

ВЕТЕРИНАРІЯ, ТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИНИЦТВА ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

VETERINARY SCIENCE, TECHNOLOGIES OF ANIMAL HUSBANDRY AND NATURE MANAGEMENT

ISSN 2617-8346 (Print)
ISSN 2663-5542 (Online)

doi: 10.31890/vtpp.2019.04.05
<http://ojs.hdzva.edu.ua/>

UDC 636.09:636.6:612.112.017

Properties of blood serum of immunized quail

G. I. Garagulia, S. G. Matkovska, O. V. Stasiuk
Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 12.10.2019
Received in revised form
07.11.2019
Accepted
15.11.2019

Kharkiv State Zooveterinary
Academy,
Academychna Str. 1, Mala
Danylivka, Dergachi district,
Kharkiv region, Ukraine,
62341
E-mail: info@hdzva.edu.ua

Garagulia, G. I., Matkovska, S. G., & Stasiuk, O. V. (2019). Properties of blood serum of immunized quail. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 4, 28-32, doi: 10.31890/vtpp.2019.04.05.

Our work is devoted to the study of the immune response of the quail to two strains of antigens. We used gram-negative Escherichia coli and gram-positive Staphylococcus aureus. The choice of these types of pathogens is dictated by several reasons. Pathogenic strains of these microorganisms often cause poultry diseases, they are widespread in the environment, are representatives of the normal microflora of animals, belong to two different microorganism groups according to the Gram staining.

The state of the immune system (immune status) changes under the influence of many factors, including during immunization. There are various methods for the study of humoral factors of immunity. When studying non-specific immunity factors, they use the method of determining the bactericidal activity of blood plasma. The main specific humoral factor is antibodies of various classes. There are methods to detect and determine the amount of antibodies in plasma or serum. These are agglutination, precipitation, neutralization and other serological reactions. The detection of antibodies is the most informative method of assessing immunity. Therefore, serological reactions are widely used to assess the quality of the immune response to vaccines.

The objective of the study was to carry out hyperimmunization of quail with two types of bacteria (E. coli and S. aureus) and to study the nature of changes in humoral immunity factors. A suspension of inactivated bacteria was administered intramuscularly four times with an interval of 7 days. To study the immune response, we used the agglutination reaction on glass, which allowed us to identify antibodies and determine their titer. The second indicator is the change in the bactericidal properties of blood plasma as a result of immunization of quail. Most often, the agglutination reaction on glass is used only to detect antibodies. According to the results of our studies, this reaction also allows you to determine the amount of immunoglobulins. The number of antibodies in non-immune birds did not exceed 3log₂. After hyperimmunization, the number of antibodies increased. In reaction with Escherichia coli, antibody titers reached to 8 log₂, and with staphylococcus - 9 log₂. Studies of the bactericidal activity of quail blood plasma gave similar results. We incubated the studied blood plasma and culture of microorganisms at a temperature of + 37° C, and then the mixture was ulated on solid nutrient media. The result was taken into account by the presence of bacterial growth on the agar surface. The blood plasma of a non-immune bird did not cause the destruction of bacteria. Blood plasma obtained from an immunized bird completely lysed Staphylococcus aureus and E. coli almost completely. Our results indicate a intensive immune response of the quail organism to bacterial antigens.

Keywords: humoral immunity, quail, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, hyperimmunization.

Свойства сыворотки крови иммунизированных перепелов

Г. И. Гарагуля, С. Г. Матковская, А. В. Стасюк
Харьковская государственная зооветеринарная академия, Украина

Наша работа посвящена изучению иммунного ответа организма перепелов на две разновидности антигенов. Мы использовали грамотрицательную кишечную палочку (E. coli) и грамположительный золотистый стафилококк (S.aureus). Выбор этих видов возбудителей продиктован несколькими причинами. Патогенные штаммы этих возбудителей часто вызывают заболевания птицы, они широко распространены в окружающей

среде, являются представителями нормальной микрофлоры тела животных, принадлежат к двум разным по группам микроорганизмов по характеру окрашивания по Граму.

