

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО**

РАДЗИХОВСЬКИЙ МИКОЛА ЛЕОНІДОВИЧ

УДК 619:616.98:636.7

**ПАТОМОРФОЛОГІЯ, ДІАГНОСТИКА, ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКА
ЕНТЕРИТІВ ВІРУСНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У СОБАК**

16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора ветеринарних наук

Львів – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Поліському національному університеті Міністерства освіти і науки України

Науковий консультант

доктор ветеринарних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України
Горальський Леонід Петрович,
Поліський національний університет, завідувач
кафедри анатомії і гістології, директор Науково-
інноваційного інституту тваринництва та
ветеринарії.

Офіційні опоненти:

доктор ветеринарних наук, професор
Кісера Ярослав Васильович,
Львівський національний університет
ветеринарної медицини та біотехнологій імені
С.З. Гжицького, професор кафедри епізоотології;

доктор ветеринарних наук, доцент
Жила Микола Іванович,
Державний науково-дослідний контрольний
інститут ветеринарних препаратів та кормових
добавок, завідувач лабораторії клініко-
біологічних досліджень;

доктор ветеринарних наук, професор
Недосєков Віталій Володимирович,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України, професор кафедри
епізоотології, мікробіології і вірусології.

Захист відбудеться « 16 » березня 2021 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.826.03 у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 50, аудиторія № 1.

З дисертацією можна ознайомитись на офіційному сайті та науковій бібліотеці Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 50

Автореферат розісланий « 13 » лютого 2021 р.

**Учений секретар
спеціалізованої вченої ради**

М.І. Леньо

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Проблема ентеритів вірусної етіології у тварин є актуальною для сучасної ветеринарної медицини. Особливо широке розповсюдження таких інфекцій серед собак пояснюється активним збільшенням популяції *Canis lupus familiaris*, що обумовлює подальше загострення епізоотичної ситуації. Тому ентеровірусні інфекції у загальній патології собак стабільно займають провідні місця (Белов А.Д. та ін., 1995; Корнієнко Л.Є. та ін., 2001; Geetha M., 2015; Анфьорова М.В. та ін., 2016; Mira F. et al., 2018; Raza A. et al., 2018).

За даними О.В. Іліної (2011), О.В. Ящука (2014) та А.В. Дідуха (2015) в Україні у собак регулярно реєструють захворювання з ураженням шлунково-кишкового тракту, зокрема вірусний ентерит та гепатит, а також гастроентерити нез'ясованої етіології, частка яких в межах 60 % від загальної кількості інфекцій. Очевидно, що фахівці ветеринарних клінік невеликих міст, у зв'язку із відсутністю діагностичних лабораторій, диференціацію таких хвороб майже не проводять, а здебільшого об'єднують їх під загальною назвою «парвовірусний ентерит». Водночас етіологічний спектр хвороб цього симптомокомплексу охоплює корона- та ротавірусний ентерит, про що свідчать результати специфічної профілактики (Дубков Ю.А., 2000; Ольшанская А.А., 2006; Демина А.В., Нетесов С.В., 2009; Nandi S. et al., 2010).

Враховуючи домінування і прогресивне поширення ентеритів вірусної етіології по всій території України, кількість собак, хворих на парво- та коронавірусний ентерит, з кожним роком збільшується (Галкина Т.С., 2008; Дідух А.В., 2015; Ortega A.F. et al., 2017; Caddy S.L. 2018).

Світові літературні джерела пояснюють, що у собак причинами появи діареї із наступним проявом симптомів ентериту здебільшого є віруси, бактерії та паразити (Логинов Г.Г., 1996; Da Rocha Gizzi A.V. et al., 2014; Drost G.A., 2015; Ortega A.F. et al., 2017; Kilian E. et al., 2018; Дубова О.А. та ін., 2019).

