТГС).

Це захворювання розповсюджене по всьому світі, але з часом повідомлень про ТГС стає значно менше, що вказує на його рідку епізодичність.

*TGEV* реплікується у поглинаючих клітинах тонкої кишки на різних стадіях диференціації, що спричиняє виражену атрофію ворсинок та, як наслідок, смертельну діарею.

Діарею та блювоту за ТГС відмічають у свиней будь-яких вікових груп, тоді як смертність найвища у новонароджених поросят. Слід зауважити, що *TGEV* може реплікуватись у клітинах респіраторного тракту та тканинах молочної залози [54], але вірус найбільш легко ізолюється з кишкового тракту та фекалій.

Оскільки ТГС є заразною хворобою, яка може протікати як вибухова епізоотія. За первинного потрапляння збуднику ТГС у популяцію свиней *TGEV* швидко поширюється у стаді викликаючи високий відсоток загибелі підсисних поросят [44]. У такому випадку швидкі методи діагностики цієї інфекції є особливо важливі. Захворювання може також мати форму ендемічної проблеми низького рівня, що супроводжується діареями у поросят після відлучення. У цій формі перебігу діагностувати ТГС важче за все, оскільки у цей технологічний період шлунково-кишкова патологія є широко розповсюдженою та індукується рядом збудників.

Досліджуючи патолого-анатомічні зміни у поросят загинувших за ТГС С.Є. Гаркуша та Я.В. Коновалов [44] встановили, що слизова оболонка шлунку поросят має катаральне запалення з петихіальними крововиливами. На слизовій оболонці сліпої та ободової кишок реєструються некрози у вигляді висівкоподібного нальоту. Слід відзначити, що схожі патолого-анатомічні зміни виявляють за іншої коронавірусної інфекції свиней індукованої вірусом епідемічної діареї свиней [59].

*Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV)* – це вірус родини *Coronaviridae*, який викликає захворювання – епідемічну діарею свиней (ЕДС).

Уперше на території України вірус ЕДС був зареєстрований у 2014 році [34]. Результати секвенування генетичного матеріалу вірусу ЕДС ізольованого в центральних регіонах України вказують на приналежність цього коронавірусу до групи високо вірулентних штамів. Дослідженнями Д.М. Масюка із співавторами [60] встановлено, що за 4 роки після ідентифікації вірусу на території України збудник ЕДС було виявлено у 14 регіонах країни. Автори відмічають, що циркулюючий вірус ЕДС з високою долею ймовірності потрапив на територію України з країн Азіатського континенту або Сполучених Штатів Америки.

До *PEDV*, як і до *TGEV* чутливі свині усіх вікових груп, але найважче хвороба індукована коронавірусами перебігає у новонароджених поросят викликаючи діареї, що призводять до масової загибелі поросят перших тижнів життя. На більш старших групах свиней смертність різко зменшується. При цьому спостерігають зниження середньодобового приросту та збільшення показнику конверсії корму [45].

Досліджуючи кров у поросят за ЕДС відмічають згущення крові на тлі підвищення показнику гематокриту, гемоглобіну та кількості еритроцитів. Одночасно з цим виявлено підвищення швидкості осідання еритроцитів. Зміни у біохімічних показниках крові характеризуються підвищенням активності ферментів АСТ, АЛТ, лужної фосфатази та амілази із одночасним зменшенням альбумінів, холестеролу, глюкози і загальних ліпопротеїнів. Всі ці зміни показників крові автори пов'язують із зневодненням та інтоксикацією свиней на тлі діареї, яка індукується завдяки ушкодження вірусом ентероцитів тонкої кишки [58].

За патологоанатомічного огляду відмічають значну виснаженість загинувших поросят. З ротової порожнини можуть витікати блювотні маси. На розтині більшість патологічних змін виявляють у тонкій кишці. Відмічається катарально-геморагічне запалення з витонченням кишкової

стінки, що відбувається за рахунок руйнування ентероцитів та кишкових ворсинок. Також реєструють набряклість та гіперемію регіональних лімфатичних вузлів [62].

*Porcine deltacoronavirus (PDCoV)* – це вірус із родини *Coronaviridae*, який викликає ураження кишечника свиней. Уперше був виявлений у 2009 році в фекаліях свиней з діареями. Причетність цього вірусу до індукції діарей у свиней було визначено лише у 2014 році [24].

Коронавірусна інфекція свиней індукована *PDCoV* клінічно проявляється діареями, регургітацією, виснаженням на тлі дегідратації організму. Сприйнятливими до вірусу є свині всіх вікових груп, проте більш чутливими є неонатальні поросята, які часто гинуть завдяки розвитку ентеральної вірусної патології.

Інфікування тварин вірусом відбувається пероральним та/або повітряно-крапельним шляхами. У світовій літературі є повідомлення про можливість механічного розповсюдження коронавірусу за допомогою кімнатних мух [59].

Потрапивши до кишечника сприйнятливих тварин *PDCoV* реплікується у епітеліальних клітинах тонкого кишечника забезпечуючи руйнування останніх, тим самим зменшуючи ворсинки та викликаючи розвиток діарейного синдрому. Перші клінічні ознаки за дельтакоронавірусної інфекції виявляють через 12 – 24 години після інфікування, а вже розвиток водянистої діареї реєструють на 3 добу після інфікування. Надалі у тварин відмічається млявість, пригнічення, інколи підвищення загальної температури тіла. Поросята швидко худнуть. Відмінною особливістю цього захворювання від інших коронавірусних інфекцій свиней є відсутність блювання. Рівень смертності є суттєво меншим порівняно до ТГС та ЕДС. Більшість тварин одужує вже на 8 – 10 добу після інфікування [12].

Патолого-анатомічні зміни є схожими з іншими коронавірусними інфекціями. Основні зміни реєструються у тонкому кишечнику, що пояснюється тропністю вірусу до епітеліальних клітин тонкого відділу

кишечнику. Стінка ураженої ділянки кишечника зазвичай витончена і прозора. Вміст кишечника водянисте, виявляються включення неперетравленого білку казеїну. За гістологічного дослідження реєструють атрофію ворсинок тонкого кишечника та атенуацію апікальних ентероцитів [12].

*Porcine torovirus (PoTV)* – це ще один представник родини *Coronaviridae* з роду *Nidovirales*. У 2014 році діагностична лабораторія Міннесоти вперше виявила ізолят *PoTV* свиней у США. Мазки калу / блювоти від однієї свині також були позитивними на вірус епідемічної діареї свиней. Після секвенування цього ізоляту було встановлено, що його повний геном на 92% ідентичний китайському ізоляту, який вважається першим секвенованим геномом *PoTV* свині [19].

У світовій літературі відсутні повідомлення про стійкість *PoTV* у навколишньому середовищі. Оболонкові віруси зазвичай мають тенденцію до кращого виживання за низької вологості та температури повітря і, як правило, нестабільні за межами хазяїна. Експериментальні дані свідчать про те, що конячий *ToV* легше інактивується теплом, ніж деякі коронавіруси. Бичий *ToV* у зразках калу втрачає свою заразність протягом одного-двох днів при температурі вище 4°С [52].

Обмежені епідеміологічні дослідження показують, що стада свиней, як правило, мають високу серопривалентність у ендемічних країн, хоча патогенність залишається нез'ясованою [86]. На сьогоднішній день поширеність *PoTV* в Україні залишається невідомою.

Вважається, що передача *PoTV* відбувається фекально-оральним шляхом. Слід відмітити, що ізолят, описаний як бичачий респіраторний *ToV* (BRTV) виділений з дихальної тканини телят вказує на можливість інфікування повітряно-крапельним шляхом. Швидке розповсюдження *PoTV* між різними технологічними групами свиней збігається з переміщення та перегрупування відлучених поросят приблизно в час найбільшої сприйнятливості, коли материнські антитіла зникли, а поросята ще не

синтезували власні імуноглобуліни [71]. Хронічно заражені дорослі свині можуть виступати в якості резервуарних господарів, постійно виділяючи у навколишнє середовище вірус. Яким би не був справжній спосіб передачі, висока серопродуктивність, про яку повідомляється в Іспанії, свідчить про ендемічну природу вірусу в деяких популяціях свиней.

Свині можуть виділяти вірус, але, як правило, не мають клінічних ознак. Вважається, що ToV викликає діарею, анорексію, дегідратацію, млявість, депресію та потенційно неврологічні або респіраторні ознаки у інших видів [36].

Отже, на сьогодні патогенність свинячого *PoTV* залишається незрозумілою, оскільки відсутні повідомлення про зв'язок між ураженнями кишечника та зараження вірусом.

***Reoviridae. Rotavirus (RV)*** – дволанцюговий РНК-геномний вірус, який викликає шлунково-кишкову патологію у всіх тварин та людей. В його структурі виділяють шість структурних вірусних білків (VP1 – VP4, VP6 і VP7) і п'ять неструктурних білків (NSP1 – NSP5 / 6). *RV* класифікуються на 10 груп (А – J) на основі антигенних взаємозв'язків їх білків VP6, з тимчасовими видами І та J, нещодавно виявленими у імунізованих собак в Угорщині та у кажанів у Сербії, відповідно [67, 21]. Зовнішні капсидні білки, такі як VP7 та VP4, індують синтез нейтралізуючих антитіл та складають основу для системи подвійного типування G та P [40].

Слід відзначити, що на тлі високого різноманіття генотипів ротавірусу механізм їх впливу на організм є майже ідентичним. Вірус передається фекально-оральним шляхом і супроводжується ураженням зрілих ентероцитів тонкої кишки. Це призводить до укорочення ворсинок з утворенням рідкісних, неправильних мікроросинок та інфільтрацією мононуклеарних клітин власної пластинки [40].

На сьогодні запропоновано декілька механізмів впливу ротавірусу на організм тварин, що сприяє розвитку діареї, включаючи мальабсорбцію через руйнування ентероцитів, ішемію ворсинок, нейрорегуляторне вивільнення

вазоактивного агента із заражених епітеліальних клітин. Також неструктурний білок 4 ротавірусу (NSP4) діє на організм як ентеротоксин та секреторний агоніст, що стимулює проникність клітин, залежних від  $Ca^{2+}$ , та індукує при цьому вікову та дозозалежну діарейну реакцію [40].

Найбільш поширеними групами, які вражають людей і тварин, є групи А, В і С (*RVA*, *RVB* і *RVC*), з найбільшою поширеністю штамів *RVA*, які представляють одну з найбільш значущих причин гострої дегідратаційної діареї. На сьогоднішній день 27 різних G- та 37 P-генотипів *RVA* були описані у тварин [66]. У зв'язку із збільшенням генетично різноманітних штамів *RVA* у 2008 р. система подвійного (G / P) типування була розширена до системи класифікації послідовностей з повною геномною системою, із встановленими значеннями відсотка ідентичності нуклеотидів для всіх 11 сегментів кодуючих генів VP1- VP4, VP6, VP7, NSP1 -NSP5 / 6 [65].

На теперішній віруси *RVB*, *RVC*, *RVE*, *RVH* та *RVI* були виявлені під час спорадичних, ендемічних або епідемічних інфекціях різних видів ссавців, тоді як *RVD*, *RVF* та *RVG* виявляються у птиці, таких як кури та індики, а *RV* типу А, В, С, Е та Н були описані у свиней [84, 77].

У 1969 р. ротавірус великої рогатої худоби був першим вірусом групи А, виділеним на культурі клітин і підтвердженим як причина діареї у телят. *RV* людини було відкрито незабаром у 1973 році Бішопом та його колегами [23]. Подальші дослідження цього вірусу задокументували широке розповсюдження інфекцій *RVA* серед молодих тварин, включаючи телят та свиней, та їх асоціацію з діареєю у тварин віком до 1 місяця [77, 80].

Вперше ротавіруси групи С були виділені у поросят у 1980 р., а згодом були ідентифіковані у інших тварин та людей [81]. Вперше ротавірус типу В був ізольований і описаний у 1980-х роках [26]. Атиповий ротавірус групи Е був зареєстрований лише у свиней Великобританії, де серологічне дослідження показало широке розповсюдження антитіл до цього вірусу у тварин старше 10 тижнів [29]. Нещодавно штами ротавірусів типу Н були

описані у свиней в Японії, Бразилії та США, де вони, як повідомляється, циркулювали щонайменше з 2002 року [83, 57, 82].

Найбільш розповсюдженими у світі ротавірусами, що індукують кишкову патологію свиней є типи А і С [82]. За даними дослідження Анастасії Власової із співавторами підтипи ротавірусу стають більш розповсюдженими у світі, що вони пов'язують із інтенсивною схемою імунопрофілактичних заходів орієнтованих на профілактику ротавірозу індукованого класичним серотипом вірусу – А. Автори вважають, що глобальна вакцинація проти ротавірусу типу А дала можливість прогресувати атиповам формам вірусів серотипів В, С та ін.

Найбільш розповсюдженим у свинарстві є тип А і С (*RVA / RVC*), при цьому, як зазначає у своїй праці Juliet Cherpengo із співавторами [30], *RVC* викликає діареї у поросят більш раннього віку – до 10 доби життя, тоді як *RVA* зазвичай у поросят після відлучення віком 21-35 днів. Таку відмінність автори пояснюють низькою антигенною спорідненістю цих серотипів, що обумовлено низькою гомологією геному вірусу.

Підсумовуючи вище наведене можна зробити висновок, що вірусні кишкові інфекції у свиней є широко розповсюдженими у всьому світі та у більшості випадків індукуються РНК-геномними вірусами, які завдяки своїм генетичним особливостям є високомутагенними. Це обумовило виникнення великої кількості генетично відмінних варіантів вірусу, що сприяє атиповим проявам цих захворювань. З огляду на це на сьогодні надзвичайно актуальним є питання діагностики та диференціальної діагностики цих хвороб, що дасть змогу своєчасної встановити діагноз та розробити схему лікувально-профілактичних заходів з метою попередження значних економічних збитків, які наносять галузі вище зазначені кишкові патогени.

## **1.2. Шлунково-кишкові хвороби свиней бактеріальної етіології**

Одночасно із прогресуванням вірусних хвороб у свинарстві широко розповсюдженими є хвороби шлунково-кишкового тракту індуковані бактеріальними патогенами. На сьогоднішній день існує велика кількість мікроорганізмів, які сприяють виникненню кишкової патології у свиней. Серед них найбільш розповсюдженими виділяють патогенні форми *E.coli*, мікроорганізми родів *Brachyspira spp.*, *Salmonella spp.*, а також бактерії *Lawsonia intracellularis*, *Clostridium diffiile* і *Clostridium perfringens* [73].

*E. coli* – це найбільш розповсюджена бактерія, яка колонізує товсту кишку всіх видів тварин та людини. Вона є коменсалом і зазвичай не викликає патології у тварин окрім певних форм цієї бактерії, які володіють факторами вірулентності. Завдяки останнім *E. coli* може спричинювати значних збитків тваринницьким галузям, зокрема свинарській, викликаючи як тяжку дегідратаційну діарею свиней так і раптову загибель найбільш вгодованих та крупних тварин. Патогенні властивості *E. coli* залежать від здатності цієї бактерії синтезувати ендотоксини та містити фімбріальні адгезини [13].

За сучасної класифікації *E. coli* поділяють на групи, серед яких на свиней патогенний вплив проявляють ентеротоксигенні, ентеропатогенні та ентерогеморагічні [14].

Ентеротоксигенні форми *E. coli* виділяють антигени, які забезпечують бактерію адгезивними властивостями, і бактеріальні термостабільні та термолабільні токсини. Останні є індуктором діарей у свиней. Особливістю патогенного впливу токсинів ентеротоксигенних форм *E. coli* на є дія на мембрану кишкової клітини блокуючи медіаторну систему. Такий вплив мінімізує специфічні морфологічні змін у слизовій кишечника, що значно ускладнює діагностику кишкової патології індукованої токсигенними формами *E. coli* [43].

Іншою патогенною групою *E. coli* є ентеропатогенні бактерії. Представники цієї групи продукують токсин білкового походження і адгезивні фактори. Завдяки цим факторам ентеропатогенні *E. coli*



проявляють цитолітичний та анафілоксигенний вплив на організм свиней, на тлі чого відбувається руйнація ентероцитів, що призводить до дегенерації ворсинок кишечника, утворення некрозу стінки кишечника, пошкодження кровоносних судин, блокування лімфоїдно-макрофагальної системи та зміни у функціонування надниркових та щитоподібної залоз. Ці зміни сприяють виникненню діарей, серцево-судинної недостатності та родів вегетативної нервової системи [56].

Група ентерогеморагічних бактерій *E. coli* також спричинює ентеропалотогію у свиней. Бактерії, що входять до цієї групи, здатні продукувати веротоксини, які за останньою номенклатурою називають шиготоксинами. Дія цих токсинів на організм свиней проявляється цитотоксичним та нейротоксичним ефектом, що супроводжується розвитком діарейного та набрякового синдромів. Останній, як відомо, обумовлений впливом шиготоксинів, безпосередньо STX2e на судини організму, що індукує розвиток набряку головного мозку та раптову загибель.

Патогенез дії цього токсину ґрунтується на його взаємодії з клітинним рецептором. Останні розташовуються в основному на епітеліальних клітинах товстого відділу кишечника та кровоносних судин. Конгломерація токсину з рецептором сприяє збільшенню діapedезу кровоносних судин та утворенню набряку тканин, у тому числі і головного мозку. Ці зміни обумовлюють прояви нервової клініки у свиней та як наслідок, раптову їх загибель [32].

***Brachyspira spp.*** – мікроорганізми роду спірохет мають значну розповсюдженість серед свиней усього світу, у том числі й в Україні [18].

До останнього часу найбільш поширеним та небезпечним патогеном з роду мікроорганізмів *Brachyspira spp* вважали *Br. hyodysenteriae*. Це спірохетальна бактерія, яка викликає дизентерію свиней. Уражаючи стадо ця бактерія спричинює значних економічних збитків господарству, що обумовлене розвитком у інфікованих тварин мукоїдної або кривавої діареї, значної смертності та підвищення конверсії корму [55].

На епідемічну діарею частіше всього хворіють свині на відгодівлі, свиноматки та ремонтний молодняк, але інколи цю патологію реєструють і у поросят до та після відлучення [38].

З появою технології ПЛР та генетичного секвенування було виділено та ідентифіковано кілька нових видів брахіспір (табл. 1) [27].

Таблиця 1

### Клінічне значення деяких *Brachyspira* spp. у свиней

Назва мікроорганізмів	Гемоліз	Прояви
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Сильний бета-гемоліз	Тяжкі ентероколіти з кровавою діареєю (дизентерія)
<i>Brachyspira suanatina</i>	Сильний бета-гемоліз	Подібний до дизентерії
<i>Brachyspira hampsonii</i>	Сильний бета-гемоліз	Подібний до дизентерії
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	Слабкий бета-гемоліз	Легка форма спірохетального коліту
<i>Brachyspira murdochii</i>	Слабкий бета-гемоліз	Відсутні (непатогенні)
<i>Brachyspira intermedia</i>	Слабкий бета-гемоліз	Відсутні (непатогенні)
<i>Brachyspira innocens</i>	Слабкий бета-гемоліз	Відсутні (непатогенні)

За нещодавніми повідомленнями було встановлено, що новий вид брахіспір – *B. suanatina* здатна спричинювати патологію, яка за клінічними ознаками не відрізняється від дизентерії у свиней. Проте, слід відзначити, що розповсюдженість цього мікроорганізму є не великою і обмежується декількома країнами північної Європи [75].

