

2. Lappin, M. R., Blondeau, J., Boothe, D., Breitschwerdt, E. B., Guardabassi, L., Lloyd, D. H., ... & Weese, J. S. (2017). Antimicrobial use guidelines for treatment of respiratory tract disease in dogs and cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31 (2), 279-294.
3. Levy, N., Ballegeer, E., & Koenigshof, A. (2019). Clinical and radiographic findings in cats with aspiration pneumonia: retrospective evaluation of 28 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 60 (6), 356-360.
4. Schultz, R. M., & Zwingerberger, A. (2008). Radiographic, computed tomographic, and ultrasonographic findings with migrating intrathoracic grass awns in dogs and cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 49(3), 249-255.
5. Ybarra, W. L., Johnson, L. R., Drazenovich, T. L., Johnson, E. G., & Vernau, W. (2012). Interpretation of multisegment bronchoalveolar lavage in cats (1/2001–1/2011). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26 (6), 1281-1287.

УДК 636.09:612.017:636.5

ВИКОРИСТАННЯ РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ У ВИВЧЕННІ ГУМОРАЛЬНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ПЕРЕПЕЛІВ

Момот А.М., аспірант

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-7481-617X>

Гарагуля Г.І., канд.вет.наук, доцент, Державний біотехнологічний університет, м.Харків, Україна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4990-2489>

Стасюк О.В., лікар ветеринарної медицини

Птахівництво є важливішою галузю сільського господарства. Бактеріальні захворювання серед молодняку птиці викликані штамми різних бактерій, але найбільш поширені серед них колибактеріоз та стафілококоз, які здатні викликати септицемію, множинне ураження органів, тканин та загибель птиці. Розроблені специфічні вакцини, у тому числі моновакцини, які включають місцеві штами *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Основними показниками гуморальної імунної відповіді є поява та кількість специфічних імуноглобулінів.

Японський перепел є доступним видом лабораторних тварин. З ветеринарною мікробіологією, імунологією та вірусологією найбільше пов'язані дослідження щодо використання перепелів з метою вивчення патології та імунітету самих перепелів та використання їх як моделі для вивчення хвороб інших видів, в тому числі людини.

Перепелів використовували як модель для експериментального інфікування різними збудниками з метою вивчення чутливості до збудників захворювань самих перепелів та невластивих їм збудників, з метою дослідити особливості патогенезу захворювань, ефективність лікування чи профілактики окремих інфекцій. Повідомляли про такі експериментальні бактеріальні інфекції як ешерихіоз, сальмонельоз, хламідіоз, протееоз, кампілобактеріоз, мікоплазмоз. Є повідомлення про вірусні експериментальні інфекції: грип, віспа, аденовіроз, ньюкаслська хвороба, хвороба Марека, ретикулоендотеліоз.

Запропоновані та використовуються цілий ряд методик вивчення змін імунного статусу після імунізації. Серед найбільш вживаних – виявлення та визначення кількості специфічних антитіл в сироватці або плазмі крові. Найчастіше використовують експрес-методи, наприклад, реакцію аглютинації.

Метою нашої роботи є стимуляція імунної відповіді у перепелів шляхом їх гіперімунізації бактеріальними антигенами двох видів *E.coli* та *S.aureus* та вивчення змін

імунного статусу птиці в ході імунологічної перебудови організму. Завданням роботи є імунізація перепелів інактивованими бактеріями та реєстрація імунної відповіді з використанням реакції пластинчастої аглютинації.

Реакція аглютинації (РА) одна з перших імунологічних реакцій, яку застосовували в мікробіологічній практиці і наразі продовжують використовувати доволі часто. РА високочутлива; з її допомогою можна виявити 0,01мкг азоту білка антитіл в 1мл. Розроблено кілька варіантів реакції аглютинації, що розрізняються за методикою виконання і метою дослідження, в тому числі пластинчаста і пробірочна.

Вибір мікроорганізмів для імунізації продиктований кількома причинами: велика значимість обох збудників у патології тварин, значне поширення і наявність їх у складі нормальної мікрофлори тіла тварин, приналежність до двох різних за властивостями груп мікроорганізмів за характером основного методу фарбування у мікробіології – фарбування за Грамом.

Пластинчасту РА найчастіше використовують для ідентифікації мікроорганізмів. Ми в своєму дослідженні використали пластинчасту РА з метою виявлення протибактеріальних антитіл в сироватці імунізованої птиці. Використали загальноприйнятую методику. На предметне скло наносили 0,3мл досліджуваної сироватки крові перепелів і 0,03мл інактивованого антигену. Компоненти ретельно перемішували погойдуванням скла і через 5-10 хвилин враховували результат. При позитивній реакції з'являлися пластівці аглютинату.

Матеріалом дослідження була імунна відповідь перепелів *Coturnix coturnix japonica* на два види бактеріальних антигенів, отриманих із музейних штамів мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківської державної зооветеринарної академії. В якості антигенів використали інактивовані клітини кишкової палички (*Escherichia coli*) та золотистого стафілококу (*Staphylococcus aureus*).

Моделлю для вивчення імунної відповіді були 18 голів перепелів *Coturnix coturnix japonica* віком 1,5 місяців. Птиця була розділена на 3 групи по 4 особини у кожній клітці: група №1 – імунізовані зависсю інактивованої *E. coli*, група №2 – імунізовані зависсю інактивованої суспензією *S.aureus*, група №3 – контрольна група (отримували замість зависі бактерій стерильний фізіологічний розчин).