На сьогодні у ветеринарній медицині класифікують наступні види ентериту: *інфекційний* – чинником якого є віруси та бактерії, які після проникнення в організм тварин спричиняють запалення шлунково-кишкового тракту; *паразитарний* – внаслідок прогресивного розмноження гельмінтів і найпростіших у тонкому відділі кишечника; *аліментарний* – з причини надмірного згодовування корму, особливо із вмістом грубої клітковини; *токсичний* – внаслідок отруєння сулемою, миш'яком, грибами, речовинами небактеріального походження; *алергічний* – рушійною силою якого є алергічні реакції кишечника на деякі харчові продукти або медикаменти, виникає тільки у випадку гіперчутливості організму на будь-яку речовину – алерген (Симпсон Дж., Элс У. Родерик, 2003; Байнбридж Д., Эллиот Д., 2008; Тилли Л., Смит Ф., 2010; Б'ятець В., Новіцька О.В., 2015; Кудрявченко О.П., 2016; Никоненко Т.Б., Мельцов И.В., Барышников П.И., 2017).

Інфекційні запалення тонкого відділу кишечника у 70 % випадків мають вірусне, а не бактеріальне походження і характеризуються гострим перебігом. Такі патології здебільшого проявляються у формі гастроентериту або ентероколіту (Сулимов А.А., Уласов В.И., 2008; Kumar M. et al., 2010; Wang J et al., 2012; Licitra B.N. et al., 2014; Greene C.E., Decaro N., 2016).

Взагалі вірусним ентеритам притаманний складний патогенетичний механізм, який супроводжується ураженням серця, печінки та нирок (Борисевич Б.В., Шумілович Н.В., 2001; Колесников П.В., Шинкаренко А.Н., 2012; Craige E., Sykes J., 2012; Локес П.І., Локес-Крупка Т.П., 2014).

Збільшення випадків захворювання собак з ознаками діареї в останні роки відмічають не лише в Україні, але й у Європі. Окрім парво- та коронавірусного ентериту провідні наукові центри постійно відмічають наявність ще й ротавірусної інфекції, котра надзвичайно небезпечна для цуценят і собак дрібних порід, у зв'язку з високою летальністю внаслідок швидкого зневоднення їх організму (Мазур Н.В., 2002; Buonavoglia C. et al., 2006; Kapil S. et al., 2006; Decario N. et al., 2007; Лісова В.В., Чумаков К.А., 2011; Schoeman J.P. et al., 2013; Shcherbak Y.I., Schislenko S.A., 2015).

Існує багато високочутливих і специфічних методів діагностики парво- та коронавірусного ентериту у собак. Проте ці методи здебільшого тривалі у часі, потребують спеціального обладнання і можуть бути виконані тільки в умовах лабораторії (Половинка В.В., 2005; Дмитренко Н.І., Колич Н.Б., 2010; Нестина А.С., Петрова О.Г., 2011).

Таким чином, вивчення біологічних властивостей збудників парвовірусного і коронавірусного ентериту у собак, особливостей клінічного прояву хвороби, морфологічних показників крові, імунологічних показників і патоморфологічних особливостей, удосконалення профілактики та діагностики є актуальним та має важливе значення для вирішення проблеми парво- та коронавірусної інфекції собак.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексної наукової програми кафедри анатомії і гістології Житомирського національного агроекологічного університету ЖНАЕУ (нині Поліський національний університет) за темою «Морфологія, імунологія коронавірусних інфекцій (інфекційний бронхіт курей, коронавірусний ентерит собак), їх діагностика та профілактика» (номер державної реєстрації 0118U003815, 2018–2019 рр.).

Автор виконував розділ «Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології» (номер державної реєстрації – 0113U000900 2013–2018 рр.).

Фрагмент дисертаційної роботи за 2015–2016 рр., складав частину науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології ЖНАЕУ «Крайова епізоотологія, удосконалення діагностики і профілактики інфекційних хвороб тварин» (номер державної реєстрації 0115U006074).

Ініціативна тематика – «Патоморфологія, діагностика, лікування та профілактика ентеритів вірусної етіології у собак» (номер державної реєстрації 0117U003609, 2017–2021 рр.).