За морфологічними ознаками, характеристикам росту та ферментативними властивостями *B. suanatina* є подібною до штамів *B. hyodysenteriae*. За міжнародною класифікацією DDH, рівень спорідненості *B. suanatina* з іншими представниками *Brachyspira* spp за рядом ознак склав від 16 % до 64 %, що надало можливість класифікувати цей мікроорганізм як

окрему нозологічну одиницю, яка є ще одним представником родини *Brachyspira*. Філогенетичний аналіз геному *B. suanatina* довів, що ця бактерія разом із *B. intermedia* утворюють окрему кладу, яка є суттєво відмінною від *B. hyodysenteriae*. Дослідники відзначили, що геном *B. hyodysenteriae* є найменшим серед всіх представників *Brachyspira spp.* Це дає можливість припускати, що мікроорганізми цієї родини схильні до редуکتивної еволюції [70].

*B. hampsonii* викликають ураження тварин з клінічними проявами подібними до дизентерії. Патогенетичний вплив на організм цього мікроорганізму супроводжується муко-геморагічним колітом у свиней. За результатами авторів вплив на організм *B. hampsonii* проявляється імуносупресією, яка проявляється активацією синтезу 4 інтерлейкіну Т-хелперами. Цей інтерлейкін у свиней пригнічує антиген-стимульовану проліферацію В-клітин та сприяє протизапальній відповіді. Одночасно з цим вплив на організм *B. hampsonii* супроводжується комбінацією чотирьох факторів – інгібування коагуляції уражених тварин кишечника, активація ангиогенезу і вазодилатації, а також дефективна репарація епітелію. Все це формує механізм, за допомогою якого *B. hampsonii* викликає кровотечі у просвіт товстої кишки та стійкого коліту у свиней [33].

*B. pilosicoli* є повільно ростучою анаеробною спірохетою, що колонізує товсту кишку. Колонізація зазвичай відбувається у свиней і дорослих курчат, викликаючи при цьому коліт / тифліт, діарею, зниження швидкість росту і продуктивності.

Уперше *B. pilosicoli* була описана у Великобританії у 1980 році. Цей слабо гемолітичний ізолят Р43/6/78 був виділений із проб фекалій свиней з діареями після відлучення та на дорощені. У тварин спостерігали коліти та мукоїдну діарею. У свиней-гнотобіотів, які пізніше були експериментально інфіковані бактерією штаму Р43/6/78 розвивалися коліт і діарея. У однієї тварини було виявлено велику кількість спірохетних клітин, які були зафіксовані одним кінцем бактеріальної клітини до апікальної поверхні

колоноцитів, що створювало певну межу у вигляді «псевдо щітки». Цей стан було названо кишковим спірохетозом [47].

*B. pilosicoli* виділяється з фекаліями протягом 2-7 днів після експериментальної інокуляції, хоча інкубаційний період може тривати до 20 діб. Першими клінічними ознаками зазвичай є опущення боків і розвиток водянистою або слизової діареї. Консистенція калу часто змінюється, нагадуючи вологий цемент або кашу, і може блищати при наявності слизу. Діарея може бути зеленою або коричневою, містить згустки слизу, а іноді плями крові. Діарея зазвичай триває від 2 до 14 днів, хоча може повторюватися. Уражені свині пригнічені, згорблені, забруднені фекаліями, іноді у них спостерігається лихоманка, але вони зазвичай продовжують їсти. Свині з рецидивуючою діареєю можуть демонструвати значну втрату маси тіла, низьку конверсію корму і більш тривалий період відгодівлі до ринкової маси [47].

Інші мікроорганізми з родини *Brachyspira*, такі як *B. murdochii*, *B. intermedia* та *B. innocens* хоч і колонізують кишечник свиней не шкодять здоров'ю тварин, тому їх називають сапрофітними мікроорганізмами [27].

*Lawsonia intracellularis* – це анаеробна облигатна внутрішньоклітинна бактерія, що уражає тонкий кишечник, а іноді і товстий кишечник свиней та інших тварин, включаючи хом'яків і коней. Інфекція індукована *L. intracellularis* характеризується широким поширенням у стаді, кишковою кровотечею, некрозом або будь-якою комбінацією, яку часто називають «Ілеїт», що впливає на здоров'я і продуктивність свиней. Незважаючи на десятиліття досліджень цього патогену, фактори патогенезу та вірулентності цього мікроорганізму точно не відомі [50].

Клінічні ознаки інфекції *L. intracellularis* у свиней часто характеризуються гострою діареєю різного ступеня тяжкості та чорними фекаліями, які можуть переходити в рідку діарею з домішками крові. Тварини стають блідими, слабкими і швидко гинуть. Субклінічний перебіг захворювання часто проявляється зниженням приростів маси тіла свиней,

може супроводжуватися спорадичною діареєю, зниженням швидкості росту, анорексією і апатією [68].

У природних умовах *L. intracellularis* поширюється фекально-оральним шляхом. Відомо, що цей організм виживає у фекаліях при 15° С до 2 тижнів. Експериментальна пероральна інокуляція *L. intracellularis* призводить до розвитку ілеїту на тлі ураження кишкового епітелію через 3-5 днів, з видимими клінічними ознаками, що з'являються через 11-15 днів та зберігаються у продовж двох тижнів. Сам збудник виділяється з калом приблизно через 7 днів після інфікування у продовж 12 тижнів. Антиген збуднику виявляють в епітеліальних клітинах дистального відділу тонкої кишки і проксимального відділу товстої кишки до 28 днів після інфікування [68].

Слід відзначити, що фактори які обумовлюють адгезію *L. intracellularis*, а також проникнення бактерії у клітину-господаря та розмноження у ній, включаючи проліферацію клітин-господарів, а також наступне поширення бактерії до сусідні клітин, на сьогодні невідомі [49].

*L. intracellularis* уражає у першу чергу ентероцити крипт, особливо ті, які знаходяться на межі між криптою і ворсинкою. Інфіковані ентероцити накопичують мікроорганізми в апікальному кінці. Уражені клітини набухають і утворюють виступи, які, як вважається, опосередковують поширення бактерій в просвіт при втраті мікроросинок. У процесі розвитку інфекції *L. intracellularis* також можуть виявлятися у макрофагах, розташованих у власній пластинці кишечнику, навіть після повного виділення антигену *L. Intracellularis* з просвіту кишечнику. Отже, вважається, що макрофаги відіграють важливу роль у поширенні інфекції [25].

***Salmonella spp.*** – грам негативні бактерії, які визивають захворювання – сальмонельоз. Ця хвороба широко поширена серед людей і тварин. З усіх серотипів *Salmonella*, яких на сьогодні нараховують понад 2400, найбільш важливими, що викликають клінічне захворювання свиней, є *Salmonella choleraesuis* і *Salmonella typhimurium*. Перша є специфічним серотипом,

адаптованим для свиней, і може викликати важкі захворювання, широко поширені у свиноматок – лихоманка, сепсис, пневмонія, менінгіт, артрит і діарея. Однак найбільш часто у свиней зустрічається серотип *S. typhimurium*, який іноді асоціюється з діареєю у молодих свиней і є джерелом харчової інтоксикації у людей. Свині можуть бути субклінічними переносниками *S. choleraesuis* протягом тривалого часу тому, що мікроорганізм виживає в мезентеріальних лімфатичних вузлах, розташованих в кишечнику. Багато латентних носіїв не виділяють бактерії з калом, якщо вони не знаходяться в стресових умовах. Деякі свині можуть виділяти бактерії з фекаліями безперервно або періодично. Розвиток захворювання залежить від штаму і дози збудника. Це означає, що для появи клінічних ознак необхідно відносно велика кількість бактерій. Сальмонельоз може виникати у будь якого віці, але частіше зустрічається у свиней на відгодівлі старше 8 тижнів життя [28].

За латентної інфекції сальмонельоз не викликає значних економічних втрат на тлі недоотримання продуктивності тварин. Основними причинами, що завдає галузі збитків за сальмонельозу є контамінація туш збудником, який завдяки своїм біологічним особливостям здатний індукувати інфекцію у людей, а також формування мультирезистентних штамів до антибактеріальних препаратів, оскільки у свинарських підприємствах за технологічною схемою застосовують велику кількість антибіотиків. Ці факторами є визначними у епідеміологічному значенні сальмонельозної інфекції, особливо у ланцюзі «свиня-людина». Само тому проблема сальмонельозу є надзвичайно актуальною у всьому світі [22].

*Clostridium spp.* є анаеробними грампозитивними спороутворюючими паличками з декількома різними видами, що викликають різні захворювання у свиней. *Clostridium spp.* викликають захворювання завдяки токсинам, які вони виробляють. Найбільшої шкоди свинарству завдають *Clostridium diffiile* та *Clostridium perfringens* [73].

*Cl. diffiile* у свиней зазвичай викликає неонатальні діареї, які проявляються у перші кілька годин або днів життя. Вважається, що хвороба

викликана двома токсинами А і В. Введення антитоксинів може пом'якшити перебіг захворювання [74]. Застосування антимікробних препаратів не впливає на тяжкість перебігу захворювання у новонароджених свиней, що пов'язано з дисбактеріозом, оскільки у новонароджених поросят відразу після народження ще не сформований мікробіом кишечника. Вважається, що моноінфекція *C. diffiile* не спостерігаються у свиней віком більше 7 днів. У своїй роботі Arruda et al. [20] показали, що свині у віці 10 діб є сприйнятливими до патогенного впливу *C. diffiile*.

Кишкова колонізація *C. difficile* відбувається в перші години життя у новонародженої свині, і майже всі поросята деяких стад інфікуються протягом 48 годин після народження. Незважаючи на ендемічну природу бактерій, не у всіх поросят розвивається захворювання. У середньому вражається 66% гнізд, а в уражених гніздах захворюваність може досягати 97-100%. Смертність сильно залежить від ряду факторів, у тому числі супутню інфекційну етіологію. У поросят часто відмічають затримку росту, що проявляється меншою масою на момент відлучення у середньому на півкілограма порівняно з неураженими поросятами [48].

За патогенність *C. diffiile* відповідають два основні токсини А і В, які продукуються бактерією після потрапляння її у сприятливі умови навколишнього середовища. Токсини *C. diffiile* є частиною великого сімейства глюкозилуючих токсинів клостридій з молекулярною масою 308 і 270 кДа, 2710 та 2366 амінокислот відповідно, що робить ці токсини двома найбільшими бактеріальними токсинами, які були охарактеризовані. Гени, що відповідають за синтез токсину та регуляторні гени, які регулюють експресію гену токсинів знаходяться в локусі відомому як патогенний острів *C. difficile*. Токсини А та В мають ентеротоксичний та цитотоксичний вплив відповідно. Токсин А також володіє цитотоксичним ефектом, але в 100 разів менше, ніж В. [35].

Патогенез дії токсинів на слизову кишечника полягає у зв'язування токсинів з рецепторами клітин. Слід відзначити, що рецептори взаємодії з А

токсином знаходяться на апікальнолатеральній частині мембрани ентероцитів, а рецептори до В токсину на базомедіальній частині мембрани. З огляду на це автори вважають, що для патогенного впливу на ентероцити токсину В необхідна попередня альтерація клітин кишечника. Проте, обидва токсини інтерналізуються через опосередкований рецепторами ендоцитоз, після чого відбувається зниження рН, що призводить до структурних змін токсину, у результаті чого вивільняється ферментативний N-кінцевий домен. Останній завдяки ряду реакцій порушує сигнальну структуру цитоскелету, що призводить до набухання клітин кишечника, відшарування їх від базальної мембрани та загибелі. Також ці токсини здатні індукувати апоптоз в епітеліальних клітинах, Т-клітинах та еозинофілах [31].

Загибель ентероцитів та пошкодження епітеліальних щільних з'єднань призводить до ерозій та виразок у стінці кишечника, підвищення ступеня проникності та гострого запального процесу, що переважно характеризується нейтрофільною інфільтрацією, виділенням фібрину та білкової рідини [51].

*Clostridium perfringens* є одним з найбільш розповсюджених анаеробних мікроорганізмів. На сьогодні виділяють 5 основних токсинотипів, які диференціюються за рахунок здатності синтезувати різні токсини (табл. 2).

Таблиця 2

**Токсинотипи *Cl. perfringens* та їх токсини і сприйнятливі тварини [73]**

Тип	Сприйнятливі тварини						Токсин				
	Свині	Вівці	Кози	Птиця	ВРХ	Коні	$\alpha$ -	$\beta$ -	$\beta 2$ -	$\epsilon$ -	$\iota$ -
<b>A</b>	X	X		X	X		X		X		
<b>B</b>		X			X	X	X	X		X	
<b>C</b>	X	X	X	X	X	X	X	X			
<b>D</b>		X	X		X		X			X	
<b>E</b>		X			X		X				X

Серед усього різноманіття лише *Cl. perfringens* типів А і С викликають патологію у свиней. Патогенний вплив на організм тварин *Cl. perfringens*



проявляє опосередковано через дію своїх шести токсинів. Завдяки першим п'яти, що наведені у таблиці, типують бактерію, а шостий – ентеротоксин (СРЕ) може синтезуватися всіма типами *Cl. perfringens*, що не володіє диференціальним значенням [79].

Інфекція *Cl. perfringens* типу С реєструється у всьому світі та характеризується у більшості випадків геморагічним, часто летальним, некротичним ентеритом у молодих поросят. Ознаками ураження є глибокий некроз слизової оболонки та емфізема тонкої кишки, іноді поширюючись на сліпу кишку та проксимальну частину товстої кишки [42].

Розповсюдження *Cl. perfringens* відбувається фекально-оральним шляхом. Зазвичай *Cl. perfringens* типу С в кишечнику здорових тварин зустрічається достатньо рідко та у слідових кількостях. Цей патоген може інтенсивно колонізувати кишечник після дії інших збудників, таких як вірус трансмісивного гастроентериту, кокцидії, ротавірус та вірус епідемічної діареї свиней. Інфекція типу С найчастіше зустрічається у 3-денних поросят, але може з'явитися вже через 12 годин після народження. Іноді захворювання починається у свиней старше 1 тижня життя. Хвороба виникає епізоотично у невакцинованих стадах, а поширеність уражених гнізд може досягати 100%. Кількість смертельних випадків варіює, але може сягати і 100%, особливо у гніздах від неімунних свиноматок, тоді як у середньому цей показник складає 50 %. При підвищеному імунітеті стада хвороба може набувати ензоотичного характеру, у результаті чого легкі випадки захворювання реєструються протягом перших місяців [79].

*Cl. perfringens* типу С може розмножуватися до  $10^8$ - $10^9$  колонієутворюючих одиниць (КУО)/г вмістимого кишечника лише за кілька годин. На тлі адгезії мікробу на епітеліальних клітинах вершин ворсинок товстої кишки відбувається десквамація ентероцитів та проліферація бактеріальних клітин уздовж базальної мембрани. Утворюється некроз власної пластинки із значними крововиливами. Некротична зона швидко рухається уперед, залучаючи крипти, слизову оболонку, підслизові та

м'язові шари. Всі ці ураження тканин відбуваються завдяки патогенному впливу  $\beta$ -токсину, що продукується *Cl. perfringens* [41].

*Cl. perfringens* типу А зареєстрована у всьому світі та є представником нормальної флори кишечника свиней, але також може ставати причиною ентероколітів у новонароджених, а іноді й у відлучених поросят [73].

*Cl. perfringens* типу А за культуральними властивостями дуже схожа на тип С, але цей мікроорганізм синтезує  $\alpha$ -токсин. Крім того, багато штамів *Cl. perfringens* типу А продукують  $\beta$ 2-токсин, який за повідомленням М. Waters із співавт. [85], приймає вирішальну участь у розвитку ентериту.

Хвороба індукована *Cl. perfringens* типу А розвивається у поросят протягом першого тижня життя, при цьому ймовірним джерелом їх інфікування є свиноматки. Слід зауважити, що діагностика ускладнюється тим, що диференціація нормальної флори від хвороботворної неможлива [79].

Патогенез ентериту індукованого *Cl. perfringens* типу А у свиней недостатньо вивчений, але, ймовірно є багатофакторним. Мікроорганізми синтезують  $\alpha$ - і можуть продукувати  $\beta$ 2-токсини у просвіті тонкої та клубової кишок. Адгезія *Cl. perfringens* типу А на ентероцитах та некроз епітелію кишечника спостерігається при експериментально індукованих інфекціях, а у природних випадках є дуже рідкісним явищем. Це сприяє відсутності грубих та мікроскопічних уражень кишечника, а саме захворювання супроводжується лише секреторною діареєю [41, 85].

Отже, бактеріальні захворювання шлунково-кишкового тракту у свиней, на відміну від більшості вірусних інфекцій, реєструються у продовж усього періоду життя та можуть індукуватись широким спектром мікроорганізмів, які у більшості випадків колонізують кишечник свиней та продукують токсини, або розмножуються у ентероцитах, викликаючи при цьому діареї, що суттєво впливає на продуктивність тварин. Лікувально профілактичні заходи під час виникнення кишкових інфекцій можуть суттєво відрізнитись навіть, якщо вони індуковані різними мікроорганізмами з одного сімейства. З

огляду на це, актуальним є своєчасне виявлення етіології бактеріальних хвороб шлунково-кишкового тракту та диференціація збуднику до типу.

### **1.3. Лабораторна діагностика шлунково-кишкових хвороб свиней**

Інфекційні хвороби знижують продуктивність сільськогосподарських тварин, а глобалізована торгівля тваринами та їх продуктами збільшує загрозу зараження хворобами. Точні та швидкі діагностичні тести є важливою складовою планів дій на випадок надзвичайних ситуацій для виявлення, контролю та викорінення таких захворювань. Діагностика включає ланцюг певних дій, який зазвичай починається з виявлення клінічних ознак, після чого збирають зразки біологічного матеріалу та транспортують їх до лабораторії для проведення діагностичних тестів та з метою виявлення етіології захворювання.

На сьогодні існує велика кількість методів лабораторної діагностики, які поділяють на дві основні групи – прямі та опосередковані. Прямі методи визначають наявність у досліджуваному матеріалі власне збудника або його антигени чи нуклеїнові кислоти. Опосередковані методи орієнтовані на визначення слідів присутності збудника в організмі, до яких відносять специфічні антитіла або продукти життєдіяльності патогенів [10].

До прямих лабораторних методів відносять мікроскопію, імунофлуорисцентний аналіз (IFA) імуноферментний аналіз (ІФА / ELISA) орієнтований на виявлення антигену збудника, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), культивування мікроорганізмів на поживних середовищах або культурах клітин, імуногістохімічні дослідження, тощо. Опосередкованими методами лабораторної діагностики зазвичай є серологічні тести, такі як реакція аглютинації (РА), реакція гемаглютинації (РГА), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), реакція зв'язування комплементу (РЗК), реакція преципітації (РП), імуноферментний аналіз, що

орієнтований на виявлення антитіл специфічних до антигену збудника [72; 39]

На сьогоднішній день найбільш розповсюдженими у всьому світі методами прямої діагностики є ПЛР та культивування патогенів, а серед опосередкованих – метод ELISA [11; 53].

Метод культивування мікроорганізмів ґрунтується на ізоляції збудника з біологічного матеріалу шляхом його внесення на середовища для розмноження – агар / бульйон або культура клітин, із наступною диференціацією на селективних середовищах.