Состояние иммунной системы (иммунный статус) меняется под влиянием многих факторов, в том числе при иммунизации. Существуют различные методы исследования гуморальных факторов иммунитета. При изучении неспецифических факторов иммунитета пользуются методом определения бактерицидной активности плазмы крови. Основной специфический гуморальный фактор – это антитела различных классов. Разработаны методы выявления и определения количества антител в плазме или сыворотке крови. Это реакции агглютинации, преципитации, нейтрализации и другие серологические реакции. Выявление антител – наиболее информативный метод оценки иммунитета. Поэтому серологические реакции широко используют для оценки качества иммунного ответа на вакцины.

Задачей исследования было провести гипериммунизацию перепелов двумя видами бактерий (*E. coli* и *S. aureus*) и изучить характер измененных гуморальных факторов иммунитета. Взвесь инактивированных бактерий вводили внутримышечно четыре раза с интервалом 7 суток. Для изучения иммунного ответа мы использовали реакцию агглютинации на стекле, которая позволила выявить антитела и определить их титр. Чаще всего реакцию агглютинации на стекле используют только для выявления антител. По результатам наших исследований эта реакция также позволяет установить количество иммуноглобулинов. Количество антител у неиммунной птицы не превышало $3 \log_2$. После гипериммунизации количество антител увеличилось. В реакции с кишечной палочкой титры антител достигали $8 \log_2$, а со стафилококком - $9 \log_2$. Вторым показателем – изменение бактерицидных свойств плазмы крови в результате иммунизации перепелов. Исследования бактерицидной активности плазмы крови перепелов дали аналогичные результаты. Исследуемую плазму крови и культуру микроорганизмов мы инкубировали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, а затем смесь высевали на плотные питательные среды. Результат учитывали по наличию роста бактерий на поверхности агара. Плазма крови неиммунной птицы не вызывала разрушения бактерий. Плазма крови, полученная от иммунизированной птицы, полностью лизировала стафилококк и практически полностью - кишечную палочку. Полученные нами результаты свидетельствуют о напряженном иммунном ответе организма перепелов на бактериальные антигены.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет, перепела, кишечная палочка, стафилококк, гипериммунизация.

Властивості сироватки крові імунізованих перепелів

Г. І. Гарагуля, С. Г. Матковська, О. В. Стасюк
Харківська державна зооветеринарна академія, Україна

Робота присвячена вивченню гуморальних факторів імунітету перепелів у відповідь на гіперімунізацію двома видами бактерій – *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Птицю імунізували чотирикратно з інтервалами 7 діб і досліджували неспецифічні фактори (бактерицидну активність плазми крові) та специфічні (синтез антитіл). Плазма неімунної птиці не викликала руйнування бактерій, в той час як плазма імунізованих перепелів викликала повний лізис стафілококів і частковий кишкової палички. Кількість антитіл в пластинчастій реакції аглютинації в ході імунної відповіді збільшилася у 32-64 рази. Отримані результати свідчать про формування інтенсивної імунної відповіді на використані бактеріальні антигени у перепелів.

Ключові слова: гуморальний імунітет, перепели, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, гіперімунізація.

Вступ

Актуальність теми. Повноцінна імунна відповідь включає взаємодію усіх факторів імунітету: клітинних та гуморальних, неспецифічних та специфічних. Розуміння роботи кожного фактора є важливим для формування правильного бачення законномірностей імунної відповіді та допомагає контролювати та корегувати роботу імунної системи з метою профілактики чи лікування тварин.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Перепелів широко використовують як для отримання продуктів харчування, так і в лабораторних дослідженнях, а тому виникла необхідність вивчення роботи імунної системи перепелів. Активність неспецифічних гуморальних факторів імунітету вивчена досить докладно у курей та качок, і значно менше у інших видів птиці. Тому вивчення роботи різних систем і органів перепелів є важливим і необхідним, в тому числі розуміння роботи імунної системи в цілому (Davidson (Eds), 2008) та в різні періоди онтогенезу (Fair, Hansen, & Ricklefs, 1999; Kankova, Drozdova, Klobetzova, Lichovnikova, & Zeman, 2019; Stojanovskyj, Garmata, L. & Kolomijets, 2016). Є роботи, присвячені вивченню дії різних факторів на імунну систему перепелів, а саме: умов інкубації (Burrows, Ben-Ezra, & Burness, 2019), стресів (Fair, & Ricklefs, 2002), світла (Saini et al., 2019),

пробіотиків (Amni, 2017; Scholtz, 2010), щільності посадки перепелів за утримання в клітках (Soares et al., 2018).