Мета та завдання досліджень. Метою дисертаційної роботи було дослідити особливості епізоотичної ситуації щодо ентеритів різного нозологічного профілю та проведення епізоотологічного аналізу щодо парвовірусного (ПВЕ) та коронавірусного ентериту (КВЕ), біологічних властивостей їх збудників у собак, особливостей морфологічних показників крові, еритроцитопоезу та гематологічних

інтегральних індексів, імунологічних показників та патоморфологічних особливостей.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- з'ясувати нозологічний профіль ентеритів у хворих тварин і визначити роль парво- та коронавірусної інфекції у заразній патології собак;
- встановити епізоотологічні особливості парво- та коронавірусного ентериту у собак;
- дослідити морфологічні зміни крові за парво- та коронавірусного ентериту;
- з'ясувати макро- та мікроскопічні зміни на тканинному та клітинному рівнях в організмі собак за парвовірусної інфекції;
- з'ясувати макро- та мікроскопічні зміни на тканинному та клітинному рівнях в організмі собак за коронавірусної інфекції;
- з'ясувати показники ендогенної інтоксикації на організм собак за парво- та коронавірусного ентериту;
- дослідити культуральні властивості збудників парво- та коронавірусного ентериту у собак;
- з'ясувати макро- та мікроскопічні зміни на тканинному та клітинному рівнях в організмі собак за експериментального відтворення парво- та коронавірусної інфекції.
- встановити імунну реактивність організму собак за парво- та коронавірусного ентериту;
- розробити та удосконалити сучасні методи діагностики парво- та коронавірусної інфекції у собак;
- удосконалити та запровадити ефективні методи лікування парво- та коронавірусної інфекції у собак.

Об'єкт дослідження – вплив на організм собак парвовірусної та коронавірусної інфекції.

Предмет дослідження – особливості епізоотологічного процесу, морфологічні, біохімічні, імунологічні показники крові та патоморфологічні зміни внутрішніх органів у собак за спонтанного та експериментального парво- і коронавірусного ентериту.

Методи дослідження – епізоотологічні (епізоотологічний аналіз); клінічні (визначення загального клінічного стану тварин); мікробіологічні (якісний та кількісний склад мікроорганізмів умісту кишечника, визначення чутливості до антибіотиків); патологоанатомічні (виявлення макроскопічних змін); гістологічні (оцінка мікроскопічної будови органів тварин на клітинному і тканинному рівнях); вірусологічні (розмноження вірусу, дослідження інфекційної активності вірусу, біологічна проба); гістохімічні (виявлення кислих білків, вуглеводів та глікопротеїну); серологічні (дослідження рівня антитіл у сироватці крові); гематологічні (морфологічні, біохімічні та імунологічні показники крові); молекулярно-генетичні (проведення полімеразної ланцюгової реакції); статистичні (обробка цифрових даних з метою визначення вірогідності змін показників).

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі з'ясовано особливості епізоотологічного процесу парво- та коронавірусного ентеритів у собак. На основі одержаних результатів досліджень розроблені та запропоновані критерії

патоморфологічної диференційної діагностики парвовірусного та коронавірусного ентериту у собак. За результатами досліджень експериментально обґрунтовано визначення рівня імуноглобулінів класу *G* (*Ig G*) у цуценят після відлучення і до року для корекції схеми вакцинації.

Уперше в Україні проведено детальне вивчення патоморфологічних змін за спонтанного і експериментального ПВЕ та КВЕ собак у порівняльному аспекті, результати якого запропоновано використовувати для диференційної діагностики вірусних ентеритів.

Отримані нові дані щодо культуральних властивостей польових штамів парвовірусу та коронавірусу собак. Опубліковані відповідні методичні рекомендації та отримано патенти України на корисну модель.

За результатами аналізу лейкопоезу розраховано та запропоновано до використання результати інтегральних індексів для оцінки ступеня ендогенної інтоксикації у собак, хворих на ентерити вірусної етіології. Визначено особливості морфологічних, біохімічних показників та результати еритроцитопоезу і лейкопоезу за парво- та коронавірусної інфекції.