Основною перевагою цього методу, за культивування бактеріальних патогенів є можливість визначення чутливості ізольованої культури до антибактеріальних препаратів, а при дослідження вірусів – визначити їх окремі біологічні властивості [9].

Слід зауважити, що метод культивування є дуже вибагливий до біологічного матеріалу, оскільки для ізоляції мікроорганізмів у першу чергу вони мають бути живими та здатними до реплікації. Є ряд мікроорганізмів, які швидко гинуть або змінюють свої властивості під час транспортування матеріалу. Інші мікроорганізми мають дуже повільний темп росту, що значно збільшує час дослідження [16].

На сьогоднішній день молекулярні тести для діагностики інфекційних агентів зараз широко використовуються в багатьох клінічних лабораторіях. Найбільш розповсюдженим методом у світі є ПЛР. Суть цього методу ґрунтується на багаторазовій реплікації специфічної для того чи іншого мікроорганізму ділянки ДНК під час циклічно змінюючихся температур з подальшою детекцією результату ампліфікації.

Технологічні переваги методу ПЛР робить його дуже потужними діагностичними інструментами, і значно цінним для виявлення інфекційних агентів, особливо які неможливо культивувати або які важко культивуються.

Слід відзначити, що цей метод орієнтований на дослідженні специфічної ділянки ДНК або РНК збуднику. Це забезпечує високий рівень специфічності методу ПЛР – 99,98% [64]. Одночасно з цим така властивість методу забезпечує здатність генетичного типування мікроорганізмів, оскільки всі їх фенотипові відмінності, за якими диференціюють мікроби класичними методами, відображені у їх геномі, а відповідно може бути ідентифіковано методом ПЛР.

Іншою перевагою є низька вибагливість до біологічного матеріалу. Оскільки за допомогою цього методу ідентифікується генетичний матеріал збуднику, то забезпечувати його життєдіяльність у продовж транспортування не є необхідним, що дозволяє підвищити ефективність діагностики.

Наступною перевагою методу ПЛР є висока чутливість. Це досягається багаторазовим копіюванням специфічного фрагменту ДНК цільового патогену, що є основним принципом цього методу. Саме тому за допомогою ПЛР можна виявити наявність 10 геном-еквівалентів збуднику в досліджуваній пробі [15].

Необхідно відзначити, що модифікація класичного методу ПЛР – застосування зондів з флуоресцентними мітками, дає можливість ідентифікувати результати ампліфікації у реальному часі – ПЛР-РЧ, а відповідно з'ясувати кількість геном-еквівалентів збуднику в біологічному матеріалі, що, відповідно, вказує на кількість збуднику. Слід зауважити, що більшість інфекційних хвороб супроводжується сукупним впливом на організм тварин одразу декількох мікробів, серед яких зазвичай є домінуючий мікроорганізм, який власне викликає патологічний процес, та ряд вторинних мікробів які є ускладнюючим фактором.

Основними недоліками цього методу є його висока вартість, оскільки метод потребує використання дорогого обладнання та витратних матеріалів, та не можливість визначення рівень чутливості ідентифікованих мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, що є головною умовою лікування інфекцій індукованих бактеріальними патогенами.

Таким чином, кількісний ПЛР, який дає можливість визначити домінуючого у патологічному процесі патогену, є невід'ємним методом лабораторної діагностики для подальшого формування схеми лікувально-профілактичних заходів

Метод ELISA зазвичай використовують для дослідження специфічних антитіл до антигенів збудників інфекційних хвороб тварин. Суть цього методу ґрунтується на імунологічній реакції між антигеном, який зафіксований на діагностичному планшеті та антитілом, яке знаходиться у сироватці крові тварин. Слід відзначити, що для діагностики захворювань методом ELISA обов'язково треба враховувати той період, який необхідний для формування сероконверсії, яка зазвичай триває близько 7-10 діб після інфікування [61].

Перевагами цього методу є достатньо виска чутливість і специфічність та висока технологічність, що дає можливість за декілька годин дослідити велику кількість тварин. Також за допомогою цього методу можливо оцінювати формування специфічного гуморального імунітету та рівня групового імунного захисту, що зазвичай необхідно під час проведення імунізації тварин проти різних інфекційних хвороб тварин. Також до переваг застосування методу ELISA є можливість ідентифікації латентних вірусоносіїв, навіть на тлі проведеної вакцинації, що дає можливість їх вчасно видалити із стада та попередити розвиток спалаху захворювання [39].

Основним недоліком застосування методу ELISA для діагностики інфекційних хвороб є неможливість дослідження матеріалу від швидко загинувшої тварини, оскільки для синтезу антитіл, які виявляються за допомогою цього методу, необхідний певний час. Також, недоліком цього методу є неможливість у більшості випадків диференціювати поствакцинальні, постінфекційні та колостральні антитіла, що значно ускладнює діагностичний процес [83].

Отже, на сьогодні у світі існує велика кількість методів лабораторної діагностики інфекційних хвороб тварин, які дають можливість провести

всебічну діагностику та з максимально високою вірогідністю ідентифікувати збудника інфекційної патології, встановити його біологічні властивості та визначити його розповсюдженість у стаді, завдяки чому ветеринарний лікар здатний сформувавши ефективну схему лікувально-профілактичних заходів [53].

## 2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Матеріали і методи дослідження

Дипломна робота виконана в умовах ПЛР-лабораторії відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю агропромислового комплексу ДДАЕУ. Дослідження проведені у рамках науково-технічного договору, головною умовою якого є заборона розголошення результатів лабораторних досліджень та будь якої іншої інформації про замовника, яка була отримана виконавцем у зв'язку з виконанням ним робіт за даним договором. У зв'язку з цим назва підприємства у дипломній роботі не наводиться.

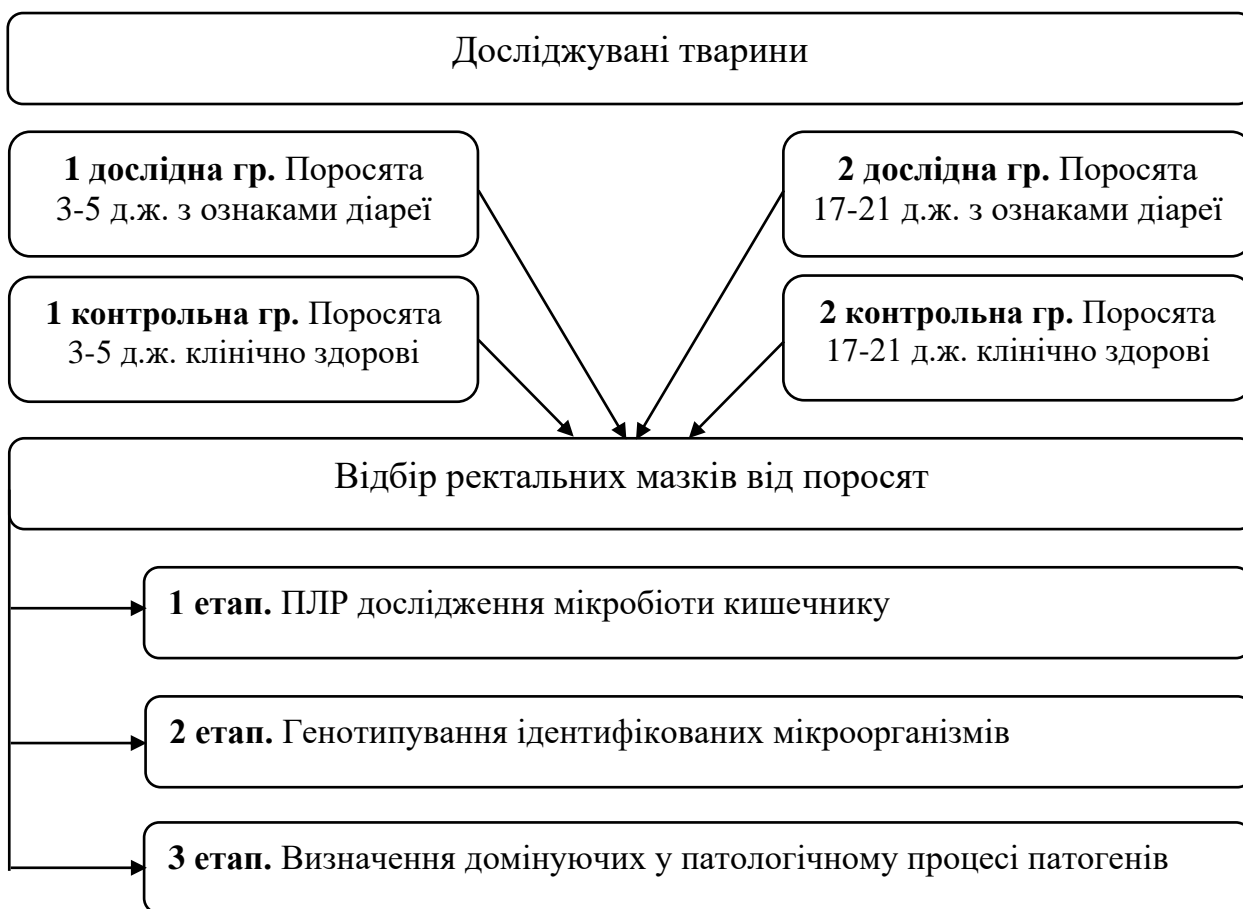
Дослідження проведені на базі сільськогосподарського підприємства з вирощування свиней загальною кількістю поголів'я 62 тис. тварин. Свиноферма містить репродуктор на 6234 свиноматок змішаної генетики.

На свинофермі реєструвався підвищений відсоток випадків діареї у підсисних поросят. За статистичними даними на 2-5 добу життя реєструвались діареї у 42 % поросят. З часом, відсоток тварин з діареєю збільшувався до 73 % у 3-х тижневому віці. Антибактеріальна обробка хворих поросят була малоефективною. Це сприяло збільшенню загибелі тварин у підсисний період до 16,4 %, що є більшим за гранично допустимі показники збереженості поросят у господарстві в 2,98 рази. Для визначення етіології діареї у поросят підсисного періоду було сформовано 4 групи поросят – дві дослідні і дві контрольні віком 3-5 і 17-21 доба життя. Кожна група налічувала по 6 тварин (по 2 тварини з 3 різних гнізд). Поросята дослідних груп мали ознаки діареї, а тварини контрольних груп були клінічно здоровими (рис. 1).

Від поросят для дослідження методом ПЛР відбирали по два ректальні мазки у себе без транспортного середовища. Мазки були одразу



замороженими при температурі  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  –  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  і у замороженому вигляді транспортувались до НДЦ.



**Рис. 1.** Схема дослідження

*Екстракцію генетичного матеріалу* з ректальних мазків проводили за декілька етапів. Спочатку мазки поміщали у 2,0 мл пробірки куди додавали по 500 мкл лізуючого буферного розчину “ATL Buffer” виробництва Biosellal (Франція) та по 2 цирконієві кульки діаметром 2-3 мм. Пробірки щільно закручували і поміщали у ротор приладу для гомогенізації «FastPrep-24» (рис. 2). Гомогенізацію зразків проводили у продовж 40 секунд зі швидкістю 6 м/с та часом прискорення у 2 секунди.

Після гомогенізації пробірки центрифугували у продовж 1 хв. За 13000 об/хв. Для подальшої екстракції нуклеїнових кислот використовувати 200 мкл надосадової рідини.



**Рис. 2.** Гомогенізатор біологічного матеріалу для молекулярних досліджень «FastPrep-24» (Франція)

Екстракцію нуклеїнових кислот проводили автоматично за допомогою приладу «KingFisher Duo Prime» (рис. 3).

Для цього, з метою попередження контамінації, попередньо підготовлювали реактив «LAB-SMB-carrier». Потім готували плашки для екстракції нуклеїнових кислот. В ряд E 96-луночного планшету додавали по 700 мкл «W1 Buffer» попередньо розведеного етанолом. В ряд F планшету вносили по 700 мкл «W2 Buffer» попередньо розведеного етанолом. У ряд G 96-луночного планшету додавали по 750 мкл етанолу. В стрип для елюції (в кожну лунку) додавали по 100 мкл «EL Buffer». В ряд A вносили по 20 мкл розчину ферменту «Proteinase K». Потім додавали по 200 мкл досліджуваних зразків. Далі у лунки з пробами додавали по 500 мкл попередньо приготовленого лізуючого розчину «LAB-SMB-carrier».

Надалі два 96-луночні планшети поміщали у прилад для екстракції нуклеїнових кислот і активували протокол екстракції. Процес очищення нуклеїнових кислот тривав 45 хв.. За один цикл роботи приладу одночасно нуклеїнові кислоти екстрагували з 12 досліджуваних зразків.



**Рис. 3.** Прилад для автоматичної екстракції нуклеїнових кислот за допомогою магнітних кульок «KingFisher Duo Prime» (Thermo Fisher, США)

Після закінчення процесу екстракції у стрипах для елюції було отримано очищений розчин НК, який використовували у подальших ПЛР дослідженнях.

**ПЛР діагностика мікроорганізмів.** У очищеному розчині нуклеїнових кислот визначали специфічні ділянки РНК ротавірусу типів А і С, збуднику епідемічної діареї свиней, та фрагменти ДНК *Cl. perfringens*, *E. coli*, *Cryptosporidium spp*, *Eimeria spp*, *Cystoisospora suis*, а також токсин продукуючі гени А і В *Cl. difficile*.

Генотипування *Cl. perfringens* проводили за шістьма токсин кодуючими генами – Alpha, Beta, Beta-2, Epsilon, Iota та Enterotoxin.

Типування *E. coli* проводили за шістьма токсин кодуючими генами – термостабільним токсином А (STa), термостабільним токсином В (STb), термолабільним токсином (LT), шиготоксинами – STX1 і STX2 та інтиміном (EAE), а також за адгезин кодуючими генами – F4, F5, F18 і F41.

Дослідження вище перелічених показників проводили методом ПЛР з детекцією результатів у режимі реального часу за допомогою праймерів і флуоресцентних зондів фірми EXOPOL (Іспанія).

Для приготування реакційної суміші з метою дослідження ДНК використовували буферні розчини ензиму TaqMan-полімерази насичений нуклеотидами та іонами  $Mg^{2+}$  – «NZY qPCR Probe Master Mix (2x)», а для дослідження РНК – буферний розчин додатково збагачений транскриптазою – «NZYSupreme One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)» виробництва «NZYTech» (Португалія).

Ампліфікацію проводили на приладі «BioRad CFX96» (США) за наступним температурним режимом (табл. 3):

Таблиця 3

#### Температурний режим ампліфікації

№ етапу	Температура $^{\circ}C$	Час	Кількість циклів
1	45	15 хв.	1
2	95	5 хв.	1
3	95	15 сек.	40
4	60	60 сек	

Вимірювання рівня флуоресценції проводили під час 4 етапу температурного режиму за каналом FAM за довжини збудження флуоресценції при 490 нм та реєстрації рівня флуоресценції при 520 нм.

Інтерпретація отриманих результатів ґрунтується на наявності флуоресценції у пробірці за каналом FAM. При цьому проба вважається позитивною якщо крива рівня флуоресценції перетинає порогову лінію, що свідчить про наявність у ній специфічної ділянки ДНК, яка характерна для цільового патогену. Цикл, на якому відбувається перетин порогової лінії визначали як показник Ct. За рекомендаціями виробників до використаних наборів праймерів та зондів зразок вважається позитивним, якщо значення Ct є меншим або дорівнює 38 Од.

***Визначення кількості геном-еквівалентів мікроорганізмів у досліджуваних зразках.*** Розрахунок кількості генетичного матеріалу ідентифікованих мікроорганізмів у ампліфікованій аліквоті проводили автоматично за допомогою програмного забезпечення до приладу «BioRad CFX96» згідно настанови до його використання. Калібрувальні графіки будували за допомогою стандартизованих позитивних контрольних зразків, якими комплектуються діагностичні тест-системи для ПЛР дослідження.

Біометричну обробку експериментальних даних проводили статистично з розрахунком критеріїв достовірності та коефіцієнту кореляції за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel з використанням вбудованих статистичних функцій. Результати середніх значень вважали статистично вірогідними при - \* $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

## **2.2. Характеристика Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК**

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету створений у 2008 році на базі проблемної лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин, що була створена на початку 2003 року згідно наказу Міністерства аграрної політики України.

Розташований Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК за адресою м. Дніпро, вул. Мандриківська, 276 у корпусі факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Директором Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК є д.вет.н., доцент Д.М. Масюк.

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК складається з п'яти основних відділів:

- імунохімії та молекулярно-генетичного аналізу;
- фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу;
- бактеріології та біотехнології;
- морфологічних досліджень;
- інформаційної аналітики.

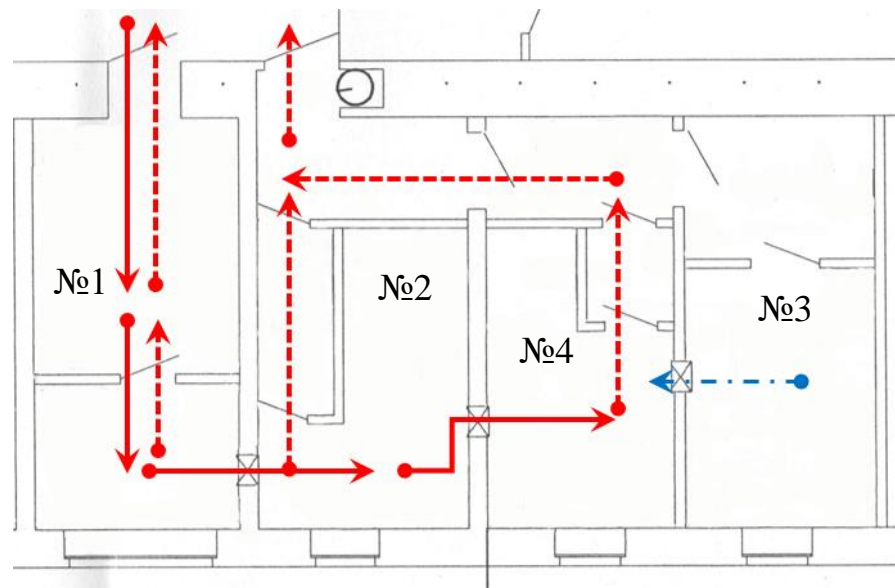
Кожен з перших чотирьох відділів у своєму складі містить по дві лабораторії. Так, до складу відділу імунохімії та молекулярно-генетичного аналізу входять лабораторія імунохімії та ПЛР-діагностики. Відділ фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу формується з лабораторії хіміко-токсикологічних досліджень та клінічної біохімії; відділ бактеріології у своєму складі містить лабораторії бактеріології та біотехнології, а відділ морфологічних досліджень – лабораторію гістології та імуногістохімії, а

також лабораторію патоморфології та паразитології. Відділ інформаційної аналітики забезпечує комунікацію усіх лабораторій та відділів центру.

Діяльність лабораторії ПЛР-діагностики відділу імунохімії та молекулярно-генетичного аналізу орієнтована на діагностику інфекційних хвороб тварин, генотипування мікроорганізмів, виявлення генетично-модифікованих мікроорганізмів та визначення фальсифікації продуктів харчування та кормів. Для цього лабораторія має офіційний дозвіл на роботу з мікроорганізмами 3-4 групи патогенності №02-18 від 19.01.2018 року, яке дійсне до 19.01.2023 року.