Особливу увагу приділяють вивченню імуноглобулінів, які є основним гуморальним фактором специфічної імунної відповіді. Докладно вивчена молекулярна маса антитіл птиці, в тому числі перепелиних імуноглобулінів (Hersh, Kubo, Leslie, & Benedict, 1969), механізми накопичення антитіл в жовтку яєць (Esmailnejad, Abdi-Hachesoo, Nasab, & Shakoori, 2019; Murai, 2013; Yegani, & Korver, 2010) та використання перепелиних імуноглобулінів класу Y (аналог IgG у ссавців) проти різних видів мікроорганізмів (Kassim et al., 2011; Padmani, Gomez, Vani, & Michael, 2016), та навіть замість антибіотиків (Yegani, & Korver, 2010).

У птиці описано та вивчено досить багато неспецифічних гуморальних факторів імунітету. В найбільшій кількості вони знаходяться в плазмі (або сироватці) крові. Це система комплементу та антибактеріальні пептиди (кателіцидин-подібний білок і дефенсини) – найважливіші та найбільш вивчені, а також інші молекули з антибактеріальною дією (гострофазні білки, сироватковий амліоїд А, гаптоглобін, фібронектин, церулоплазмін, трансферин, колагенові лектини, манан-зв'язуючий лектин) (Hynes, & Yamada, 1982). Комплемент та антибактеріальні пептиди

руйнують оболонки бактерій, стимулюють запальну реакцію та специфічну імунну відповідь, інші молекули – діють як опсоніни, активуючи процес фагоцитозу бактеріальних клітин (Davidson, Kaspers, & Schat, 2008).

Серед інших бактеріальних інфекцій роботу імунної системи перепелів вивчали під час ензоотій стафілококозу (Karausum, & Datta, 2017; Singh, 1966) та ешерихіозу (Nain, & Smits, 2011; Pandani, Gomez, Vani, & Michael, 2016), а також штучного інфікування обома видами бактерій. Для вивчення дії на імунну систему бактеріальних антигенів однією з найбільш доступних є реакція аглютинації: доволі проста, швидка, і облік її можна проводити візуально або за допомогою світлового мікроскопа. Для вивчення гуморальних неспецифічних факторів плазми (сироватки) крові основним є метод дослідження бактерицидної активності плазми крові (Alekseeva, 2016).

Метою нашої роботи є вивчення змін імунного статусу перепелів в ході імунологічної перебудови при гіперімунізації бактеріальними антигенами двох видів (*Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*).

Завданням дослідження було провести гіперімунізацію перепелів двома видами бактерій (*E.coli* та *S.aureus*) та вивчити характер змін гуморальних факторів імунітету за наявності та кількості антитіл у реакції аглютинації і змін бактерицидних властивостей плазми крові імунізованої птиці.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт досліджень – бактерицидні властивості плазми крові перепелів в нормі та при імунізації золотистим стафілококом (*S. aureus*) та кишковою паличкою (*E.coli*). Матеріалом досліджень була сироватка крові перепелів. Вибір вказаних видів збудників 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 фарбування за Грамом. Бактерії культивували на м'ясопептонному бульйоні при +37°C впродовж 24 годин. Для імунізації використовували завись інактивованих та живих бактеріальних клітин із концентрацією 10^7 клітин у 1 см³. Інактивування бактерій проводили прогріванням завись у водяній бані протягом 30 хвилин. Отриманий антиген вводили внутрішньом'язово у грудний м'яз в дозі 0,1 см³ чотирикратно з інтервалом 7 діб. Плазму крові отримували шляхом центрифугування стабілізованої гепарином крові. Для визначення бактерицидної активності крові використовували метод з використанням посівів на агар (за В. Х. Матусевич, 1966); індикацію специфічних антитіл проводили в пластинчастій реакції аглютинації за загальноприйнятною методикою.