Уперше в Україні виконано комплексне дослідження щодо удосконалення діагностики парвовірусного ентериту шляхом виділення *Ig G* до парвовірусу собак шляхом афінної хроматографії з іммобілізованим білком *A Staphylococcus aureus*.

Встановлено, що у собак за ПВЕ та КВЕ виявляють чітко виражені порушення імунного гомеостазу у вигляді зниження субпопуляцій імунокомпетентних клітин.

За результатами молекулярно-генетичних досліджень вперше сконструйовано олігонуклеотидні праймери, *SET1 – CPVF (tctttgcctcaatctgaagg) CPVR (cagtaatatagttgtatttcc)* і *SET2 – CPVF (gcatttggtagacaacatgg) CPVR (ttgaatccaatctccttctgg)*, для виявлення та ідентифікації геному парвовірусу собак у полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР), які дозволяють ампліфікувати певні ділянки геному вірусу з високою специфічністю, задля своєчасної диференційної діагностики ПВЕ. Крім того, вперше на території України виділено польовий штам коронавірусу «*Nick*» і отримано свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (№ 735 від 10. 12. 2018 р.). Виділено польовий штам парвовірусу «*Антей*» і отримано свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (№ 734 від 10. 12. 2018 р.).

Наукова новизна отриманих результатів підтверджена патентами України на корисну модель № 137015 від 25. 09. 2019 р. «Спосіб культивування парвовірусу собак» та № 133896 від 25. 04. 2019 р. «Спосіб культивування коронавірусу собак».

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень суттєво доповнюють і поглиблюють сучасні знання про ПВЕ та КВЕ, як інфекційні хвороби собак і можуть бути використані у клінічній практиці лікарів ветеринарної медицини для діагностики ентеритів вірусної етіології.

За результатами проведених наукових досліджень здобувачем (у співавторстві) опубліковано монографію «Коронавірусна інфекція собак», та навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів, які навчаються за спеціальністю

«Ветеринарна медицина» з грифом Міністерства освіти і науки України (1/11-5576 від 15. 04. 2014 р.) «Паразитарні та інфекційні хвороби м'ясоїдних тварин».

Для диференційної діагностики ПВЕ та КВЕ розроблено та видано методичні та науково-практичні рекомендації: «Патоморфологічна діагностика парвовірусного та коронавірусного ентериту у собак», затверджені НМР Науково-методичного центру інформаційно-аналітичного забезпечення діяльності вищих навчальних закладів «Агроосвіта», (протокол № 6 від 1. 10. 2018 р.); «Особливості культивування вірусів собак родини *Parvoviridae* та *Coronaviridae*», затверджені НМР «Науково-методичного центру інформаційно-аналітичного забезпечення діяльності вищих навчальних закладів «Агроосвіта», (протокол № 6 від 1. 10. 2018 р.); «Інтегральні гематологічні індекси оцінки ступеня ендогенної інтоксикації у собак», затверджені НМР Держветфітослужби (протокол № 3 від 20. 12. 2018 р.).

Отримано деклараційні патенти України на корисну модель: «Спосіб культивування коронавірусу собак» (UA 201811498 U від 25. 04. 2019 р.), «Спосіб культивування парвовірусу собак» (UA 201902860 U від 25. 09. 2019 р.).

Матеріали дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі та науково-дослідній роботі на кафедрах: лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини (ІПНКСВМ), кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб, кафедрі ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й. С. Загаєвського Білоцерківського національного аграрного університету; кафедрі мікробіології, фармакології та епізоотології, кафедрі анатомії і гістології Житомирського національного агроекологічного університету (нині Поліський національний університет); на кафедрі нормальної та патологічної морфології Харківської державної зооветеринарної академії; на кафедрі нормальної і патологічної анатомії та патофізіології, кафедрі фізіології, біохімії і мікробіології, кафедрі епізоотології і паразитології Одеського державного аграрного університету; на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб тварин, кафедрі нормальної і патологічної анатомії сільськогосподарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету; на кафедрі інфекційних та інвазійних хвороб Подільського державного аграрно-технічного університету; на кафедрі анатомії нормальної та патологічної фізіології тварин Сумського національного аграрного університету; на кафедрі епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України; кафедрі патологічної анатомії і гістології, кафедрі епізоотології і інфекційних хвороб тварин, кафедрі мікробіології і вірусології, кафедрі хвороб дрібних тварин і птиці ЗО Вітебська «Знак пошани» державної академії ветеринарної медицини (Республіка Білорусь).