ПЛР-лабораторія складається з 4 основних приміщень (рис. 4):

1. Приміщення реєстрації та первинної обробки матеріалу;
2. Приміщення для екстракції нуклеїнових кислот;
3. Приміщення приготування реакційних сумішей;
4. Приміщення внесення проб у реакційну суміш та проведення ПЛР-ампліфікації.



**Рис. 4.** Схема приміщень ПЛР-лабораторії та рух біологічного матеріалу під час дослідження (червоні стрілки вказують на рух «брудного» матеріалу, а сині – «чистого»)

Усі приміщення ПЛР-лабораторії оснащені бактерицидними лампами з ультрофіолетовим випроміненням, гігрометрами для контролю показників

зовнішнього середовища (температура, вологість) дезінфекційними розчинами для обробки рук та робочих поверхонь, бахілами, одноразовими гумовими рукавичками неопудреними, халатами, тощо.

Всі кімнати лабораторії з'єднані між собою шлюзовими вікнами для передавання досліджуваного матеріалу, що забезпечує поточність біологічного матеріалу та виключає контамінацію.

У приміщенні реєстрації та первинної обробки матеріалу, яка має загальну площу 15 м<sup>2</sup>, розташовані комп'ютера для роботи спеціалістів, робоча та нормативна документація, дві морозильні камери для зберігання досліджуваних матеріалів. Також це приміщення оснащено фарфоровими ступками з пестиками для первинної гомогенізації матеріалу, гомогенізатором «FastPrep-24» (Франція), вагами 2 класу точності «Radwag AS 220.R2» (Польща) та комплектом одноканальних дозаторів змінного об'єму.

Приміщення екстракції нуклеїнових кислот складається з передбоксу та боксу, загальною площею 15 м<sup>2</sup>, обладнане лабораторними меблями, ламінарною шафою 2 класу біологічної безпеки, високошвидкісною центрифугою та двома низкошвидкісними центрифугами для мікропробірок, твердотільним термостатом, гомогенатором та станцією для автоматичної екстракції нуклеїнових кислот «KingFisher Duo Prime» (Thermo Fisher, США) та комплектом одноканальних дозаторів змінного об'єму.

У цьому приміщенні проводиться екстракція нуклеїнових кислот з різноманітного біологічного матеріалу різними методами – за допомогою центрифужних колонок із силікатною мембраною, на кремнієвому сорбенті та за допомогою магнітних кульок. Всі ці методи дають можливість отримати розчин нуклеїнових кислот високого ступеню очищення.

Приміщення приготування реакційних сумішей є найбільш чистою зоною ПЛР лабораторії, оскільки там зберігаються реактиви, з яких виготовляється реакційна суміш для ПЛР-дослідження. Це приміщення має як і попереднє передбокс з боксом загальною площею 12 м<sup>2</sup> і обладнане ПЛР-



боксом, двома морозильними камерами для зберігання реактивів, центрифугою-вортексом, та комплектом одноканальних дозаторів змінного об'єму.

*Приміщення внесення проб у реакційну суміш та проведення ПЛР-ампліфікації* має передбокс з боксом загальною площею 12 м<sup>2</sup>, у якому розташовані настільний ПЛР-бокс з комплектом дозаторів, центрифугою для 96 лункових мікропланшет на та центрифугою-вортексом. На окремому столі розташовані два ампліфікатори – АНК 32 (Росія) на 32 лінки для одночасної ампліфікації та BioRad CFX 96 (США) на 96 лунок. Кожен з ампліфікаторів обладнаний системою “Rea Time”, тобто здатні реєструвати рівень флуоресценції у режимі реального часу. Прилад АНК 32 обладнаний 4-ма світловими фільтрами для детекції рівня флуорисценції, а BioRad CFX 96 – п'ятьма, з яких чотири детектуючих і один калібруючий.

У ПЛР-лабораторії для проведення досліджень використовуються реактиви світових лідерів своєї галузі, таких як Kuhl (Німеччина), EXOPOL (Іспанія), ID, Biosellal (Франція), ZTN (Португалія), та ін.

Працівники лабораторії систематично проходять стажування у провідних лабораторіях Європи та приймають участь у міжнародних лабораторних порівняльних дослідженнях з провідними лабораторними центрами світу.

Отже, лабораторія ПЛР-діагностики оснащена сучасним високотехнологічним обладнанням та реактивами світових лідерів, а також висококваліфікованим персоналом, що дає їй можливість працювати з високою якістю та постійно підтверджувати свою високу кваліфікацію та ефективність у міжнародних міжлабораторних порівняльних дослідженнях організованих провідними лабораторними центрами світу.

## 2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз

### 2.3.1. Видовий склад мікроорганізмів кишечника підсисних поросят різного віку з ознаками діареї

Результати дослідження генетичного матеріалу мікроорганізмів у ректальних мазках отриманих від підсисних поросят клінічно здорових та з проявами діареї характеризують стан мікробіому кишечника.

Отримані результати ПЛР дослідження клінічно здорових поросят 3-5 добового віку вказують про колонізацію кишечника усіх тварин *E. coli* та у трьох з шести – *Cl. perfringens*, про що свідчить наявність генетичного матеріалу у ректальних мазках (табл. 4).

Таблиця 4

Результати ПЛР дослідження мікроорганізмів кишечника поросят 3-5 діб життя з ознаками діареї (% , n=6)

Мікроорганізми	1 дослідна група	1 контрольна група
<i>Rotavirus type A</i>	0	0
<i>Rotavirus type C</i>	100	0
<i>PEDV</i>	0	0
<i>Cl. perfringens</i>	100	50
<i>Cl. difficile</i> toxin A	0	0
<i>Cl. difficile</i> toxin B	33	0
<i>E. coli</i>	100	100
<i>Cryptosporidium spp</i>	0	0
<i>Eimeria sp</i>	0	0
<i>Cystoisospora suis</i>	0	0

Дослідження матеріалу від поросят 3-5 діб життя з ознаками діареї вказують на присутність в усіх пробах генетичного матеріалу ротавірусу типу С, а також бактерій *Cl. perfringens* і *E. coli*, а у двох тварин з шести ще й ген токсину В *Cl. difficile*.

Отже, мікробіом клінічно здорових поросят 3-5 добового віку представлений двома бактеріями *E. coli* та *Cl. perfringens*, а у поросят з ознаками діареї чотирма мікроорганізмами – ротавірусом типу С, *Cl. perfringens*, *E. coli* та *Cl. difficile*.

Слід відзначити, що *E. coli* та *Cl. perfringens* є нормальними представниками мікробіоти кишечника поросят [43, 41], тоді як ротавірус типу С та токсин В синтезуюча *Cl. difficile* є патогенними мікроорганізмами, які здатні самотійно індукувати ентерит у поросят [65, 84, 31].

Результати дослідження генетичного матеріалу мікробіоти кишечника клінічно здорових поросят 17-21 доби життя вказують на присутність в усіх шести тварин ділянки ДНК специфічної для *E. coli* та у чотирьох з шести свиней *Cl. perfringens* (табл. 5).

Таблиця 5

**Результати ПЛР дослідження мікроорганізмів кишечника поросят 17-21 діб життя з ознаками діареї (% , n=6)**

Мікроорганізми	2 дослідна група	2 контрольна група
<i>Rotavirus type A</i>	100	0
<i>Rotavirus type C</i>	0	0
<i>PEDV</i>	0	0
<i>Cl. perfringens</i>	83	67
<i>Cl. difficile</i> toxin A	0	0
<i>Cl. difficile</i> toxin B	0	0
<i>E. coli</i>	100	100
<i>Cryptosporidium spp</i>	0	0
<i>Eimeria sp</i>	0	0

<i>Cystoisospora suis</i>	0	0
---------------------------	---	---

У поросят з ознаками діареї окрім генетичного матеріалу *E. coli* та *Cl. perfringens*, які виявлено у 100 % та 83 % тварин відповідно, всі проби містять РНК ротавірусу типу А.

Таким чином, мікробіом клінічно здорових поросят 17-21 добового віку представлений двома бактеріями *E. coli* та *Cl. perfringens*, а у поросят з ознаками діареї трьома мікроорганізмами – *Cl. perfringens*, *E. coli* та ротавірусом типу А. Слід зауважити, що останній здатний самостійно індукувати ентерити у підсисних поросят та свиней після відлучення [77, 82].

Підсумовуючи вище наведене можна зробити висновок, що діареї поросят у 3-5 добовому віці індуковані патогенною дією ротавірусу типу С, які ускладнюються в деяких випадках *Cl. difficile*, здатною синтезувати ентеротоксин В. У поросят 17-21 добового віку діареї індуковані ротавірусом типу А. Це узгоджується з результатами Juliet Cherpengo [30], яка із співавторами з'ясувала, що у поросят перших діб життя частіше за все ентерити індуковані атипovими формами ротавірусів, а у більш старших тварин класичним ротавірусом типу А. Таку закономірність автори пов'язують з наявністю у поросят колострального імунітету до класичного ротавірусу та відсутністю молозивного захисту проти атипovих форм вірусу.

### 2.3.2. Генотипування мікроорганізмів методом полімеразної ланцюгової реакції

Результати ПЛР-дослідження ізольованих від підсисних поросят бактерій за токсин і адгезин кодуєчими генами характеризують тип мікроорганізмів, які колонізують кишечник досліджуваних тварин.

Так, досліджуючи генетичний матеріал *Cl. perfringens* за шістьма основними токсин кодуєчими генами встановлено, що всі ізольовані бактерії містять ген альфа токсину і лише 44 % ген бета 2 токсину (табл. 6).

Таблиця 6

Результати генотипування *Cl. perfringens* ізольованої з кишечника підсисних поросят, %

Токсин кодуючі гени <i>Cl. perfringens</i>	Перша група (3-5 діб життя)		Друга група (17-21 доба життя)	
	дослідна, n=6	контрольна, n=3	дослідна, n=5	контрольна, n=4
Alpha toxin	100	100	100	100
Beta toxin	0	0	0	0
Beta-2 toxin	67	33	40	25
Epsilon toxin	0	0	0	0
Iota Toxin	0	0	0	0
Enterotoxin	0	0	0	0

За даними А. Ramirez [73], *Cl. perfringens*, яка здатна синтезувати лише альфа токсин та/або бета 2 токсин класифікується як *Cl. perfringens* типу А.

Отже, враховуючи наявність в геномі ізольованих бактерій *Cl. perfringens* лише генів, які кодують токсини альфа та бета 2 можна зробити висновок, що колонізація кишечника підсисних поросят відбувається бактеріями *Cl. perfringens* типу А.

Визначаючи наявність токсин кодуючих генів у геномі *E. coli* встановлено, що всі поросята з проявами діареї містять кишкову паличку з геном, який кодує синтез термостабільного токсину В (STb) та термолабільного токсину (LT) (табл. 7).

Також виявлено, що у 17 % клінічно здорових поросят 3-5 добового віку та 33 % тварин 17-21 добового віку ДНК *E. coli* містить гени кодуючі токсини STb та LT. Слід відзначити, що синтезувати термостабільні та термолабільні токсини мають здатність лише ентеротоксигенні форми *E. coli* [32].

Отже, у кишечнику 100 % підсисних поросят з ознаками діареї та у 25 % клінічно здорових свиней присутні ентеротоксигенні форми *E. coli*.

Таблиця 7

**Результати типування ізольованої з кишечнику підсисних поросят *E. coli* за токсин кодуючими генами, (% , n=6)**

Токсин кодуючі гени <i>E. coli</i>	Перша група (3-5 дів життя)		Друга група (17-21 доба життя)	
	дослідна	контрольна	дослідна	контрольна
STa	0	0	0	0
STb	100	17	100	33
LT	100	17	100	33
STX1	0	0	0	0
STX2	0	0	0	0
EAE	0	0	0	0

Результати дослідження ДНК ізольованих бактерій *E. coli* свідчать про наявність у всіх поросят з ознаками діареї, а також у однієї з шести тварини 3-5 добового віку і у двох з шести свиней 17-21 добового віку генів кодуючих фімбріальні адгезини F4 (табл. 8).

Таблиця 8

**Результати типування ізольованої з кишечнику підсисних поросят *E. coli* за генами фімбріальних адгезинів, (% , n=6)**

Гени факторів вірулентності <i>E. coli</i>	Перша група (3-5 дів життя)		Друга група (17-21 доба життя)	
	дослідна	контрольна	дослідна	контрольна
F4	100	17	100	33
F5	0	0	0	0
F18	0	0	0	0

F41	0	0	0	0
-----	---	---	---	---

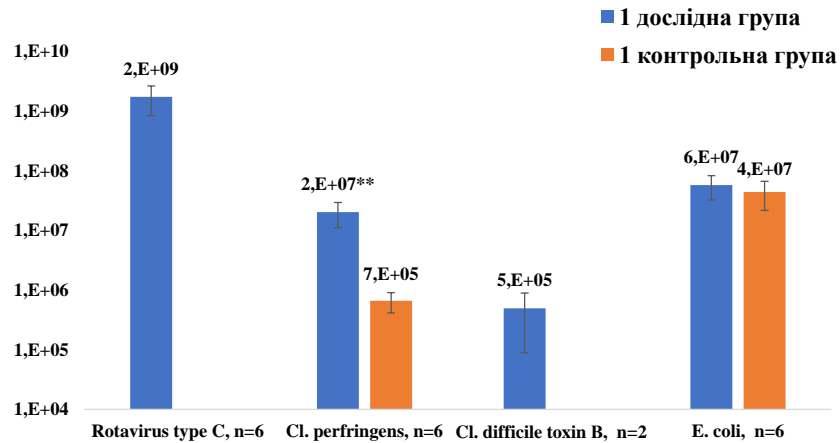
Слід відзначити, що ген фімбріального адгезину F4 *E. coli* виявлений у тих самих поросят, у яких ідентифіковані токсин кодуєчі гени ST $\beta$  та LT.

Отже, виявлені у підсисних поросят ентеротоксигенні форми *E. coli* мають здатність до синтезу фімбріального адгезину F4, завдяки якому бактерії адгезуються на енетроцитах кишечника, тим самим колонізуючи його та витісняючи непатогенні форми *E. coli* [32, 46].

Враховуючи вищезазначене у підрозділі «Генотипування мікроорганізмів методом полімеразної ланцюгової реакції» можна зробити узагальнюючий висновок, що до мікробіому кишечника підсисних поросят входить *Cl. perfringens* типу А, генетичний матеріал якої містить гени токсину альфа та бета 2, а також ентеротоксигенні форми *E. coli*, які володіють генами кодуєчими термостабільний токсин b, термолабільний токсин та фімбріальний адгезин F4.

### **2.3.3. Розподіл мікроорганізмів у кишечнику підсисних поросят з ознаками діареї**

Результати кількісного ПЛР дослідження мікробіому характеризують розподіл мікроорганізмів у кишечнику підсисних поросят. Встановлено, що у кишечнику клінічно здорових свиней 3-5 добового віку переважна більшість бактерій представлена *E. coli*, генетичного матеріалу якої у 100 разів більше ніж *Cl. perfringens* (рис. 5).



**Рис. 5.** Розподіл мікроорганізмів у кишечнику підсисних поросят 3-5 добового віку, ( $M \pm m$ , г.-е.)

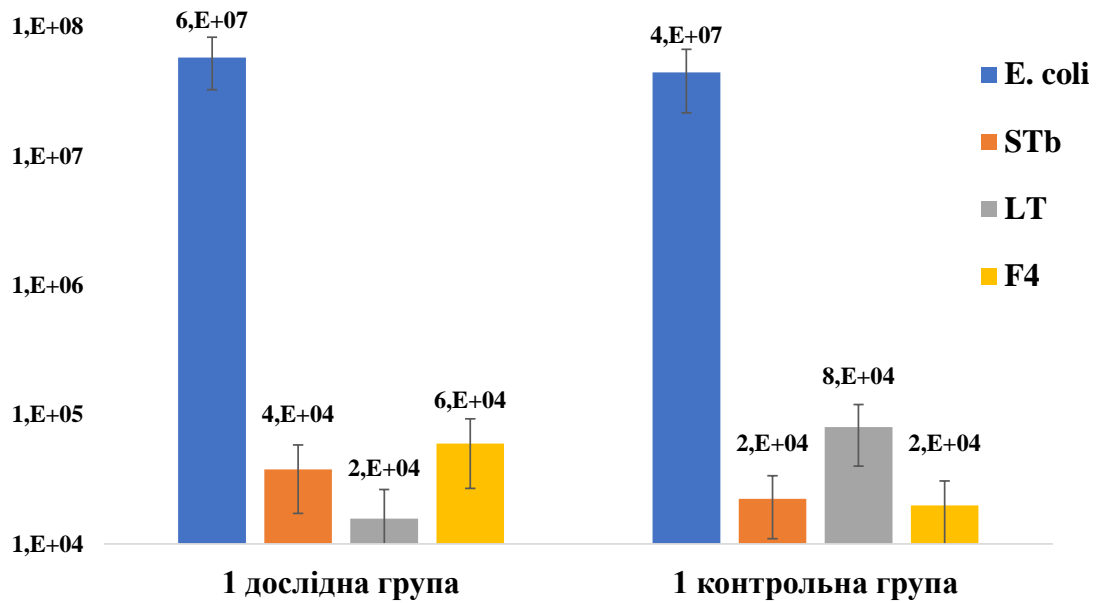
Порівнюючи результати отримані під час дослідження поросят з ознаками діареї слід відзначити, що домінуючим мікроорганізмом у їх мікробіомі є ротавірус типу С, кількість якого склала  $2 \times 10^9$  геном-еквівалентів, тоді як у клінічно здорових тварин він є взагалі відсутнім.

Слід відзначити, що кількість генетичного матеріалу *E. coli* та *Cl. perfringens* у поросят з ознаками діареї суттєво не відрізняються між собою, а їх значення коливається у межах  $10^7$ . Проте кількість *Cl. perfringens* є достовірно більшою в 100 разів ( $p \leq 0,01$ ) у поросят з ознаками діареї порівняно до значень отриманих від клінічно здорових тварин. Найменша кількість генетичного матеріалу виявлено за показником В токсин кодууючої *Cl. difficile*.

Отже, домінуючим мікроорганізмом у кишечнику клінічно здорових поросят віком 3-5 діб життя є *E. coli*, а у поросят цього віку з ознаками діареї – ротавірус типу С.

Порівнюючи співвідношення токсигенних та адгезин продукуючих форм *E. coli* встановлено, що у поросят 3-5 добового віку як дослідної так і контрольної груп присутні ентеротоксигенні форми бактерій, проте їх кількість не перевищує декількох мікроорганізмів на 1000 умовно-патогенних форм *E. coli* (рис. 6).