Результати та їх обговорення

При вивченні бактерицидної активності плазми крові ми готували двократні розведення досліджуваної плазми (від 0 до 1:16), до яких додавали відповідний бактеріальний антиген. Інкубували суміші упродовж 30 хвилин при температурі +37°C. Після інкубації з кожної пробірки виконали посів на поверхню м'ясопептонного агару (коже розведення в окремий сектор чашки Петрі). Результат враховували через 24 години. За відсутності росту мікроорганізму активність плазми вважали високою (100%), при появі окремих колоній бактерій на поверхні агару – частковою, при рості мікроорганізмів у вигляді суцільного бактеріального газону – низькою.

Облік дослідження почали з врахування результатів в контролі росту бактеріальних культур (рис. 1). Обидва мікроорганізми дали ріст, більш інтенсивний у стафілокока, менш інтенсивний – у кишкової палички.



Рис. 1. Контроль росту культури *E. coli* (праворуч) та *S. aureus* (ліворуч)

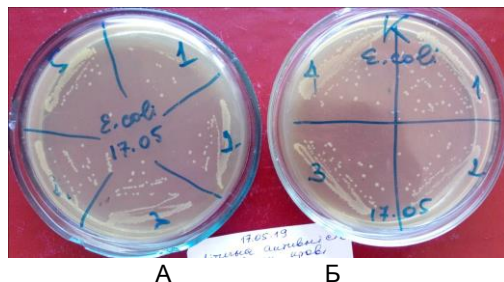


Рис. 2. Бактерицидна активність плазми крові перепелів, імунізованих *E. coli* (А) у порівнянні з плазмою перепелів контрольної групи (Б).

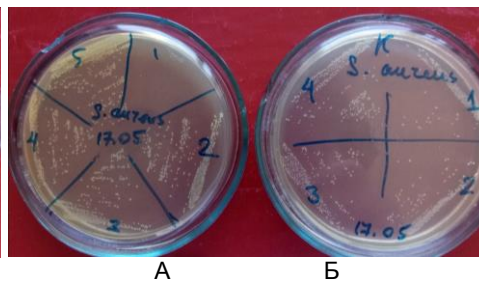


Рис. 3. Бактерицидна активність плазми крові перепелів, імунізованих *S. aureus* (А) у порівнянні з плазмою перепелів контрольної групи (Б).

Плазма контрольної групи перепелів (рис. 2Б та рис. 3Б) не пригнічувала росту бактерій в жодному розведенні, що означає невисоку бактериолітичну активність плазми крові неімунної птиці. Плазма крові від імунізованої птиці (рис. 2А та 3А) проявляла літичну властивість, але лише нерозбавлена (нативна). У випадках розведення плазми літичні властивості знижувалися (ріст бактерій в секторах 2-5 чашок А на рис. 2 і 3). Нативна плазма, імуна до стафілококу, викликала повний лізис *S. aureus* (відсутність росту в секторі 1 на рис. 3А). Плазма крові перепелів, які імунні до кишкової палички, викликала частковий лізис, бо в секторі 1 на рис. 2А видно окремі колонії бактерій, а в

інших секторах – інтенсивний ріст кишкової палички. Отже, бактерицидна активність плазми крові контрольної групи перепелів була низькою, бо в жодному випадку не викликала лізис бактерій. Плазма крові імунізованих перепелів викликала частковий лізис *E. coli* та повний бактериолізис *S. aureus*. Це підтверджує висновок про інтенсивну імунну відповідь у перепелів на використані нами антигени.

Невеликі розміри перепелів не дали змогу отримувати достатню кількість крові для постановки класичної пробірочної реакції аглютинації (РА). Тому ми використали пластинчасту РА, причому отримані результати дають нам право стверджувати, що цю

реакцію можна використовувати не лише як якісну, а й як кількісну.

Ми модифікували методику РА. 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.

З нефарбованими бактеріями ставили РА на спеціальній пластинці з чорними лунками. На

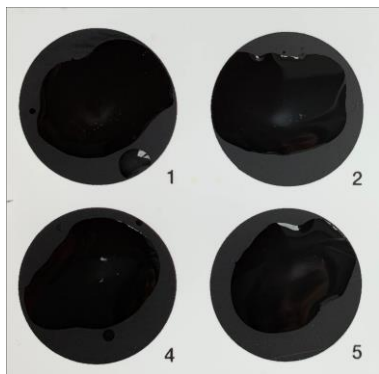


Рис. 4. Пластинчаста реакція аглютинації.