Результати дисертаційної роботи використовують у схемі лабораторної діагностики ентеритів вірусної етіології: ТОВ-центр ветеринарної діагностики «ЦВД» і ТОВ «Бальд», ветеринарна лабораторія (м. Київ); у виробничому процесі в умовах ветеринарної клініки «Багіра»; навчально-науково-виробничій клініці ветеринарної медицини факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету; ветеринарній клініці «Доктор ZOO» і «Шанс»; міській державній лікарні ветеринарної медицини м. Житомир; «Айболит» м. Бердичів;

«Юпітер» м. Вінниця; «Зоолукс», «Крихітка Єнот» і «Вікторія» м. Київ та племінному розпліднику кінологічного центру прикордонних військ Західного оперативного командування м. Великі Мости, Сокальського району, Львівської області (військова частина № 2418).

Особистий внесок здобувача. Автор особисто виконав пошук і аналіз наукової літератури за темою роботи, відібрав матеріал, провів наукові дослідження, здійснив статистичну обробку цифрових показників та узагальнив одержані результати, оформив ілюстративний матеріал. Здобувач розробив програму й етапи наукових досліджень, сформулював мету і завдання експериментальних досліджень. Інтерпретацію одержаних результатів, формулювання висновків і пропозицій виробництву проведено спільно з науковим консультантом.

Частину патоморфологічних досліджень проводили на кафедрі анатомії, гістології і патоморфології тварин ім. акад. В.Г. Касьяненка НУБіП у співпраці з доктором ветеринарних наук, професором Б.В. Борисевичем та кандидатом ветеринарних наук, доцентом В.В. Лісовою. Окремі імунологічні дослідження проводили за науково-консультативної допомоги доктора ветеринарних наук, професора В.М. Івченка (Інститут післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини БНАУ). Молекулярно-біологічні дослідження здобувач проводив у лабораторії генно-інженерних біотехнологій, відділу генних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», дослідної лабораторії ПП «Лабораторія провідних біотехнологій «НЕО-ГЕН» (м. Київ), за участі наукових співробітників Д.Ю. Рибальченка та О.Л. Філоненка. Виділення та сорбцію імуноглобулінів виконували спільно з лабораторією генно-інженерних біотехнологій, відділу генних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», разом з кандидатом біологічних наук, доцентом О.Б. Горбатюк. Низку експериментальних науково-лабораторних досліджень було проведено у ТОВ «Бальд», приватній ветеринарній лабораторії та ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» (м. Київ).

Одержані наукові результати, що виносяться на захист, є особистим досягненням здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи доповідались, обговорювались і були схвалені на конференціях професорсько-викладацького складу факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агроекологічного університету (м. Житомир, 2014–2019); міжнародній науково-практичній конференції «Заразні хвороби тварин: сучасні методи діагностики, лікування та профілактики» (м. Житомир, 2015); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2016); науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2016); науково-практичній і навчально-методичній конференції науково-педагогічних працівників Харківської державної зооветеринарної академії «Проблеми, новітні здобутки та перспективи розвитку ветеринарної медицини» (м. Харків, 2016); міжнародної науково-практичної конференції «Инфекционные болезни животных и антимикробные средства» (г. Саратов, 2016); міжнародній науково-практичній конференції «Теорія, практика та