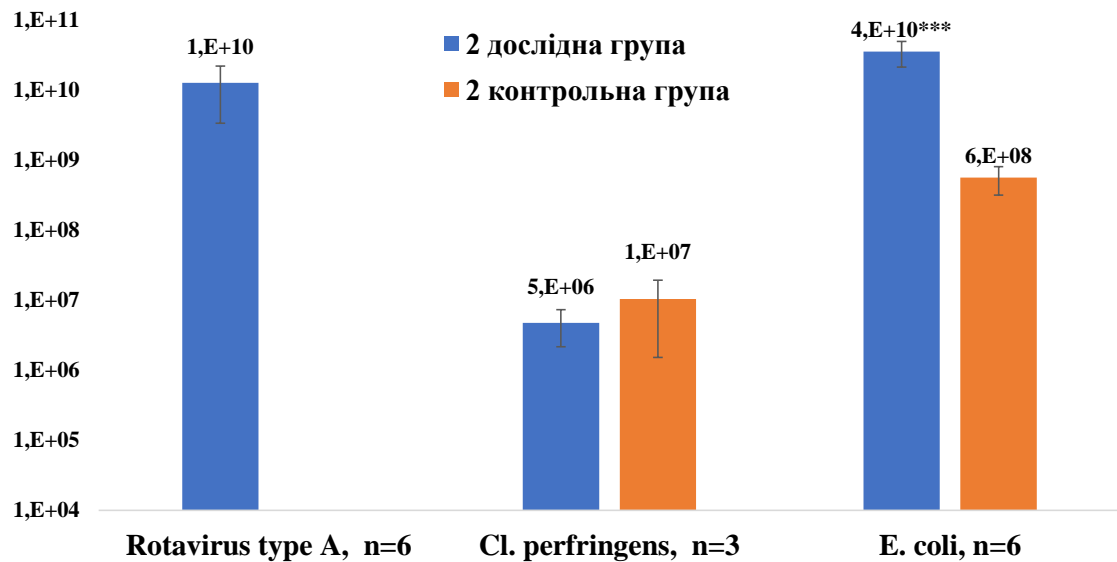




**Рис. 6.** Співвідношення ентеротоксигенних форм *E. coli* у кишечнику підсисних поросят 3-5 добового віку, ( $M \pm m$ , г.-е.,  $n=6$ )

Отже, більшість ідентифікованих форм *E. coli* не містять факторів вірулентності. За даними Daniel Dubreuil [37] кількість ентеротоксигенних форм *E. coli* яка не перевищує співвідношення – 1 патогенної бактерії на 1000 умовно-патогенних її форм не здатна індукувати ентерит у свиней.

Результати дослідження клінічно здорових поросят 17-21 добового віку вказують на колонізацію кишечника двома основними бактеріями – *Cl. perfringens* та *E. coli*, різниця між якими зменшилась у 10 разів порівняно до значень отриманих від поросят 3-5 добового віку, а кількість цих мікроорганізмів збільшилась у 100 та 10 разів відповідно, порівняно до клінічно здорових поросят 3-5 добового віку (рис. 7).



**Рис. 7.** Розподіл мікроорганізмів у кишечнику підсисних поросят 17-21 добового віку, ( $M \pm m$ , г.-е.)

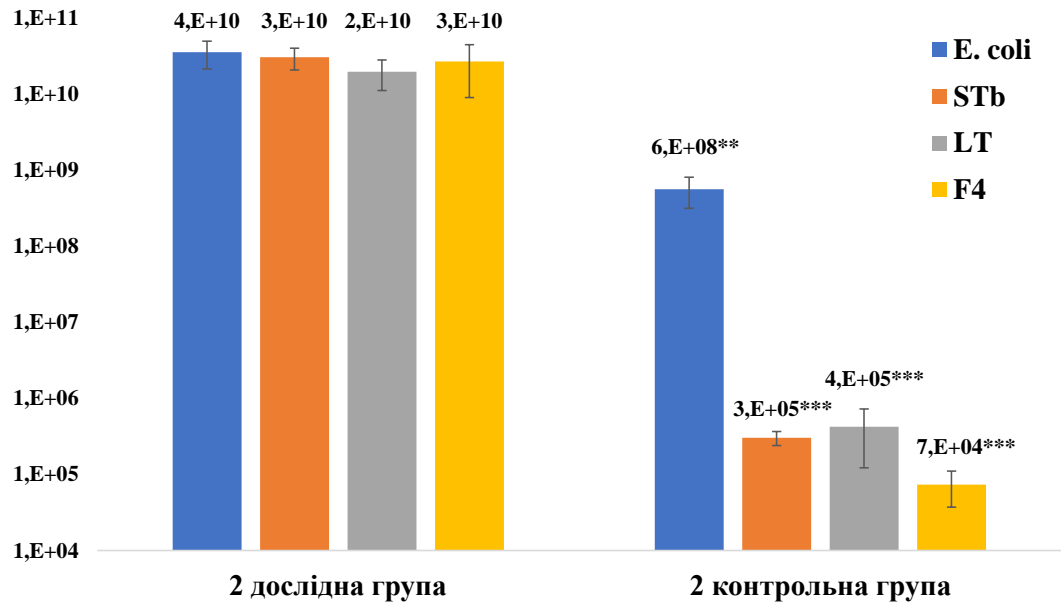
Слід відзначити, що у мікробіомі кишечника клінічно здорових поросят 17-21 добового віку бактерії *E. coli* переважають у 10 разів кількість *Cl. perfringens*.

Результати дослідження ректальних мазків від поросят 17-21 добового віку з ознаками діареї вказують на домінуючи присутність у кишечнику ротавірусу типу А та *E. coli*, кількість яких між собою не відрізняється і коливається у межах  $\log 10$  суттєво. Також, у поросят з діареями виявлено генетичний матеріал *Cl. perfringens*, кількість якого на чотири порядки є меншою за значення ротавірусу типу А та *E. coli*.

Слід зауважити, що на тлі присутності ротавірусу типу А у поросят з ознаками діареї в кишечнику міститься велика кількість бактерій *E. coli*. Їх кількість переважає значення клінічно здорових тварин цього віку у 100 разів, що вказує на прогресію колонізації кишечника поросят з клінічними ознаками діареї кишковою паличкою.

Отже, домінуючим мікроорганізмом у кишечнику клінічно здорових поросят віком 17-21 доба життя є *E. coli*, а у мікробіомі поросят з ознаками діареї переважають одразу два мікроба – ротавірус типу А та *E. coli*.

Результати дослідження кількості генів факторів вірулентності *E. coli* вказують на низький рівень превалентності у клінічно здорових поросят 17-21 добового віку токсин та адгезин синтезуючих форм *E. coli* порівняно до загальної її кількості, що складає у середньому від 1/1 000 до 1/10 000 (рис. 8).



**Рис. 8.** Співвідношення ентеротоксигенних форм *E. coli* у кишечнику підсисних поросят 3-5 добового віку, ( $M \pm m$ , г.-е.,  $n=6$ )

Дослідивши наявність токсин та адгезин кодуючих генів у *E. coli* ізольованої від свиней 17-21 добового віку з ознаками діареї встановлено, що вся популяція кишкової палички, яка знаходиться у кишечнику свиней володіє генетичними факторами вірулентності та здатна синтезувати ентеротоксини і фактор адгезії F4.

Отже, серед пулу бактерій *E. coli* ізольованої з кишечника клінічно здорових поросят 17-21 добового віку лише 1/1 000 частка володіє генетичними факторами вірулентності, що є недостатнім для розвитку ентериту, проте є потенційним етіологічним фактором виникнення діареї у свиней в майбутньому, на тлі більш інтенсивної колонізації їх патогенними формами тонкого відділу кишечника. У тварин з ознаками діареї усі ідентифіковані форми *E. coli* є ентеротоксигенними, а відповідно здатні як

самостійно викликати ентерит у свиней так і ускладнювати вже індукований інфекційний процес.

Підсумовуючи вищенаведені результати можна зробити висновок, що мікробіом кишечника клінічно здорових поросят підсисного періоду представлений двома видами бактерій – *Cl. perfringens* та *E. coli* з домінуючою більшістю останньої, у популяції якої присутні слідові кількості ентеротоксигенних форм. У мікробіомі кишечника поросят 3-5 добового віку з ознаками діареї домінуючим є ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – ротавірус типу А та ентеротоксигенні форми *E. coli*.

Отже, етіологічними чинником діарей у поросят 3-5 добового віку є ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – коінфекція ротавірусу типу А та ентеротоксигенної *E. coli*.

## **2.4. Розрахунок економічної ефективності застосування методу ПЛР для диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у свиней**

Розрахунок економічної ефективності проведення ПЛР діагностики кишкової інфекційної патології проводили за наступними параметрами - вартість одиниці часу провідного фахівця лабораторії, витрати електроенергії на проведення дослідження, вартість витрачених матеріалів та амортизацію задіяного обладнання.

Виходячи з вище перелічених пунктів, проведемо розрахунок затрат на проведення одного дослідження.

1. Розрахунок вартості одиниці часу провідного фахівця ПЛР-лабораторії.

Оплата праці провідного фахівця ПЛР-лабораторії становить 6000,00 грн., середня кількість робочих днів за календарний місяць – 21, враховуючи тривалість робочого дня, яка складає 7 годин, а також кількість годин, що необхідна для проведення дослідження – 14 годин, можна розрахувати вартість затраченого часу на проведення комплексу ПЛР-досліджень.

За умовами праці можна розрахувати вартість одиниці часу для проведення ПЛР аналізу:  $6000 / 21 / 7 \times 14$ .

Отже, вартість часу провідного фахівця ПЛР-лабораторії затраченого на дослідження складає 571,43 грн.

На електроенергію витрачається в середньому 20 грн.

Амортизаційні відрахування від використання приладів для проведення ПЛР-аналізу в залежності від їх вартості 15400000 грн., строку 5 років, часу використання при дослідженні 8 години, можлива кількість досліджуваних зразків за один аналіз – 92 проб (за умови повної завантаженості приладу).

Амортизаційні відрахування складають:

$$15400000 / 5 / 12 / 22 / 8 / 92 \times 2 = 3,17 \text{ грн/показник}$$

Всього досліджено 24 проби за 25 показниками.

Отже, амортизаційні витрати на проведення дослідження склали 1902,00 грн.

Вартість екстракції нуклеїнових кислот з однієї проби складає 152,15 грн. Всього нуклеїнові кислоти екстрагували з 24 зразків біологічного матеріалу.

Отже, вартість екстракції нуклеїнових кислот для ПЛР-дослідження біологічного матеріалу склала 3651,6 грн.

Вартість реактивів, що були використані для ПЛР-дослідження становить 243 грн/показник. Всього було досліджено 24 проби за 25 показниками.

Отже, вартість реактивів для дослідження ПЛР-дослідження складає 145800,00 грн.

Відрахування до центру зайнятості, пенсійного фонду та на медичного страхування разом складає близько 36,2% від заробітної плати профідного фахівця. З огляду на це сума нарахувань буде складати:

$(6000,00 \times 36,2 / 100) / 21$  (кількість робочих днів у місяці)  $\times 2$  (необхідна кількість часу для проведення дослідження) = 197,45 грн.

Отже, державні нарахування на проведені дослідження методом ПЛР складають 197,45 грн.

Враховуючи вище наведені показники можна розрахувати собівартість проведених ПЛР-досліджень:

$$571,43 + 1902,00 + 3651,6 + 145800,00 + 197,45 = 152122,48 \text{ грн.}$$

Враховуючи те, що одночасно було проведено дослідження 24 проб, то вартість дослідження 1 проби становить 6338,44 грн.

Слід відзначити, що у кожній пробі визначалось одразу 25 показників, що у перерахунку на кількість проб складає 253,54 грн. за один показник.

Отже, собівартість ПЛР-дослідження 1 показнику у одній пробі складає 253,54 показник.

Середня вартість ПЛР-дослідження одного показнику складає 419,80 грн.

Економічну ефективність розраховуємо за формулою:

$$E_e = V_d - V_{всоб}$$

де:

$V_d$  – вартість дослідження одного зразку за одним показником;

$V_{всоб}$  – собівартість дослідження одного зразку за одним показником.

$$E_e = 419,80 - 253,38 = 166,42$$

Отже, проведення діагностики кишкових інфекцій підсисних поросят із застосуванням методу ПЛР у НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК ДДАЕУ є економічно вигідним та складає 166,42 грн чистого прибутку на одну пробу.

### **3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ**

У цьому розділі розкрито питання щодо аналізу стану охорони праці та небезпечних і шкідливих виробничих факторів, а також особливостей протипожежних заходів у Науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК ДДАЕУ [17].

#### **3.1. Аналіз стану охорони праці в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК**

Охорона праці у лабораторії ПЛР-діагностики відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень організована згідно до наказу Держнаглядохоронпраці № 67 від 20.04.1999 року, що є затвердженим у Міністерстві юстиції України 11 жовтня 1999 р. [6], відповідно до якого роботи у центрі проводять лише особи старше вісімнадцяти річного віку, які пройшли медичний огляд та навчання за методом та допущені до роботи на тих приладах, які необхідні під час виконання тих чи інших досліджень.

У науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК розроблені правила з техніки безпеки і протиепідемічного режиму, в яких відображено специфічні умови роботи, що затверджені ректором.

Перш, ніж приступити до роботи, працівники підрозділу зобов'язані знати безпечні методи праці, свої функціональні обов'язки і вимоги інструкції з охорони праці, а також інструкцій «Про порядок присвоєння 1-ої групи з електробезпеки» і «Правила безпеки під час роботи на персональному комп'ютері».

Для працівників ПЛР-лабораторії розроблені посадові інструкції, де чітко прописані їх функціональні обов'язки та регламент роботи. У лабораторії систематично проводиться контроль за параметрами зовнішнього



середовища, результати якого заносяться до відповідних журналів чи контрольних карток.

Всі працівники ПЛР-лабораторії відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень відповідно до вимог трудового законодавства України при прийнятті на роботу обов'язково проходять первинний інструктаж з техніки безпеки, а потім один раз на пів року проходять повторний інструктаж, під час якого співробітникам пояснюють основні вимоги безпеки під час виконання роботи та після її закінчення, що підтверджується підписами співробітників у журналі інструктажу з техніки безпеки.

Систематичні навчання з охорони праці організовує відділ охорони праці Дніпровського державного аграрно-економічного університету, де співробітників центру та безпосередньо ПЛР-лабораторії вірно і безпечно для себе та навколишнього середовища навчають виконувати свої трудові обов'язки.

За порушення вимог інструкції з охорони праці працівники відділу імунохімічного та молекулярно-генетичного аналізу несуть дисциплінарну, адміністративну, матеріальну і кримінальну відповідальність згідно чинного законодавства та нормативних актів, що діють в університеті.

Кожен працівник ПЛР-лабораторії відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень має санітарну книжку, в якій фіксують результати систематичного медичного огляду. У разі завдання шкоди здоров'ю на робочому місці, відшкодування витрат на лікування відбувається відповідно до наказу ДНАОП 0.05-1.02-93 [7].

Тривалість робочого часу та право на відпустку працівників ПЛР-лабораторії відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень відповідає вимогам кодексу законів України про працю і становить 8 годин на добу, 40 годин на тиждень [5].

Під час функціонування ПЛР-лабораторія дотримується вимог щодо охорони довкілля, контролю за викидами стічної води та охорони ґрунту викладені у ДСП 201 [2], СанПиН 4696 [8].

### **3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів**

Робота у лабораторії організована відповідно до ДСП 9.9.5.-080-02 [3], який регламентує правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях мікробіологічного профілю. Лабораторія має дозвіл на роботу з мікроорганізмами 3-4 групи патогенності (сертифікат №02-18 від 19.01.2018 року, дійсний до 19.01.2023 року).

Згідно з цим нормативним документом при проведенні робіт у ПЛР-лабораторії на співробітників можуть впливати ряд небезпечних та шкідливих факторів, таких як мікроорганізми, або їх продукти життєдіяльності, хімічні реактиви, дезінфекційні засоби, виробниче обладнання, електричний струм, ультрафіолетове та електромагнітне випромінювання, відхилення вологості і температури робочої зони від встановлених норм, людські нервово-психічні та фізичні фактори.

Робота у ПЛР-лабораторії відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень відбувається відповідно до існуючих чинних вимог ДСТУ 6051:2008 [4]. Згідно цього положення ПЛР-лабораторія оснащена припливно-витяжною вентиляцією, яка є окремою для чистої та брудної зони, оскільки це розмежування необхідне для запобігання контамінації приміщень лабораторії ампліконами.

Кожна зона лабораторії забезпечена окремим інвентарем для прибирання та обробки робочого місця. Робочі халати кожної зони обробляються окремо. Слід відзначити, що Науково-дослідний центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК має договір з спеціалізованою фірмою на прасування медичного одягу.

Згідно з ДСТУ 6051:2008 [4], усі робочі поверхні та устаткування зон ПЛР-лабораторії опромінують ультрафіолетовим світлом протягом 1 години до початку та після завершення роботи, після чого обробляють дезінфікантом та 70% етиловим спиртом. Один раз на місяць в усіх приміщеннях ПЛР-лабораторії проводиться вологе прибирання.

Біологічний матеріал надходить до ПЛР-лабораторії в одноразових пластикових пробірках. Під час роботи з біологічним матеріалом співробітники лабораторії використовують одноразові неопудрені гумові рукавички.

Електромережа ПЛР-лабораторії забезпечена заземленням, яке під'єднане до кожного приладу та електричних розеток.

Всі хімічні реактиви та шафи і холодильники та морозильні камери, які використовують для зберігання реактивів та досліджуваних зразків є промаркованими та мають чітку ідентифікацію. За необхідності відбувається контроль температурного режиму.

### **3.3. Пожежна безпека**

Протипожежна безпека у лабораторії ПЛР-діагностики відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень забезпечена згідно ГОСТ 12.1.004-76 [1], заходи якої орієнтовані на попередження виникнення пожеж, забезпечують пожежну безпеку співробітників та матеріальних цінностей. Враховуючи вище вказане будівельні матеріали, які використовувались під час ремонтних робіт, є стійкими до підвищених температур.

Кожне приміщення лабораторії забезпечене порошковими вогнегасниками «ВП-5», які систематично проходять перевірку та перереєстрацію.

З метою попередження виникнення пожежі у лабораторії регулярно перевіряється стан електроприладів та ізоляції проводів.

Згідно чинного законодавства України паління у лабораторії заборонене. Паління працівниками лабораторії відбувається у спеціально відведеному для цього місці, яке забезпечене порошковим вогнегасником.

Одночасно з цим, холі науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК розташований протипожежний щит, який обладнаний набором інвентарю, до якого обов'язково входить вогнегасники, відра, ящик з піском та пожежний гідрант.

Кожне приміщення науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК має план евакуації, у якому відображений рух персоналу у разі виникнення пожежі. Лабораторія забезпечена пожежним виходом, який знаходиться у вільному доступі, а персонал є проінструктований згідно правил його використання.

Відповідальність за пожежну безпеку покладена на директора науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК – Масюка Дмитра Миколайовича.

## 4. ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

У дипломній роботі розкрито вирішення завдань та узагальнено отримані результати щодо особливостей диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом полімеразної ланцюгової реакції, що підтверджується наступними висновками:

1. Видовий склад мікроорганізмів кишечника клінічно здорових підсисних поросят представлений двома бактеріями *E. coli* та *Cl. perfringens*. У кишечнику свиней з ознаками діареї віком 3-5 діб життя на тлі вище зазначених бактерії додатково ідентифіковано В токсин синтезуючу *Cl. difficile* та ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – ротавірус типу А.

2. За результатами генотипування мікроорганізмів встановлено, що ідентифікована *Cl. perfringens* відноситься до типу А, оскільки її генетичний матеріал містить альфа та бета-2 токсинкодуєчі гени, а *E. coli* є ентеротоксигенною, на що вказує наявність у її геномі фрагментів, що кодують термостабільний токсин b, термолабільний токсин та фімбріальний адгезин F4.

3. Серед мікроорганізмів кишечника клінічно здорових поросят підсисного періоду домінуючою бактерією є *E. coli*, у популяції якої присутні слідові кількості ентеротоксигенних форм. Серед мікроорганізмів кишечника поросят 3-5 добового віку з ознаками діареї домінуючим є ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – ротавірус типу А та ентеротоксигенні форми *E. coli*.