Антигени отримували за такою методикою. Мікроорганізми культивували за загальноприйнятною методикою з використанням м'ясопептонного бульйону (МПБ) та м'ясопептонного агару (МПА). Після посіву бактерій на МПБ або МПА пробірки та чашки Петрі (відповідно) інкубували 18-24 години при температурі +37⁰С, отримані добові культури бактерій використовували для виготовлення антигенів та для проведення запланованих імунологічних досліджень. Культури мікроорганізмів, необхідні для подальшої роботи, зберігали в холодильнику при температурі +4+8⁰С.

Завись бактерій отримували так: бактеріальну масу змивали стерильним фізіологічним розчином з поверхні щільного середовища та осаджували бактеріальні клітини шляхом центрифугування (режим роботи центрифуги – 1500 об/хв. впродовж 30 хвилин). Надосадову рідину видаляли, а осад бактеріальних клітин ресуспендували в стерильному фізіологічному розчині (в об'ємі 1см³). Інактивацію отриманої зависі проводили на водяній бані (100⁰С) протягом 30 хвилин. Отриману завись (без обробки фарбою та після фарбування метиленовим синім) використовували для постановки пластинчастої реакції аглютинації та для вивчення бактерицидної активності плазми крові перепелів. Для імунізації перепелів завись бактерій розбавляли 1:5.

Виготовлений антиген у вигляді зависі інактивованих бактерій вводили по 0,1см³ внутрішньом'язово відповідній окремій групі перепелів, контрольній групі вводили стерильний фізіологічний розчин в такому ж об'ємі. В ході досліду відібрали по 36 проб сироваток крові перепелів (18 проб перед імунізацією і 18 проб через 14 діб після імунізації).

Для постановки РА ми використали сироватки перепелів контрольної групи (контрольні сироватки) та ті, що отримали в ході імунізації перепелів двома антигенами (імунні сироватки: імунну до кишкової палички та до золотистого стафілококу).

Метою нашої роботи було не лише виявлення антитіл в сироватці крові (якісна РА), а й встановлення їх кількості (кількісна РА). Через невелику кількість сироватки, яку можна взяти у такої птиці як перепели, ми спробували використати пластинчасту РА як кількісну реакцію. Для цього ми модифікували методику постановки реакції. По-перше, використали живі та інактивовані бактеріальні клітини, по-друге за використання інактивованого антигену в одному дослідженні ставили реакцію з нефарбованими бактеріями, а в іншому – з фарбованими метиленовим синім. Для фарбування в 1 см³ зависі інактивованих бактерій внесли 5 крапель робочого розчину метиленового синього та витримали кілька хвилин.

Перший варіант РА з використанням спеціальної пластинки з темними лунками (чорна фарба полегшує візуалізацію реакції у разі використання нефарбованих бактерій). На пластинки, які мають по 6 чорних лунок, наносили 0,3 см³ двократних розведень сироватки (від 0 до 1:1024). В кожену краплю сироватки бактеріальною петлею вносили бактеріальну масу відповідного мікроорганізму (кишкової палички або золотистого стафілококу), компоненти ретельно перемішували погойдуванням пластинок, через 10 хвилин враховували результат. Облік результатів: при позитивній реакції з'являються пластівці аглютинату, при негативній – крапля суміші залишається рівномірно каламутною; в контролі з фізіологічним розчином (самоаглютинація) реакція повинна бути негативною. За титр сироватки приймали найвище її розведення, яке викликало позитивну реакцію.

З метою підтвердження отриманих результатів ми провели аналогічне дослідження із інактивованим пофарбованим антигеном, для чого використали чашки Петрі.

Сироватка крові перепелів контрольної групи давала позитивну реакцію в розведеннях від 0 до 1:8, що відповідає кількості антитіл у неімунної птиці (за рахунок зв'язування антигену з імуноглобулінами класу М). Імунні сироватки давали позитивну реакцію практично в усіх розведеннях: максимальні титри антитіл до *E. coli* виявилися 1:256 (8 log₂), а до *S. aureus* – 1:512 (9 log₂) це свідчить про інтенсивну імунну відповідь на відповідні антигени, бо в порівнянні з контролем кількість антитіл на кишкову паличку збільшилась у 32 рази, а на стафілокок – у 64 рази.

Характер аглютинату відрізнявся в залежності від виду антигену. Сироватка крові перепелів, групи імунізованих *E. coli*, утворювала візуально помітне скупчення із пластівців бактеріальних клітин, в той час як аглютинат із бактерій *S. aureus* візуально був дрібнішим і краще помітним при мікроскопії за малого збільшення.

Використання фарбованого антигену дало аналогічні результати, що дає впевненість у можливості використання пластинчастої реакції аглютинації для встановлення кількості антитіл в імунних сироватках крові птиці.

В своїй роботі ми використали пластинчасту реакцію аглютинації не тільки для виявлення антитіл в сироватках крові, а й встановлення їх кількості (титрування), тобто провели моніторинг гуморальної імунної відповіді перепелів. На відміну від літературних даних, за якими пластинчаста РА є лише якісною, нам вдалося використати її як кількісну. За нашими даними кількість антитіл з максимального титру 1:8 на початку дослідження збільшилась до рівня 1:256 – 1:512, тобто кількість антитіл виросла у 32-64 рази, що свідчить про активну і напружену імунну відповідь і співпадає з даними літератури.

Висновки. Імунізація перепелів бактеріальними антигенами (інактивованими бактеріями двох видів *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*) індукувала імунну відповідь. За результатами пластинчастої реакції аглютинації в контрольній групі титр антитіл не перевищував 1:8 (3 log₂), а в дослідних 1:256 (8 log₂) та 1:512 (9 log₂) у перепелів, імунізованих кишковою паличкою та стафілококом відповідно. Кількісні показники гуморальної відповіді реєстрували в реакції аглютинації, результати якої підтвердили підвищення титру аглютинуючих антитіл у 32-64 рази в порівнянні з неімунною птицею.