перспективи ветеринарної медицини», присвяченій, 115-річчю з дня народження академіка І.О. Поваженка (м. Київ, 2016); міжвузівській науково-практичній конференції викладачів і студентів «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи» (м. Дніпропетровськ, 2016); XIII міжнародній науково-практичній конференції морфологів України «Актуальні проблеми сучасної морфології» (м. Житомир, 2017); всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції «Сучасні проблеми ветеринарної медицини з питань інфекційної патології та патоморфології тварин» (м. Полтава, 2017); науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2017); третьому щорічному регіональному науковому симпозиумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗБЗ в Україні (м. Київ, 2018); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченій 100 - річчю заснування НААН України (м. Львів, 2018); міжнародній науково-практичній конференції «Інфекційна патологія тварин: сучасні методи діагностики, лікування та профілактики» (м. Дніпро, 2018); науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2017); XVII всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді учені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченій 100-річчю з дня народження професора В.І. Третевича (м. Львів, 2018); international Multidisciplinary Conference Science and Technology of the present time: Priority Development Directions of Ukraine and Poland (19–20 October 2018, Wolomin. Republic of Poland); VI всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів» (м. Житомир, 2019); четвертому щорічному регіональному науковому симпозиумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗБЗ в Україні (м. Київ, 2019); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми епізоотології та заразних хвороб тварин» присвяченій 80- річчю з дня народження професора В.Я. Атамася (м. Одеса, 2019); зборах з начальниками відділень (груп) безпечності харчових продуктів та ветеринарної медицини органів Держприкордонслужби на базі Кінологічного навчального центру (м. Великі Мости, Львівська область, Сокальський район, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 47 наукових праць, з яких 1 монографія, 30 статей у наукових фахових виданнях України, (13 одноосібних), 11 у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних (1 – *Web of Science*, 10 – у виданнях, що входять до наукометричних баз даних), 4 статті у наукових фахових виданнях інших держав, 1 посібник, 3 методичні рекомендації (одна з яких затверджена Держветфітослужбою України), 2 патенти на корисну модель і 2 свідоцтва про первинну реєстрацію штамів мікроорганізмів, 10 тез наукових доповідей, з яких 5 у закордонних виданнях.

Структура та обсяг дисертації. Обсяг основної частини дисертаційної роботи викладено на 427 сторінках комп'ютерного тексту, містить анотації, вступ, огляд літератури, вибір напрямів досліджень, матеріали і методи виконання роботи,

результати експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, список використаних літературних джерел та додатки. Матеріали дисертаційної роботи проілюстровані 263 рисунками і 31 таблицею. Список використаних літературних джерел містить 603 посилання, у тому числі 285 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Вибір напрямків досліджень, матеріал та методи досліджень. Дисертаційна робота виконувалась впродовж 2012–2019 років на кафедрі анатомії і гістології та кафедрі мікробіології, фармакології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету (нині Поліський національний університет). Окремі діагностичні дослідження виконано на базі ІВМ НААН, а деякі патоморфологічні – на кафедрі анатомії, гістології і патоморфології тварин ім. акад. В. Г. Касьяненка НУБіП. Імунологічні дослідження проведено в Інституті післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини БНАУ. Молекулярно-біологічні дослідження – в лабораторії генно-інженерних біотехнологій, відділу генних технологій ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, дослідної лабораторії ПП «Лабораторія провідних біотехнологій «НЕО-ГЕН» м. Київ. Дослідження щодо епізоотичних особливостей ентеритів у собак та експериментальні дослідження проводили у приватній ветеринарній лабораторії ТОВ «Бальд», у ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики» та племінному розпліднику Кінологічного центру прикордонних військ Західного оперативного командування м. Великі Мости, Сокальського району, Львівської області (військова частина № 2418) та у ветеринарних клініках міста Житомир: приватних ветеринарних клініках «Багіра» і «Доктор–Zoo», «Шанс», навчально-науково-виробничій клініці ветеринарної медицини факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету та в міській державній лікарні ветеринарної медицини (м. Житомир), приватній ветеринарній клініці «Айболит» (м. Бердичів) та приватних ветеринарних клініках «Зоолукс», «Крихітка Єнот» і «Вікторія» (м. Київ) та «Юпітер» (м. Вінниця) на породних і безпородних собаках (рис. 1 та 2).