4. Етіологічними чинником діарей у поросят 3-5 добового віку є ротавірус типу С, а у поросят 17-21 добового віку – коінфекція ротавірусу типу А та ентеротоксигенної *E. coli*.

5. Проведення діагностики кишкових інфекцій підсисних поросят із застосуванням методу ПЛР у НДЦ біобезпеки та екологічного контролю

ресурсів АПК ДДАЕУ є економічно вигідним та складає 166,42 грн чистого прибутку на одну пробу.

### **РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Для диференціальної діагностики етіології шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят виробництву рекомендовано проводити дослідження ректальних мазків від свиней з ознакам діареї методом полімеразної ланцюгової реакції з детекцією результатів у режимі реального часу, який дає можливість визначити домінуючий у патологічному процесі патоген.

З метою формування ефективної схеми імунопрофілактичних заходів виробництву рекомендовано проводити генотипування ідентифікованих у біологічному матеріалі мікроорганізмів, що дає можливість точно визначити типи циркулюючих серед свиней мікробів та, відповідно, підібрати гомологічні вакцини.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. ГОСТ 12.1.004-76 Пожарная безопасность. Общие требования;
2. ДСП 201-97 Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами);
3. ДСП 9.9.5.-080-02 Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю;
4. ДСТУ 6051:2008. ПЛР-лабораторія для молекулярної діагностики. Загальні вимоги. 17 с.;
5. Кодекс законів про працю України. – Харків: Одиссей, 2016. – 158 с.;
6. Наказ Держнаглядохоронпраці «Про правила охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини» (офіційне видання) № 67 від 20.04.1999 р. // Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11 жовтня 1999 р. за N 695/3988;
7. Правила охраны труда при техническом обслуживании и ремонте машин и оборудования сельскохозяйственного производства // Утверждено приказом Минтруда № 512 от 30.11.2001 г.;
8. СП 4696-88 Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны;
9. Глебенюк В.В. Моніторинг патогенів шлунково-кишкового тракту: панелі qPCR та мікробіологічний аналіз / В.В. Глебенюк, Н.Ю. Неверковець, Д.М. Масюк, А.В. Кокарев // Прибуткове свинарство, 2020. – №3 (57). – С. 66-71;
10. Дзюблик І.В. Етіологічна діагностика гострих вірусних інфекцій: роль у сучасній системі охорони здоров'я та економічна ефективність / І.В. Дзюблик, С.О. Соловійов, О.В. Ковалюк // Інфекційні хвороби, 2018. – №1(91). – С. 46- 53. DOI 10.11603/1681-2727.2018.1.8672;

11. Дизентерия и кишечный спирохетоз свиней : современное представление и аспекты лабораторной диагностики / [ В. В. Глебенюк, Е. Н. Ефимова, Д. Н. Масюк и др. ] // Корми і факти / ТОВ «Видавництво «АГРО ПРЕС». –2019. – № 8(108). – 31-33. – Режим доступа : <http://dspace.dsau.dp.ua/jspui/handle/123456789/2785>;
12. Кокарев А.В. Загальні уявлення про коронавірусні ентерити у свиней та особливості їх лабораторної діагностики / А.В. Кокарев, С.Г. Коляда, Г.С. Мовкалова, А.В. Крайній, Д.М. Масюк // Корми і факти, 2016. – №4 (68). – С. 33 – 35;
13. Ляхович Л.М. Набрякова хвороба свиней: диференціація клінічних варіантів та термінальні патології / Л.М. Ляхович // Ветеринарна біотехнологія, 2018. – № 32 (2). – С. 335 – 341;
14. Масюк Д.М. Колібактеріоз свиней: новітні підходи у діагностиці / Д.М. Масюк, Т.О. Василенко, А.В. Кокарев, К.О. Крутій // Корми і факти, 2019. – №1 (101). – С. 31-33;
15. Масюк Д.М. Оцінка протоколу очищення та дезінфекції у свинарських приміщеннях контамінованих вірусом епідемічної діареї свиней / Д.М. Масюк, О.І. Сосницький, А.В. Кокарев, Т.О. Василенко // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки, 2018.-Т. 20, № 92.-С. 130-136.-Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnuvmbvn\\_2018\\_20\\_92\\_29](http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnuvmbvn_2018_20_92_29);
16. Масюк Д.Н. Особенности лабораторной диагностики актинобациллярной плевропневмонии свиней / Д.Н. Масюк, С.Г. Коляда, А.В. Кокарев, Н.Ю. Неверковец, Г.С. Мовкалова // Корми і факти, 2016. – № 3 (67). – С. 38-41;
17. Методичні рекомендації до виконання розділу у дипломних роботах «Охорона праці у ветеринарній медицині»: методичні рекомендації / уклад.: В.О. Сапронова, Дніпро, 2019. 7 с.;



18. Шаталов С. Спірохетози свиней: особливості лабораторної діагностики / С. Шаталов, О. Єфімова, А. Кокарєв, Д. Масюк // Прибуткове свинарство, 2020. – № 3 (57). – С. 56-58;
19. Anbalagan S. Genome sequence of torovirus identified from a pig with porcine epidemic diarrhea virus from the United States / S. Anbalagan, J. Peterson, B. Wassman, J. Elston, K. Schwartz // Genome Announc, 2014. – №2(6). – P. 111 – 116;
20. Arruda P. H. Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of Clostridium diffiile infection in neonatal piglets / P. H. Arruda, D. M. Madson, A. Ramirez et al. // Anaerobe, 2013. – №22. – P. 104–110;
21. Banyai K. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia / K. Banyai, G. Kemenesi, I. Budinski, F. Foldes, B. Zana, S. Marton, R. Varga-Kugler, M. Oldal, K. Kurucz, F. Jakab. // Infect. Genet. Evol., 2017.– №48. – P. 19–26;
22. Baptista F.M. cFactors influencing Salmonella carcass prevalence in Danish pig abattoirs / F.M. Baptista, J. Dahl, L.R. Nielsen // Preventive Veterinary Medicine, 2010. – №3-4 (95). – P. 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.04.007>;
23. Bishop R.F. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis / R.F. Bishop, G.P. Davidson, I.H. Holmes, B.J. Ruck // Lancet, 1973,. – № 2. – P. 1281–1283;
24. Boley P.A. Porcine Deltacoronavirus Infection and Transmission in Poultry, United States / P.A. Boley, M.A. Alhamo, K.K. Yadav, M. Vasquez-Lee, L.J. Saif, S.P. Kenney // Emerging Infectious Diseases, 2020. – V. 26, №. 2. – P. 255 – 264. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2602.190346>;
25. Boutrup T.S. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by Lawsonia intracellularis / T.S. Boutrup, H.T. Boesen, M. Boye et al. // Journal of Comparative Pathology, 2010. – №143. – P. 101–109. doi: [10.1016/j.jcpa.2010.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.006);

26. Bridger J.C. Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs / J.C. Bridger, J.F. Brown // *Veterinary Record*, 1985. – № 116. – P. 50;
27. Burrough E.R. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs / E.R. Burrough, E.L. Strait, J.M. Kinyon et al. // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012. – №24 (6). – P. 1025-1034. doi:10.1177/1040638712457927;
28. Campos J. Non-typhoidal *Salmonella* in the pig production Chain: A comprehensive analysis of its impact on human health / J. Campos, J. Mourão, L. Peixe, P. Antunes // *Pathogens*, 2019. – № 8(1). – p. 19. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010019>;
29. Chasey D. Atypical rotaviruses in pigs and cattle / D. Chasey, P. Davies // *Veterinary Record*, 1985. – № 114. – P. 16–17;
30. Chepngeno J. Rotavirus C: prevalence in suckling piglets and development of virus-like particles to assess the influence of maternal immunity on the disease development / J. Chepngeno, A.Diaz, F.C. Paim, L.J. Saif, A. N Vlasova // *Chepngeno et al. Vet Re.*, 2019. – №50. – P. 84 – 96;
31. Chumbler N.M. *Clostridium difficile* Toxin B causes epithelial cell necrosis through an autoprocesing-independent mechanism / N.M. Chumbler, M.A. Farrow, L.A. Lapierre et al. // *PLoS Pathog.*, 2012. –№ 8. e1003072;
32. Cornick N.A. Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease / N.A. Cornick, I. Matise, J. E. Samue et al. // *Journal of Infectious Diseases*, 2000. – №181. – P. 242-251;
33. Costa M.O. Swine dysentery disease mechanism: *Brachyspira hamptonii* impairs the colonic immune and epithelial repair responses to induce lesions / M.O. Costa, J.C.S. Harding // *Microbial Pathogenesis*, 2020. – № 148. – P. 104470. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104470>;
34. Dastjerdi A. Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine. / A. Dastjerdi, J. Carr, R. J. Ellis, F. Steinbach, & S. Williamson // *Emerging Infectious Diseases*, 2015. – № 21(12). – P. 2235–2237;

35. Davies A.H. Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins / A.H. Davies, A.K. Roberts, C.C. Shone, K.R. Acharya // *Biochemical Journal*, 2011. – №3. – P. 517-526;
36. Dhama K. Toroviruses affecting animals and humans: A review / Dhama K., Pawaiya RVS., Chakraborty S., Tiwari R., Verma A.K. // *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2014. – №9(3). – P. 190-201;
37. Dubreuil J. D. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowingis halfthe battle / J. D. Dubreuil // *FEMS Microbiology Letters*, 2008. – №278. – P. 137-145. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00967.x
38. Duff J.W. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* in sows and suckling piglets / J.W. Duff, J.S. Pittman, J.M. Hammer, J.M. Kinyon // *Journal of Swine Health and Production*, 2014. – №22(2). – P. 71–77;
39. Eriksson E. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry / E. Eriksson and A. Aspan // *BMC Veterinary Research*, 2007. – № 3. – P. 21-40. doi:10.1186/1746-6148-3-21;
40. Estes M. Rotaviruses. In *Fields Virology*, 5 ed. / M. Estes, H.B. Greenberg, D.M. Knipe, P. Howley // *Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA*, 2013; p. 1395;
41. Fernandez-Miyakawa M. E. Role of *Clostridium perfringens* alpha, beta, epsilon, and iota toxins in enterotoxemia of monogastrics and ruminants / M. E. Fernandez-Miyakawa, L. M. Redondo // *Microbial Toxins. Toxinology*. Springer. Dordrecht, 2018. – P. 93-118. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6449-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6449-1_16);
42. Forti K. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated in Italy / K. Forti, L. Ferroni, M. Pellegrini et al. // *Toxins*, 2020. – №12, P. 650-670; doi:10.3390/toxins12100650;
43. Francis D.H. Colibacillosis in pigs and its diagnosis / D.H. Francis // *journal of swine health and production abbreviation*, 1999. – №7(5). P. 241–244;

44. Garkusha S.E. Pathomorphological changes at transmissible the gastroenteritis of pigs / S.E. Garkusha, J.V. Konovalov // *Scientific Messenger LNUVMB*, 2017. – №19(78). – P. 150–153;
45. Goede D. Production impact and time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) / D. Goede, R. B. Morrison // *Preventive Veterinary Medicine*, 2016. – № 123. – P. 202–207;
46. Gresse R. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health / R. Gresse, F. Chaucheyras-Durand, M.A. Fleury et al. // *Trends in Microbiology*, 2017. – № 25. – P. 851 - 873. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004;
47. Hampson D.J. The spirochete *Brachyspira pilosicoli*, enteric pathogen of animals and humans / D.J. Hampson // *Clinical Microbiology Reviews*, 2018. – №31 (1). – P. 17 – 48. DOI: 10.1128/CMR.00087-17;
48. Hopman N.E. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets / N.E. Hopman, E.C. Keessen, C. Harmanus et al. // *Veterinary Microbiology*, 2011. – №1-2. – P. 186-192;
49. Huan Y.W. *Lawsonia intracellularis* exploits beta-catenin/Wnt and Notch signalling pathways during infection of intestinal crypt to alter cell homeostasis and promote cell proliferation / Y.W. Huan, R.J. Bengtsson, N. MacIntyre et al. // *PLoS ONE*, 2017.– 12:e0173782. doi: 10.1371/journal.pone.0173782;
50. Karuppanan A.K. *Lawsonia intracellularis*: revisiting the disease ecology and control of this fastidious pathogen in pigs / A.K. Karuppanan, T. Opriessnig // *Frontiers in Veterinary Science*, 2018. – № 181 (5). – P. 1 – 11. doi: 10.3389/fvets.2018.00181;
51. Kelly C.P. The host immune response to *Clostridium difficile* / C.P. Kelly, L. Kyne // *Journal of Medical Microbiology*, 2011. – №8. – P. 1070-1079;
52. Koopmans M. Toroviruses of animals and humans: A review / M. Koopmans, M.C. Horzinek // *Advances in Virus Research*, 1994. – №43. – P. 233-273;

53. Krutiy K. O. Detection, control of distribution and evaluation of the effectiveness of curative and preventive measures against swine salmonellosis using ELISA / K. O. Krutiy, D. M. Masiuk, A. V. Kokarev et al. // Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC, 2017. – №5(4). – P. 25–30;
54. Laude H. Replication of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus (TGEV) in Swine Alveolar Macrophages / H. Laude, B. Charley and J. Gelfi // Journal of general virology, 1988. № 69 (7). – P. 1725-1730;
55. Lugsomya K. First identification and characterisation of Brachyspira hyodysenteriae in pigs in Hong Kong / K. Lugsomya, F. Zeeh, T. La, N. Phillips and D.J. Hampson // Lugsomya et al. Porcine Health Management, 2019. – №5. – P. 27-29. <https://doi.org/10.1186/s40813-019-0133-x>;
56. Mare A.D. Enteropathogenic Escherichia coli—A Summary of the Literature. / A.D. Mare, C.N. Ciurea, A. Man, et al. // Gastroenterology insights, 2021. – №12. – P. 28–40. <https://doi.org/10.3390/gastroent12010004>;
57. Marthaler D. Widespread rotavirus H in commercially raised pigs / D. Marthaler, K. Rossow, M. Culhane, et al. // Emerging Infectious Diseases, 2014. – № 20. – P. 1195–1198;
58. Masiuk D. M. Epidemiology, etiology and gene analysis of spike S protein of porcine epidemic diarrhea virus infection in Ukraine during 2016–2017. / D. M. Masiuk, O. I. Sosnitsky, V. S. Nedzvetsky, A. V. Kokarev, S. G. Koliada // Regulatory Mechanisms in Biosystems, 2017. – № 8(4). – P. 602 - 610. [doi:10.15421/021792](https://doi.org/10.15421/021792);
59. Masiuk D. N. The characteristics, emergent properties and manner of spread in Ukraine of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus /, V. S. Nedzvetsky, A. I. Sosnitskiy, A. V. Kokarev, S. G. Koliada // Regulatory Mechanisms in Biosystems, 2018. – №3. – P. 401-408;
60. Masiuk D. The monitoring and molecular epizootiology of porcine epidemic diarrhea in Ukraine during 2014-2018 / D. Masiuk, R. Pogranichniy, V.

Nedzvetsky, V. Hlebeniuk, A. Kokariev, T. Vasylenko and E. Yesina // Veterinarska stanica, 2020. – № 51 (2). – P. 145 – 154;

61. Masiuk D. Evaluation of the effectiveness of various vaccination protocols for pigs against Aujeszky disease / D.Masiuk, A.Kokariev, K.Holda et al. // Advances in Animal and Veterinary Sciences, 2021. – № 4 (9). – P. 483 – 489. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.4.483.489>;

62. Masiuk D.M. Endemic course of epidemic diarrhea of pigs in the stabilized focus of infection / D.M. Masiuk, O.I. Sosnitsky, V.S. Nedzvetsky, A.V. Kokarev, S.G. Koliada // Regulatory Mechanisms in Biosystems, 2017. – № 8(3). – P. 410–416. doi: 10.15421/021763;

63. Masiuk D.M. The formation of colostrial immunity and its duration in calves during the first month of life / D.M. Masiuk, A.V. Kokariev, T.O. Vasilenko, K.O. Krutii // Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences, 2019. – №2(1). – P. 3–6;

64. Masiuk D.M. Evaluation of commercial methods to separate nucleic acids from intestinal tissues of pigs for diagnosis of porcine epidemic diarrhea / D.M. Masiuk, V.S. Nedzvetsky, A.V. Kokariev et al. // Regulatory Mechanisms in Biosystems, 2019. – № 10 (4). – P. 477-483;

65. Matthijnsens J. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains / J. Matthijnsens, M. Ciarlet, E. Heiman, et al. // Journal of Virology, 2008. – № 82. – P. 3204–3219;

66. Matthijnsens J. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijnsens, M. Ciarlet, S.M. McDonald, et al. // Archives of Virology, 2011. – №156. – P. 1397–1413;

67. Matthijnsens J. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation / J. Matthijnsens, P.H. Otto, M. Ciarlet, U. Desselberger, M. Van Ranst, R. Johne // Arch. Virol., 2012.– № 157. – P.1177–1182;

68. McOrist S. Proliferative enteropathy / S. McOrist, J.J. Zimmerman, L.A. Karkiker et al. // Diseases of Swine. 10th ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. – P.811–820;
69. Molinari B.L. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012 / B.L. Molinari, E. Lorenzetti, R.A. Otonel, et al. // Emerging Infectious Diseases, 2014. – № 20. – P. 1019–1022;
70. Mushtaq M. *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics / M. Mushtaq, S. Zubair, T. Råsbäck, E. Bongcam-Rudloff, D.S. Jansson // BMC Microbiol., 2015. – №15. – P. 208. doi: 10.1186/s12866-015-0537-y;
71. Pignatelli J. Longitudinal serological and virological study on porcine torovirus (PToV) in piglets from Spanish farms / J. Pignatelli, L. Grau-Roma, M. Jimenez, J. Segales, D. Rodriguez // Veterinary Microbiology, 2010. – №146(3-4). – P. 260-268;
72. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases: OIE - Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2019. p. 18;
73. Ramirez A. Diseases affecting pigs: an overview of common bacterial, viral and parasitic pathogens of pigs / A.Ramirez // Burleigh Dodds Science Publishing Limited, 2018. Iowa State University, USA. p. 29 <http://dx.doi.org/10.19103/AS.2017.0013.14>;
74. Ramirez A. Use of equine-origin antitoxins in piglets prior to exposure to mitigate the effects of *Clostridium diffiile* infection – a pilot study / A. Ramirez, E. W. Rowe, P. H. Arruda, D. Madson // Journal of Swine Health and Production, 2014. – № 22(1). – P. 29–32;
75. Råsbäck T. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated “*Brachyspira suanatina*” sp. nov. / T. Råsbäck, D.S. Jansson, K.E. Johansson, C. Fellstrom // Environmental Microbiology, 2007. – №9. – P. 983–991. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01220.x.;

76. Saif L. J. Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases. *Springer Science. Business Media*. New York, 1999. № 1. – С. 47–59;
77. Saif L.J. Nongroup A rotaviruses of humans and animals / L.J. Saif, B. Jiang // *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1994. – №185. P. 339–371;
78. Schulz L.L. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States / L.L. Schulz, G.T. Tonsor // *Journal of Animal Science*, 2015. – №93(11). – P. 5111-5118. doi: 10.2527/jas.2015-9136;
79. Songer J. G. Clostridial enteric infections in pigs / J. G. Songer, F. A. Uzal // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005. – №17. P. 528–536;
80. Theil K.W. Group A rotaviruses. In *Viral Diarrheas of Man and Animals* / L.J. Saif, K.W. Theil, et al. // CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1990. – pp. 35–72;
81. Tsunemitsu H. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104) / H. Tsunemitsu, L.J. Saif, B.M. Jiang, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*, 1991. – № 29. – P. 2609–2613;
82. Vlasova A.N. Porcine rotaviruses: epidemiology, immune responses and control strategies / A.N. Vlasova, J.O. Amimo and L.J. Saif // *Viruses*, 2017. – № 9. – P. 48 - 75; doi:10.3390/v9030048;
83. Wakuda M. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses / M. Wakuda, T. Ide, J. Sasaki, et al. // *Emerging Infectious Diseases*, 2011. – № 17. – P. 1491–1493;
84. Wakuda M. T. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses / M.T. Wakuda, J. Sasaki, S. Komoto, J. Ishii, T. Sanekata, K. Taniguchi // *Emerging Infectious Diseases*, 2011. – № 17. – P. 1491–1493;
85. Waters M. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets / M. Waters, A. Savoie, H.S. Garmory et al // *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. – № 41. – P. 3584–3591;



86. Zhou L. Molecular epidemiology of Porcine torovirus (PToV) in Sichuan Province, China: 2011-2013 / L. Zhou, H. Wei, Y. Zhou, Z. Xu, L. Zhu, J. Horne // Virology Journal, 2014. – №11. – P. 106;

## **6. ДОДАТКИ**

**Додаток 1. А**

Аналізуючи рентгенологічні знімки, можна відмитити наявність утворення кісткової тканини в обох імплантатах, що були розміщені білатерально біля крайової частини материнської кістки. Утворення кісткової тканини відбувалось як в імплантатах кроленят, що отримували гумілід додатково з водою, так і в імплантатах прооперованих кроленят, які гумілід не отримували. Перерозподіл макро і мікроелементів в кістковій тканині та дані морфометричного дослідження імплантатів говорять про превалювання росту кісткової тканини в імплантатах кроленят, що отримували гумілід. Одночасно у кроленят дослідної групи визначена також нормалізація показників АЛТ та креатиніну, що може вказувати на більш швидке відновлення м'язової тканини та гепатопротекторний вплив гуміліду у післяопераційний період.