1 та 4 – негативна реакція (сироватка крові контрольної групи перепелів), 2 та 5 – позитивна реакція імунних сироваток крові на відповідний антиген.

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 на 5 логарифмів, а на стафілокок – на 6 логарифмів.

Характер аглютинату відрізнявся в залежності від виду антигену (див. рис. 5-8). Сироватка крові перепелів, групи імунізованих *E. coli*, утворювала візуально помітне скупчення із пластинок бактеріальних клітин, в той час як аглютинат із бактерій *S. aureus* візуально був дрібнішим і краще помітним при мікроскопії за малого збільшення (x100).



Рис. 5. РА із *E. coli* на склі в чашці Петрі.

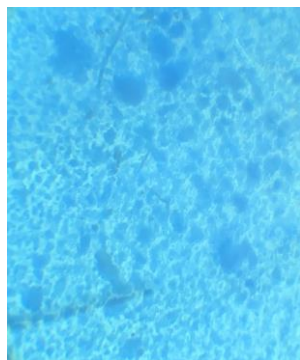


Рис. 6. Мікрофото РА з антигеном *E. coli* (x100).



Рис. 7. РА із *S. aureus* на склі в чашці Петрі.

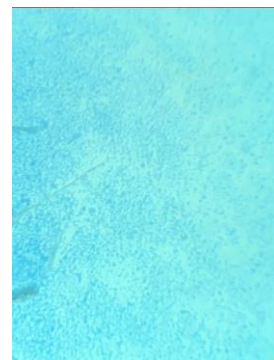


Рис. 8. Мікрофото РА з антигеном *S. aureus* (x100).

Отже, у разі використання невеликих об'ємів плазми пластинчаста РА дає можливість не лише виявити антитіла, а й визначити їх кількість.

Висновки

1. В результаті гіперімуназації перепелів кількість аглютинуючих антитіл збільшилася у 32-64 рази, у порівнянні з неімунною птицею. В контрольній групі титр антитіл не перевищував 1:8 (3 log₂), а в дослідних досягала 1:256 (8 log₂) та 1:512 (9 log₂) у

перепелів, що імунізовані кишковою паличкою та стафілококом відповідно.

2. Плазма крові неімунної птиці не пригнічувала росту бактерій, імунна плазма викликала повний лізис стафілококу та частковий кишкової палички, що свідчить про підвищення бактерицидної активності плазми крові у імунної птиці за рахунок активації неспецифічних гуморальних факторів імунітету.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть пов'язані з вивченням факторів імунітету перепелів за імунації мікроорганізмами інших видів.