Рис. 1. Загальна схема проведення досліджень

На першому етапі досліджень проводили визначення епізоотологічних особливостей ентеритів вірусної етіології з встановленням ролі парво- та коронавірусної інфекції у нозологічному профілі хвороб із специфічним симптомокомплексом – «геморагічний ентерит». Для цього використовували звіти амбулаторних журналів прийому вище згаданих приватних та державних клінік ветеринарної медицини, а також результати досліджень приватної ветеринарної лабораторії ТОВ «Бальд» та ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики».

Під час епізоотологічного аналізу досліджено більше 4000 тисяч собак. Характерні клінічні ознаки інфекційних ентеритів мали 3302 тварини, з них 1423 були інфіковані вірусами: парвовірусом – 1237; коронавірусом – 99.

За основу епізоотологічного методу обстеження взято збір і реєстрацію даних закономірності та залежності захворюваності із розрахунком загальних епізоотологічних та зоометричних показників: нозологічного профілю, сезонності, захворюваності, породної та статеві схильності.

На другому етапі проводили гематологічні, біохімічні дослідження та визначали показники еритроцитопоезу у собак за спонтанного і експериментального ПВЕ і КВЕ різних форм прояву та у різні стадії перебігу

хвороби. На основі показників *лейкоцитопоезу* визначали ступінь ендогенної інтоксикації шляхом арифметичного розрахунку інтегральних індексів інтоксикації.

Імунологічні дослідження включали визначення параметрів клітинної та гуморальної ланки імунітету. Абсолютний і відносний вміст Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій визначали в реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, В-лімфоцити – в реакції розеткоутворення з еритроцитами миші. При цьому розеткоутворювальними вважали клітини, до яких приєднувалось три і більше еритроцити. Також здійснювали підрахунок кількості теофілін чутливих (Т-супресорів) та резистентних до дії теофіліну (Т-хелпери) клітин. Імунорегуляторний індекс визначали як співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів (Віксман М.Г., та ін., 1985; Дика О.В., 1997). Імунологічні дослідження щодо визначення рівня імуноглобуліна G-антитіл до парвовірусу собак у сироватці крові проводили, використовуючи набір реагентів «Парво-IgG-IФА» (ХЕМА) на аналізаторі *Immunochem-2100 Microplate reader*.

На даному етапі проводили *вірусологічні дослідження*, а саме: виділення та ідентифікацію вірусів, з використанням клітинних культур. Для виділення коронавірусного та парвовірусного антигену з патологічного матеріалу і накопичення вірусного матеріалу використовували перещеплювальні лінії культур клітин СПЕВ (нирки ембріона свині), ВНК-21 (фібробласти нирки сирійського хом'яка), РК-13 (нирки кроля). *Мікробіологічні дослідження* щодо визначення бактеріальної контамінації та антибіотикочутливості виявлених мікроорганізмів проводили шляхом висіву патологічного матеріалу на живильні середовища. Клітини вирощували у скляних і пластикових матрацах об'ємом 25, 50 і 100 мл³ стаціонарним методом, а також у лунках полістиролових плашок із посівною концентрацією від $1,0 \times 10^5$ до $2,0 \times 10^5$ кл./мл. Репродукцію польових ізолятів парво- і коронавірусу проводили на культурі клітин з густоти моношару у межах 70–80 %. У кінці періоду інкубації інфіковану культуру заморожували за температури -24 C^0 та піддавали відтаюванню, щоб зруйнувати структуру цілісності клітин за рахунок температурного «стресу» і забезпечити повний вихід вірусу.

Щодня переглядали моношар на наявність цитопатогенного впливу. Розрахунок інфекційного титру вираховували за методом Ріда і Менча, виражаючи титр вірусу у $\text{Ig TЦД}_{50/\text{cm}^3}$. Культуральну вірусовмісну рідину використовували для постановки РГА на виявлення аглютинуючих властивостей парвовірусу і коронавірусу до еритроцитів тварин різних видів. Суспензію еритроцитів і РГА отримували за загальноприйнятими методиками. Для збільшення концентрації гемаглютининів у культуральній вірусовмісній суспензії виконували її концентрування методом зворотного діалізу (Антонов Б.И., та ін., 1986; Поліщук В.П., та ін., 2005; Белоусова Р.В., та ін., 2006).