УДК 619:616.981.842.17

### **ОСОБЛИВОСТІ ДІАГНОСТИКИ КИШКОВИХ ІНФЕКЦІЙ У ПОРОСЯТ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

*Супенко М.Г., здоб. вищої освіти, Масюк Д.М., д-р в. н., доцент, професор,  
Кокарев А.В., к. вет. н., доцент  
[prot25270@gmail.com](mailto:prot25270@gmail.com)*

*Дніпровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна*

**Вступ.** Кишкові інфекції є однією з найпоширеніших патологій свиней у всьому світі, що сприяє формуванню значних економічних збитків свинарській галузі (Schulz L.L. et al., 2015). Найбільш чутливими до патогенного впливу мікроорганізмів є поросята підсисного періоду та після відлучення, що пов'язано із становленням імунної системи у поросят у неонатальний період та катаболізмом колостральних антитіл, а також імуносупресивною дією стресових факторів на організм свиней (Masiuk D.M. et al., 2019).

З огляду на те, що кишечник колонізують як мікроорганізми-коменсали так і патогенні форми бактерій, останні зазвичай ускладнюють перебіг патологічного процесу та ускладнюють діагностику. Слід відзначити, що індукуючи запалення кишечнику мікроорганізми порушують процеси травлення та всмоктування, що обумовлює розвиток діарейного синдрому, на тлі чого тварини швидко худнуть і гинуть (Masiuk D. N. et al., 2018). Саме тому важливим завданням у лабораторній діагностиці кишкових інфекцій є не лише визначення етіологічного спектру ентероколіту у поросят, а й встановлення первинного та домінуючого у патологічному процесі патогенів.

На сьогодні одним з найбільш розповсюджених методів лабораторної діагностики є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), принцип якої базується на реплікації генетичного матеріалу мікроорганізму *in vitro*. Здатність цього методу враховувати результати дослідження у режимі реального часу дозволяє визначити кількість геном-еквівалентів збуднику, що вказує на домінування того чи іншого мікроорганізму у патологічному процесі (Глебенюк В.В. та ін., 2020).

З огляду на це особливої актуальності набувають дослідження з диференціальної діагностики шлунково-кишкових інфекцій у підсисних поросят методом ПЛР.

**Мета роботи.** Встановити особливості діагностики кишкових інфекцій у поросят методом полімеразної ланцюгової реакції.

**Матеріал і методи.** Дослідження проведені на базі в умовах ПЛР-лабораторії відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю агропромислового комплексу ДДАЕУ. Експериментальні дослідження проведені на базі сільськогосподарського підприємства з вирощування свиней загальною кількістю

*VI Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів "Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи", травень 2021*

поголов'я 62 тис. тварин. Свиноферма містить репродуктор на 6234 свиноматок змішаної генетики.

Для визначення етіології діареї у поросят підсисного періоду було сформовано 2 групи поросят – дослідну і контрольну віком 3-5 діб життя. Кожна група налічувала по 6 тварин. Поросята дослідних груп мали ознаки діареї, а тварини контрольних груп були клінічно здоровими. Від поросят для дослідження методом ПЛР відбирали ректальні мазки у свеби без транспортного середовища. Мазки були одразу замороженими при температурі  $-18^{\circ}\text{C}$  –  $-22^{\circ}\text{C}$  і у такому стані транспортувались до лабораторії.

Екстракцію нуклеїнових кислот проводили за допомогою набору «BioExtract SuperBall» (Франція) на приладі автоматичної екстракції «KingFisher Duo Prime».

У очищеному розчині нуклеїнових кислот визначали специфічні ділянки РНК ротавірусу типів А і С, збуднику епідемічної діареї свиней, та фрагменти ДНК *Cl. perfringens*, *E. coli*, *Cryptosporidium spp*, *Eimeria spp*, *Cystoisospora suis*, а також токсин продукуючі гени А і В *Cl. difficile*. Генотипування *Cl. perfringens* проводили за шістьма токсин кодуючими генами – Alpha, Beta, Beta-2, Epsilon, Iota та Enterotoxin. Типування *E. coli* проводили за шістьма токсин кодуючими генами – термостабільним токсином А (STa), термостабільним токсином В (STb), термолабільним токсином (LT), шиготоксинами – STX1 і STX2 та інтиміном (EAE), а також за адгезин кодуючими генами – F4 і F18. Дослідження вище перелічених показників проводили методом ПЛР з детекцією результатів у режимі реального часу за допомогою праймерів і флуоресцентних зондів фірми EXOPOL (Іспанія).

**Результати.** Отримані результати ПЛР дослідження клінічно здорових поросят вказують про колонізацію кишечника всіх тварин *E. coli* та у трьох з шести – *Cl. perfringens*, на що вказує наявність їх генетичного матеріалу у ректальних мазках.

Дослідження ректальних мазків від поросят з ознаками діареї вказують на присутність в усіх пробах генетичного матеріалу ротавірусу типу С, а також бактерій *Cl. perfringens* і *E. coli*, а у двох тварин з шести ще й гену токсину В *Cl. difficile*.

Отже, мікробіом клінічно здорових поросят представлений двома бактеріями *E. coli* та *Cl. perfringens*, а у поросят з ознаками діареї чотирма мікроорганізмами – ротавірусом типу С, *Cl. perfringens*, *E. coli* та *Cl. difficile*.

Слід відзначити, що *E. coli* та *Cl. perfringens* є нормальними представниками мікробіоти кишечника поросят (Fernandez-Miyakawa M. E., et al., 2018), тоді як ротавірус типу С та токсин В синтезуюча *Cl. difficile* є патогенними мікроорганізмами, які здатні самостійно індукувати ентерит у поросят (Wakuda M. T., et al., 2011; Chumbler N.M., et al., 2012).

Досліджуючи генетичний матеріал *Cl. perfringens* за шістьма токсин кодуючими генами встановлено, що всі ізольовані бактерії містять ген альфа токсину і лише 44 % ген бета 2 токсину, що за даними A. Ramirez (2018) класифікується як *Cl. perfringens* типу А.

Також встановлено, що у 17 % клінічно здорових поросят та у 100 % тварин з ознаками діареї генетичний матеріал *E. coli* містить гени кодуючі токсини STb та LT, що класифікує їх як ентеротоксигенні форми *E. coli* (Cornick N.A., et al., 2000).

За результатами кількісного аналізу генетичного матеріалу мікроорганізмів встановлено, що у кишечнику клінічно здорових свиней переважна більшість бактерій представлена *E. coli*, генетичного матеріалу якої у 100 разів більше ніж *Cl. perfringens*.

Порівнюючи результати отримані під час дослідження поросят з ознаками діареї слід відзначити, що домінуючим мікроорганізмом у їх мікробіомі є ротавірус типу С, кількість якого складала  $2 \times 10^9$  геном-еквівалентів, тоді як у клінічно здорових тварин він взагалі відсутній.

Слід відзначити, що кількість генетичного матеріалу *E. coli* та *Cl. perfringens* у поросят з ознаками діареї суттєво не відрізняються між собою, а їх значення коливаються у межах  $10^7$ . Проте кількість *Cl. perfringens* є достовірно більшою в 100 разів ( $p \leq 0,01$ ) у поросят з ознаками діареї порівняно до значень отриманих від клінічно здорових тварин. Найменша



кількість генетичного матеріалу виявлено за показником В токсин кодууючої *Cl. difficile*.

Отже, домінуючим мікроорганізмом у кишечнику клінічно здорових поросят віком 3-5 діб життя є *E. coli*, а у поросят з ознаками діареї – ротавірус типу С.

**Висновки.** Мікробіом кишечника клінічно здорових підсисних поросят у 3-5 добовому віці представлений двома популяціями бактерій *E. coli*, серед яких присутні сліди ентеротоксигенних форм, та *Cl. perfringens* типу А. У кишечнику свиней з ознаками діареї, на тлі вище зазначених бактерій, ідентифіковано В токсин синтезуючу *Cl. difficile* та ротавірус типу С, які є етіологічним чинником діареї у поросят.

УДК 636.4.09:616.98-071

### СЕРОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ВАКЦИНАЦІЇ СВИНЕЙ ПРОТИ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ

*Поїзд В.М., здоб. вищої освіти, Масюк Д.М., д-р вет. наук, доцент, професор,  
Кокарев А.В., к. вет. н., доцент  
poizdvasia96@gmail.com*

*Дніпровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна*

**Вступ.** Вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCC) є широко розповсюдженим у свинарських господарствах усього світу (Terrestrial manual OIE, 2018). Викликаючи патологію респіраторних органів та викликаючи порушення у функціонуванні репродуктивної системи цей вірус завдає значних економічних збитків свинарству всього світу (Linhares D. et al., 2014). Україна на сьогодні є неблагополучною за PPCC, оскільки ознаки циркуляції цього збудника виявлено у багатьох регіонах (Ситюк М. П. та ін., 2016).

Основною стратегією контролю та профілактики PPCC на підприємстві є імунізація тварин (Murtaugh M.P. and Genzow M., 2011). На ринку України сьогодні представлений широкий спектр вакцин проти PPCC I генотипу, які поділяються на живі атенуйовані та інактивовані. Кожна з цих вакцин потребує особливої уваги, оскільки їх біологічні властивості є різними, і невірною сформована схема імунопрофілактики може не лише бути малоефективною але й в деяких випадках зашкодити господарству (Renukaradhya G.J. et al., 2015). Одночасно з цим існує ряд інших факторів, які впливають на якість імунопрофілактичних заходів, серед яких є імуносупресивні стани тварин, що утворюються на тлі одночасної циркуляції у стаді свиней декількох патогенних мікроорганізмів, ураження тварин мікотоксинами, порушеннями технології годівлі та утримання, тощо (Zimmermann P., et al., 2019). Саме тому кожен впроваджену схему лікувально-профілактичних заходів необхідно систематично контролювати.

З огляду на це, лабораторна діагностика є невід'ємною частиною розробки схеми лікувально-профілактичних заходів, оскільки дає можливість ідентифікувати критичні технологічні періоди у вирощуванні свиней та визначити рівень серопревалентності (Kashyap S.P. et al., 2020). Зважаючи на це, особливої актуальності набуває контроль імунопрофілактики PPCC серологічними методами.

**Мета роботи.** Встановити особливості серологічного контролю вакцинації свиней проти репродуктивно-респіраторного синдрому.

**Матеріал і методи.** Експериментальні дослідження проведені на базі свинокомплексу циклу опорос-відгодівля із загальною кількістю 42 700 свиней, серед яких 3100 свиноматок. Лабораторні дослідження виконані в умовах лабораторії імунохімії НДЦ біобезпеки та екологічного контролю АПК ДДАЕУ.

Для проведення експерименту було сформовано дві аналогічні групи свиноматок 2-3 опоросу – дослідна і контрольна, по 50 голів у кожній. Свиноматок дослідної групи

## SIMPLIFIED PROTOCOL

	KingFisher™ Flex or 96	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Element to add
1 Plate or Strip Preparation	Deep-well lysate	Row A	Position A	<b>Lysate :</b> 20 µl of Proteinase K 100-200 µl of pretreated sample* 500 µl LALB-SMB-carrier-lysis Solution ± exogenous gPC
	Deep-well Wash 1	Row E	Position B	700 µl W1 Buffer
	Deep-well Wash 2	Row F	Position C	700 µl W2 Buffer
	Deep-well Wash 3	Row G	Position D	750 µl Ethanol (96-100%)
	Elution microplate	Elution strip	Position E	50-200 µl EL Buffer *
	Rod cover microplate	Row B (Rows C, D and H are empty)	Rod cover placed manually	Rod Cover
2 KingFisher™	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Switch on the KingFisher™ Flex, 96 Duo or mL.</li> <li>• Slide open the front door of the protective cover.</li> <li>• Select the corresponding BioExtract® SuperBall® program.</li> <li>• Press START and follow the messages to load the different slots of the worktable.</li> </ul>			

\*For sample volume and elution volume, please refer to the specific extraction handbook of each Bio-T kit\* or contact Biosellal Technical Service (tech@biosellal.com).

To get the KingFisher™ program corresponding to the KingFisher™ system you are using (Flex, 96, Duo or mL), please contact our technical support (tech@biosellal.com).

## HANDBOOK

# BioExtract® SuperBall®

Cat. N° BES384 and BES384WO

ALL SPECIES

**Extraction and Purification of Total Nucleic Acids by magnetic beads using devices equivalent to KingFisher™ Flex, 96, Duo, mL For pathogens detection from animal samples or environment:**

- viral RNA/DNA
- bacterial DNA
- parasite DNA
- genomic RNA/DNA

Veterinary use only





**EXOPOL** DIAGNOSTICS

**oneMIX™**

**EXOone C. perfringens  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  oneMIX Quick Protocol qPCR kit** Ref. No. XCP1\_PLEX

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Cattle, Small ruminants, Swine, Rabbit and Equine

Reference	Description	Presentation
XCP1 oneMIX tube	Each tube contains buffer, enzyme, dNTPs, primers/probes for pathogens and endogenous control detection	Two tubes (2x50 rxns)
CL1 POSITIVE CONTROL	lyophilized specific synthetic control	1 tube
Water	Molecular grade water	1 tube (1 ml)

**Required material but not provided in the kit**

- Nucleic acid test sample
- Micropipettes
- Sterile tips with filler
- Powder-free vinyl gloves
- Plate centrifuge (optional)
- Real-time PCR thermocycler + software

**Resuspension of Positive Control**

1. Spin briefly the Positive Control tube and reconstitute with 250  $\mu$ l of Water.
2. To facilitate resuspension, keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently the tube before use.
4. Store reconstituted Positive Control at -20°C.

**EXOPOL** DIAGNOSTICS

**oneMIX™**

**EXOone C. perfringens I,  $\beta$ 2, Entero oneMIX Quick Protocol qPCR kit** Ref. No. XCP2\_PLEX

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Cattle, Small ruminants, Swine, Rabbit and Equine

Reference	Description	Presentation
XCP2 oneMIX tube	Each tube contains buffer, enzyme, dNTPs, primers/probes for pathogens and endogenous control detection	Two tubes (2x50 rxns)
CL12 POSITIVE CONTROL	lyophilized specific synthetic control	1 tube
Water	Molecular grade water	1 tube (1 ml)

**Required material but not provided in the kit**

- Nucleic acid test sample
- Micropipettes
- Sterile tips with filler
- Powder-free vinyl gloves
- Plate centrifuge (optional)
- Real-time PCR thermocycler + software

**Resuspension of Positive Control**

1. Spin briefly the Positive Control tube and reconstitute with 250  $\mu$ l of Water.
2. To facilitate resuspension, keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently the tube before use.
4. Store reconstituted Positive Control at -20°C.

**Procedure**

1. Thaw the oneMIX tube you need regarding the number of required reactions. **No used oneMIX tube must be kept frozen.**
2. Vortex the oneMIX tube briefly.
3. Dispense 15  $\mu$ l of oneMIX into each well/tube used for the assay.
4. Add 5  $\mu$ l of nucleic acid sample or Positive Control or negative control (water) in the corresponding wells/tubes.
5. Seal the wells/tubes with their corresponding film or caps.
6. Centrifuge the plate/tubes gently before inserting it into the thermocycler to prevent drops in the well pit walls.

**Thermal Protocol**

Cycles	Time	Temperature
1 cycle	5 min.	95°C
42 cycles	15 sec.	95°C
	60 sec. <sup>e</sup>	60°C

<sup>e</sup> **Data Collection**  
Alpha toxin (FAM)  
Epsilon toxin (HEX/VIC)  
Beta toxin (Cy5)

- In Applied Biosystem thermocyclers **DO NOT SELECT ROX** as passive reference

**Procedure**


1. Thaw the oneMIX tube you need regarding the number of required reactions. **No used oneMIX tube must be kept frozen.**
2. Vortex the oneMIX tube briefly.
3. Dispense 15  $\mu$ l of oneMIX into each well/tube used for the assay.
4. Add 5  $\mu$ l of nucleic acid sample or Positive Control or negative control (water) in the corresponding wells/tubes.
5. Seal the wells/tubes with their corresponding film or caps.
6. Centrifuge the plate/tubes gently before inserting it into the thermocycler to prevent drops in the well pit walls.

**Thermal Protocol**

Cycles	Time	Temperature
1 cycle	5 min.	95°C
42 cycles	15 sec.	95°C
	60 sec. <sup>e</sup>	60°C

<sup>e</sup> **Data Collection**  
Beta-2 (FAM)  
Enterotoxin (HEX/VIC)  
Iota (Cy5)

- In Applied Biosystem thermocyclers **DO NOT SELECT ROX** as passive reference



**EXOPOL**  
DIAGNOSTICS

**EXOone Rotavirus A BASIC**  
Quick Protocol qPCR kit Ref. No. RTVA\_BAS

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Cattle, Small ruminants, Swine, Rabbit and Equine

Reference	Description	Presentation
RTVA Basic qPCR tube	Tube contains lyophilized primers and probe for specific pathogen detection.	1 tube (100 rxns)
PDG2 POSITIVE CONTROL Buffer A	lyophilized specific synthetic DNA <sup>a</sup> Reconstitution Buffer / Negative control	1 tube 1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.  
**NOTE: For a best performance of the assay store reagents at -20°C. after arrival.**


**Required material but not provided in the kit**

- Nucleic acid sample
- Micropipettes and sterile tips with filter
- Real-time PCR thermocycler + software
- Powder-free vinyl gloves
- Microcentrifuge (optional)
- qPCR / RT-qPCR Master Mix

**Reconstitution of lyophilized reagents**  
Reconstitute Basic qPCR tube and Positive control separately.

1. Spin briefly (15 sec) to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Reconstitute Basic qPCR tube (100 µl) and Positive Control (250 µl) with Buffer A. Keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently before use.
4. Generate aliquots of suitable volumes and store them at -20°C.