References

- Alekseeva, E. A. (2016). *Estestvennaya rezistentnost' zhivotnykh: Metod. ukazaniya*. Krasnoyarsk.
- Burrows, B., Ben-Ezra, N., & Burness, G. (2019). Exposure of Avian Embryos to Cycling Incubation Temperatures Reduces Adult Bactericidal Ability. *Physiol. Biochem. Zool.*, 92(3). doi: 10.1086/702765.
- Davison, F., Kaspers, B., & Schat, K. A. (Eds). (2008). *Avian immunology*. Oxford: Elsevier.
- Esmailnejad, A., Abdi-Hachesoo, B., Nasab, E. H., & Shakoori, M. (2019). Production, purification, and evaluation of quail immunoglobulin Y against Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis. *Molecular Immunology*, 107, 79-83. doi: 10.1016/j.molimm.2019.01.012.
- Fair, J. M., & Ricklefs, R. E. (2002). Physiological, Growth, and Immune Responses of Japanese Quail Chicks to the Multiple Stressors of Immunological Challenge and Lead Shot. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 77–87. doi: 10.1007/s002440010294.
- Fair, J. M., Hansen, E. S., & Ricklefs, R. E. (1999). Growth, developmental stability, and immune response in juvenile Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1430), 1735-1742. doi: 10.1098/rspb.1999.0840.
- Hersh, R. T., Kubo, R. T., Leslie, G. A., & Benedict, A. A. (1969). Molecular weights of chicken, pheasant, and quail IgG immunoglobulins. *Immunochemistry*, 6(5), 762-765. doi:10.1016/0019-2791(67)90142-5.
- Hynes, R. O., & Yamada, K. M. (1982). Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. *JCB*, 95(2), 369. doi:10.1083/jcb.95.2.369.
- Kankova, Z., Drozdova, A., Klobetzova, Z., Lichovnikova, M., & Zeman, M. (2019). Development and reactivity of the immune system of Japanese quail lines divergently selected for the shape of the growth curve. *British Poultry Science*. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1663494>.
- Karsum, H., & Datta, S. K. (2017). Adaptive immunity against Staphylococcus aureus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 409, 419-439. doi: 10.1007/82_2016_1.
- Kassim, N., Mtenga, A. B., Lee, W.G., Kim, J.S., Shim, W.B., & Chung, D.H. (2011). Production of Coturnix Quail Immunoglobulins Y (IgYs) against Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus. *Food Sci. Biotechnol.*, 20(6), 1577-1583. doi: 10.1007/s10068-011-0218-z.
- Murai, A. (2013). Maternal Transfer of Immunoglobulins into Egg Yolks of Birds. *The Journal of Poultry Science*, 50(3), 185-193. doi: 10.2141/jpsa.0120194.
- Nain, S., & Smits, J. E.G. (2011). Validation of a disease model in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) with the use of *Escherichia coli* serogroup O2 isolated from a turkey. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(3), 171–175. Retrieved from <https://europepmc.org/articles/pmc3122969>.
- Nurul, A. Z., Azzmer, A., & Hamid, T. H. T. A. (2017). Lactic Acid Bacteria With Antimicrobial Properties Isolated From The Intestines Of Japanese Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *Science Heritage Journal (GWS)*, 1(1), 10-12. doi: 10.26480/gws.01.2017.10.12.
- Padmani, G., Gomez, L. A., Vani, C., & Michael, A. (2016). Isolation and Characterization of Antibodies Challenging *Escherichia coli* from Japanese Quail. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. Vol. 5, Issue 8. doi: 10.15680/IJRSET.2016.0508005
- Saini, C., Hutton, P., Gao, S., Simpson, R. K., Giraudeau, M., Sepp, T. ... McGraw, K. (2019). Exposure to artificial light at night increases innate immune activity during development in a precocial bird. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 233, 84-88. doi : 10.1016/j.cbpa.2019.04.002.
- Scholtz, N. D., Halle, I., Dänicke, S., Hartmann, G., Zur, B., & Sauerwein, H. (2010). Effects of an active immunization on the immune response of laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) fed with or without genetically modified *Bacillus thuringiensis*-maize. *Poultry Science*, 89(6), 1122-1128. doi: 10.3382/ps.2010-00678.
- Seifi, K., Torshizi, M. A. K., Rahimi, S., & Kazemifard, M. (2017). Efficiency of early, single-dose probiotic administration methods on performance, small intestinal morphology, blood biochemistry, and immune response of Japanese quail. *Poultry Science*, 96(7), 2151–2158. doi: 10.3382/ps/pew446.
- Sing, R. P. (1966). Incidence of staphylococcus spp in poultry farms and Hatcheries and their pathogenicity. *Indian. Veteran J.* 43. 12. 336-338.
- Soares, D. F., Pizzolante, C. C., Duarte, K. M. R., de Moraes, J. E., Budino, F. E. L., Soares, W. V. B., & Kakimoto, S. K. (2018). Welfare indicators for laying Japanese quails caged at different densities. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 90(4), 3791-3797. doi: 10.1590/0001-3765201820180276.
- Stojanovskyj, V. G., Garmata, L. S., & Kolomijets, I. A. (2016). Function of quail immune system at different periods of postnatal ontogenesis. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series "Veterinary Sciences"*, 18 3(70). doi: 10.15421/nvlvet7009.
- Yegani, M., & Korver, D. R. (2010). Application of egg yolk antibodies as replacement for antibiotics in poultry. *World's Poultry Science Association*, 66(1), 27-38. doi: 10.1017/S0043933910000048.