**Preparation of real-time PCR assay**  
The qPCR setup will depend of your reagents concentration, please use the following pipetting scheme as a model:



**EXOPOL**  
DIAGNOSTICS

**EXOone Rotavirus C BASIC**  
Quick Protocol qPCR kit Ref. No. RTVC\_BAS

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Swine

Reference	Description	Presentation
RTVC Basic qPCR tube	Tube contains lyophilized primers and probe for specific pathogen detection.	1 tube (100 rxns)
BDG2 POSITIVE CONTROL Buffer A	lyophilized specific synthetic DNA <sup>a</sup> Reconstitution Buffer / Negative control	1 tube 1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.  
**NOTE: For a best performance of the assay store reagents at -20°C. after arrival.**

**Required material but not provided in the kit**

- Nucleic acid sample
- Micropipettes and sterile tips with filter
- Real-time PCR thermocycler + software
- Powder-free vinyl gloves
- Microcentrifuge (optional)
- qPCR / RT-qPCR Master Mix

**Reconstitution of lyophilized reagents**  
Reconstitute Basic qPCR tube and Positive control separately.

1. Spin briefly (15 sec) to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Reconstitute Basic qPCR tube (100 µl) and Positive Control (250 µl) with Buffer A. Keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently before use.
4. Generate aliquots of suitable volumes and store them at -20°C.

**Preparation of real-time PCR assay**  
The qPCR setup will depend of your reagents concentration, please use the following pipetting scheme as a model:

Stage	Component	Per sample
Preparation of qPCR mix	50X RT enzyme qPCR mix one-step	0.8 µl
	2X qPCR Master mix Buffer <sup>c</sup>	10 µl
	RTVA Basic qPCR tube mix (20X) Nuclease-free water	1 µl up to 1.5 µl
	<b>Total Volume of PCR mix</b>	<b>15 µl</b>
Preparation of qPCR assay	qPCR Mix	15 µl
	Sample/Positive control/Negative control <sup>d</sup>	5 µl
	<b>Final Volume</b>	<b>20 µl</b>

<sup>c</sup> NOTE: use only a mastermix without passive reference dye (ROX, fluorescein, etc)  
<sup>d</sup> Always include at less one negative control and a positive control in the PCR run.

Stage	Component	Per sample
Preparation of qPCR mix	50X RT enzyme qPCR mix one-step	0.8 µl
	2X qPCR Master mix Buffer <sup>c</sup>	10 µl
	RTVC Basic qPCR tube mix (20X) Nuclease-free water	1 µl up to 1.5 µl
	<b>Total Volume of PCR mix</b>	<b>15 µl</b>
Preparation of qPCR assay	qPCR Mix	15 µl
	Sample/Positive control/Negative control <sup>d</sup>	5 µl
	<b>Final Volume</b>	<b>20 µl</b>

<sup>c</sup> NOTE: use only a mastermix without passive reference dye (ROX, fluorescein, etc)  
<sup>d</sup> Always include at less one negative control and a positive control in the PCR run.

**Додаток 5**

**EXOone Cryptosporidium spp. BASIC**  
 Quick Protocol qPCR kit Ref. No. CRYP\_BAS  
 For feces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Cattle, Small ruminants, Swine, Rabbit and Equine

Reference	Description	Presentation
CRYP Basic qPCR tube	Tube contains lyophilized primers and probe for specific pathogen detection.	1 tube (100 rxns)
DIG4 POSITIVE CONTROL Buffer A	Lyophilized specific synthetic DNA <sup>a</sup> Reconstitution Buffer / Negative control	1 tube 1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.  
**NOTE: For a best performance of the assay store reagents at -20°C. after arrival.**

- Required material but not provided in the kit**
- Nucleic acid sample
  - Microcentrifuge and sterile tips with filter
  - Real-time PCR thermocycler + software
  - Powder-free vinyl gloves
  - Microcentrifuge (optional)
  - qPCR / RT-qPCR Master Mix

**Reconstitution of lyophilized reagents**

- Reconstitute Basic qPCR tube and Positive control separately.
1. Spin briefly (15 sec) to ensure the material is in the bottom of the tube.
  2. Reconstitute Basic qPCR tube (100 µl) and Positive Control (250 µl) with Buffer A. Keep the tube for 10 min. at room temperature.
  3. Vortex gently before use.
  4. Generate aliquots of suitable volumes and store them at -20°C.

**Preparation of real-time PCR assay**

The qPCR setup will depend of your reagents concentration, please use the following pipetting scheme as a model:

Stage	Component	Per sample
Preparation of qPCR mix	2X qPCR Master mix Buffer <sup>c</sup>	10 µl
	CRYP Basic qPCR tube mix (20X) Nuclease-free water	1 µl up to 1.5 µl
	<b>Total Volume of PCR mix</b>	<b>1.5 µl</b>
Preparation of qPCR assay	qPCR Mix	1.5 µl
	Sample/Positive control/Negative control <sup>d</sup>	5 µl
	<b>Final Volume</b>	<b>20 µl</b>

<sup>c</sup> NOTE: use only a mastermix without passive reference dye (ROX, fluorescein, etc)  
<sup>d</sup> Always include at least one negative control and a positive control in the PCR run.

**EXOone Eimeria spp. oneMIX**  
 Quick Protocol qPCR kit Ref. No. EIME\_100  
 For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Pets, Small ruminants, Swine, Rabbit, Poultry and Cattle

Reference	Description	Presentation
EIME oneMIX tube	Each tube contains buffer, enzyme, dNTPs, primers/probes for pathogen and endogenous control detection	Two tubes (2x50 rxns)
EIMI POSITIVE CONTROL Water	Lyophilized specific synthetic control <sup>a</sup> Molecular grade water	1 tube 1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.

- Required material but not provided in the kit**
- Nucleic acid test sample
  - Micropipettes
  - Sterile tips with filter
  - Powder-free vinyl gloves
  - Plate centrifuge (optional)
  - Real-time PCR thermocycler + software

**Resuspension of Positive Control**

1. Spin briefly the Positive Control tube and reconstitute with 250 µl of Water.
2. To facilitate resuspension keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently the tube before use.
4. Store reconstituted Positive Control at -20°C.

**Procedure**

1. Thaw the oneMIX tube you need regarding the number of required reactions.  
**No used oneMIX tube must be kept frozen.**
2. Vortex the oneMIX tube briefly.
3. Dispense 1.5 µl of oneMIX into each well/tube used for the assay.
4. Add 5 µl of nucleic acid sample or Positive Control or negative control (water) in the corresponding wells/tubes.
5. Seal the wells/tubes with their corresponding film or caps. thermocycler to prevent drops in the well pit walls.
7. Centrifuge the plate/tubes gently before inserting it into the thermocycler.

**Thermal Protocol**

Cycles	Time	Temperature
1 cycle	5 min.	95°C
42 cycles	15 sec.	95°C
	60 sec.	60°C

**Data Collection**  
 Eimeria spp. (FAM)  
 Endogenous control (HEX)  
 - If your thermocycler has not HEX channel, use VIC channel.  
 - In Applied Biosystem thermocyclers do not use ROX as passive reference

**EXOPOL**  
DIAGNOSTICS

EXOone E. coli F4, F18, EC oneMIX  
Quick Protocol qPCR kit Ref. No. XFM2\_PIEχ

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Swine

Reference	Description	Presentation
XFM2 oneMIX tube	Each tube contains buffer, enzyme, dNTPs, primers/probes for pathogens and/or endogenous control detection	1 or 2 tubes <sup>a</sup> (50 rxns each)
FVM2 POSITIVE CONTROL	Lyophilized specific synthetic control <sup>b</sup>	1 tube
Water	Molecular grade water	1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> 1 tube for 50 reactions format and 2 for 100 reactions format  
<sup>b</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.

Required material but not provided in the kit

- Nucleic acid test sample
- Micropipettes
- Sterile tips with filter
- Powder-free vinyl gloves
- Plate centrifuge (optional)
- Real-time PCR thermocycler + software

Resuspension of Positive Control

1. Spin briefly the Positive Control tube and reconstitute with 250 µl of Water.
2. To facilitate resuspension keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently the tube before use.
4. Store reconstituted Positive Control at -20°C.

Procedure

1. Thaw the oneMIX tube you need regarding the number of required reactions. No used oneMIX tube must be kept frozen.
2. Vortex the oneMIX tube briefly.
3. Dispense 15 µl of oneMIX into each well/tube used for the assay.
4. Add 5 µl of nucleic acid sample or Positive Control or negative control (water) in the corresponding wells/tubes.
5. Seal the wells/tubes with their corresponding film or caps.
6. Centrifuge the plate/tubes gently before inserting it into the thermocycler to prevent drops in the well-pit walls.

Thermal Protocol

Cycles	Time	Temperature
1 cycle	5 min.	95°C
42 cycles	15 sec.	95°C
	60 sec. <sup>c</sup>	60°C

<sup>c</sup> Data Collection  
F4 (FAM)  
EC (HEX/VIC)  
F18 (Cy5)

- In Applied Biosystem thermocyclers  
DO NOT SELECT ROX as  
passive reference

**EXOPOL**  
DIAGNOSTICS

EXOone E. coli STa, STb, LT oneMIX  
Quick Protocol qPCR kit Ref. No. XTOX\_PIEχ

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Swine and Cattle

Reference	Description	Presentation
XTOX oneMIX tube	Each tube contains buffer, enzyme, dNTPs, primers/probes for pathogens and/or endogenous control detection	1 or 2 tubes <sup>a</sup> (50 rxns each)
CTOX POSITIVE CONTROL	Lyophilized specific synthetic control <sup>b</sup>	1 tube
Water	Molecular grade water	1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> 1 tube for 50 reactions format and 2 for 100 reactions format  
<sup>b</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.

Required material but not provided in the kit

- Nucleic acid test sample
- Micropipettes
- Sterile tips with filter
- Powder-free vinyl gloves
- Plate centrifuge (optional)
- Real-time PCR thermocycler + software

Resuspension of Positive Control

1. Spin briefly the Positive Control tube and reconstitute with 250 µl of Water.
2. To facilitate resuspension, keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently the tube before use.
4. Store reconstituted Positive Control at -20°C.

Procedure

1. Thaw the oneMIX tube you need regarding the number of required reactions. No used oneMIX tube must be kept frozen.
2. Vortex the oneMIX tube briefly.
3. Dispense 15 µl of oneMIX into each well/tube used for the assay.
4. Add 5 µl of nucleic acid sample or Positive Control or negative control (water) in the corresponding wells/tubes.
5. Seal the wells/tubes with their corresponding film or caps.
6. Centrifuge the plate/tubes gently before inserting it into the thermocycler to prevent drops in the well-pit walls.

Thermal Protocol

Cycles	Time	Temperature
1 cycle	5 min.	95°C
42 cycles	15 sec.	95°C
	60 sec. <sup>c</sup>	60°C

<sup>c</sup> Data Collection  
STb (FAM)  
LT (HEX/VIC)  
STa (Cy5)

- In Applied Biosystem thermocyclers  
DO NOT SELECT ROX as  
passive reference



### EXOone C. difficile Toxin A BASIC

Quick Protocol qPCR kit Ref. No. TCDA\_BAS  
For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Cattle, Small ruminants, Swine, Rabbit and Equine

Reference	Description	Presentation
TCDA Basic qPCR tube	Tube contains lyophilized primers and probe for specific pathogen detection.	1 tube (100 rxns)
CL52 POSITIVE CONTROL Buffer A	Lyophilized specific synthetic DNA <sup>a</sup> Reconstitution Buffer / Negative control	1 tube 1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.

**NOTE: For a best performance of the assay store reagents at -20°C. after arrival.**

#### Required material but not provided in the kit

- Nucleic acid sample
- Powder-free vinyl gloves
- Micropipettes and sterile tips with filter
- Microcentrifuge (optional)
- Real-time PCR thermocycler + software
- qPCR / RT-qPCR Master Mix

#### Reconstitution of lyophilized reagents

Reconstitute Basic qPCR tube and Positive control separately.

1. Spin briefly (1.5 sec) to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Reconstitute Basic qPCR tube (100 µl) and Positive Control (250 µl) with Buffer A. Keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently before use.
4. Generate aliquots of suitable volumes and store them at -20°C.

#### Preparation of real-time PCR assay

The qPCR setup will depend of your reagents concentration, please use the following pipetting scheme as a model:

Stage	Component	Per sample
Preparation of qPCR mix	2X qPCR Master mix Buffer <sup>c</sup>	10 µl
	TCDA Basic qPCR tube mix (20X) Nuclease-free water	1 µl up to 15 µl
	<b>Total Volume of PCR mix</b>	<b>15 µl</b>
Preparation of qPCR assay	qPCR Mix	15 µl
	Sample/Positive control/Negative control <sup>d</sup> <b>Final Volume</b>	5 µl <b>20 µl</b>

<sup>c</sup> NOTE: use only a mastermix without passive reference dye (ROX, fluorescein, etc)

<sup>d</sup> Always include at less one negative control and a positive control in the PCR run.



### EXOone E. coli eae gene BASIC

Quick Protocol qPCR kit Ref. No. EEAE\_BAS  
For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Rabbit, Cattle, Small ruminants and Swine

Reference	Description	Presentation
EEAE Basic qPCR tube	Tube contains lyophilized primers and probe for specific pathogen detection.	1 tube (100 rxns)
CRUM POSITIVE CONTROL Buffer A	Lyophilized specific synthetic DNA <sup>a</sup> Reconstitution Buffer / Negative control	1 tube 1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.

**NOTE: For a best performance of the assay store reagents at -20°C. after arrival.**

#### Required material but not provided in the kit

- Nucleic acid sample
- Powder-free vinyl gloves
- Micropipettes and sterile tips with filter
- Microcentrifuge (optional)
- Real-time PCR thermocycler + software
- qPCR / RT-qPCR Master Mix

#### Reconstitution of lyophilized reagents

Reconstitute Basic qPCR tube and Positive control separately.

1. Spin briefly (1.5 sec) to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Reconstitute Basic qPCR tube (100 µl) and Positive Control (250 µl) with Buffer A. Keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently before use.
4. Generate aliquots of suitable volumes and store them at -20°C.

#### Preparation of real-time PCR assay

The qPCR setup will depend of your reagents concentration, please use the following pipetting scheme as a model:

Stage	Component	Per sample
Preparation of qPCR mix	2X qPCR Master mix Buffer <sup>c</sup>	10 µl
	EEAE Basic qPCR tube mix (20X) Nuclease-free water	1 µl up to 15 µl
	<b>Total Volume of PCR mix</b>	<b>15 µl</b>
Preparation of qPCR assay	qPCR Mix	15 µl
	Sample/Positive control/Negative control <sup>d</sup> <b>Final Volume</b>	5 µl <b>20 µl</b>

<sup>c</sup> NOTE: use only a mastermix without passive reference dye (ROX, fluorescein, etc)

<sup>d</sup> Always include at less one negative control and a positive control in the PCR run.



## EXOone PEDV BASIC

Quick Protocol qPCR kit Ref. No. PEDV\_BAS

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Swine

Reference	Description	Presentation
PEDV Basic qPCR tube	Tube contains lyophilized primers and probe for specific pathogen detection.	1 tube (100 rxns)
PDG2 POSITIVE CONTROL	Lyophilized specific synthetic DNA <sup>a</sup>	1 tube
Buffer A	Reconstitution Buffer / Negative control	1 tube (1 ml)

<sup>a</sup> See the Quality Control Certificate for copy number.

NOTE: For a best performance of the assay store reagents at -20°C. after arrival.

### Required material but not provided in the kit

- Nucleic acid sample
- Micropipettes and sterile tips with filter
- Real-time PCR thermocycler + software
- Powder-free vinyl gloves
- Microcentrifuge (optional)
- qPCR / RT-qPCR Master Mix

### Reconstitution of lyophilized reagents

Reconstitute Basic qPCR tube and Positive control separately.

1. Spin briefly (15 sec) to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Reconstitute Basic qPCR tube (100 µl) and Positive Control (250 µl) with Buffer A. Keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently before use.
4. Generate aliquots of suitable volumes and store them at -20°C.

### Preparation of real-time PCR assay

The qPCR setup will depend of your reagents concentration, please use the following pipetting scheme as a model:

Stage	Component	Per sample
Preparation of qPCR mix	50X RT enzyme qPCR mix one-step	0.8 µl
	2X qPCR Master mix Buffer <sup>a</sup>	10 µl
	PEDV Basic qPCR tube mix (20X)	1 µl
	Nuclease-free water	up to 15 µl
	<b>Total Volume of PCR mix</b>	<b>15 µl</b>
Preparation of qPCR assay	qPCR Mix	15 µl
	Sample/Positive control/Negative control <sup>d</sup>	5 µl
	<b>Final Volume</b>	<b>20 µl</b>

<sup>a</sup> NOTE: use only a mastermix without passive reference dye (ROX, fluorescein, etc)

<sup>d</sup> Always include at least one negative control and a positive control in the PCR run.

AntiPlagiarism.NET

Файл Правка Вид Операции Дополнительно Справка Etxt.ru - биржа контента

Стандартная Экспресс Глубокая На реерйт Пакетная проверка Проверка сайта SEO проверка Проверка картинок

Проверить уникальность  Игнорировать домены:

Редактор Адрес:  Страница

Текст(111950):

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
 Спеціальність 211 "Ветеринарна медицина".  
 ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ  
 Зав. кафедри  
 фізіології та біохімії с-г тварин  
 біо.н., проф. \_\_\_\_\_ П.М. Степченко"  
 2021 р. ДИПЛОМНА РОБОТА  
 ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА ДІАГНОСТИКА ШЛУНКОВО-КИШКОВИХ ІНФЕКЦІЙ У ПІДСИСНИХ ПОРОСЯТ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В УМОВАХ НАУКОВО-ДОСЛІДНОГО ЦЕНТРУ  
 БІОБЕЗПЕКИ ТА ЕКОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ РЕСУРСІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ ДНІПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ  
 26.06 - ДР. 1072 21 05 24. 05  
 0. ПЗСтудент-дипломник \_\_\_\_\_  
 М.Г. Суленко Керівник дипломної роботи

Журнал:  Автопрокрутка

[14:13:20] **Go** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1063512/>

[14:13:27] **Go** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12904359/>

[14:13:28] **Go** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179868/>

[14:13:48] **Go** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-11-106>

[14:13:49] Тип проверки: Стандартная (Поисковики = Go,Bi,Yah)

[14:13:49] Настройки: Игнорировать цитаты = Да

[14:13:49] **ВНИМАНИЕ! Уникальность может быть определена некорректно! (Обнаружено ошибок: 25%)**

[14:13:49] **Уникальность текста 90%** (Проигнорировано подстановок: 0%) (Проигнорировано цитат: 14%)

Готово