Для вивчення *імуногенних властивостей* отриманого, власне виділеного на гетерологічних перещеплювальних культурах клітин, парвовірусу та коронавірусу проводили біопробу на інтактних цуценятах 45 добового віку, яких інфікували культуральною суспензією *per os* один раз на добу в дозі 5 мл/кг. Отримавши позитивний результат, провели активну евтаназію, використовуючи внутрішньовенне введення препарату Тіопенат (діюча речовина – тіопентал натрію).

Для детального вивчення впливу власне отриманого парвовірусу і коронавірусу були проведені *патоморфологічні дослідження*. Патологоанатомічний розтин трупів собак проводили у спинному положенні методом часткової евісцерації в загальноприйнятій послідовності у прозекторії кафедри анатомії і гістології факультету ветеринарної медицини Поліського національного університету та відбирали матеріал для вірусологічних й гістологічних досліджень. Кожного разу проводили протоколювання розтину та фотофіксацію виявлених змін фотоапаратом «Nikon». Для *гістологічного дослідження* від усіх тварин під час їх розтину відбирали тимус, селезінку, брижові лімфатичні вузли, міокард, ділянки тонкої кишки. Від цуценят з генералізованою формою хвороби додатково відбирали шматочки легенів, печінки, нирок. Гістологічні зрізи виготовляли на санному мікроскопі МС-2. Товщина зрізів не перевищувала 10 мкм.

Для *вивчення мікроскопічної будови* і отримання оглядових препаратів застосовували фарбування зрізів гематоксиліном та еозином (Горальський Л.П., та ін., 2015).

Сумарні білки зафарбовували амідочорним 10 В, загальні та кислі білки – за методом Мікель-Кальве, глікоген і глікопротеїни – за допомогою ШЙК-реакції. Глікозаміноглікани виявляли альціановим синім за рН 1,0 та 2,5 (Горальський Л.П. та ін., 2015).

Для вимірювання товщини епітеліального, власного шару, підслизової основи, м'язової оболонки, висоти ворсинок дванадцятипалої кишки використовували окуляр-мікрометр МОВ – $\times 1-7$. Необхідні компоненти визначали не менше ніж у десяти полях зору на десяти і більше препаратах у кожній групі тварин.

Мікрофотографування гістологічних препаратів здійснювали за допомогою відеокамери САМ V 200, вмонтованої у мікроскоп Micros МС 50.

Метою **третього етапу** (рис. 2) експериментів було удосконалення діагностики шляхом розроблення режимів проведення ПЛР з підбором специфічних праймерів.



Рис. 2. Загальна схема проведення досліджень

Розробку специфічних праймерів для виявлення парвовірусу собак на основі ПЛР проводили за використання бази даних *GenBank*, *EMBL* (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека). Нуклеотидну послідовність праймерів для виявлення парвовірусу собак підібрано із використанням програми *Primer Express* (*Applied Biosystems*). Олігонуклеотидні праймери синтезували на виробничих

потужностях *HVD Biotech Vertriebs (Австрія)*. Ампліфікацію ДНК-мішені здійснювали на приладі Терцік (виробництва НФК «ДНК-технологія»). Отримані результати аналізували за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі.

Удосконалення *методів лікування* відбувалось шляхом виділення *Ig G*, специфічних до парвовірусної інфекції з сироватки крові собак на 21 добу після вакцинації. Високопродуктивним та ефективним способом отримання антитіл є афінна хроматографія з використанням сорбентів на основі іммобілізованих імуноглобулінозв'язувальних білків, зокрема, рекомбінантного білка *A Staphylococcus aureus*. Чистоту елюйованих антитіл аналізували методом електрофорезу в 12–15 % поліакриламідному гелі з 0,1 % додецилсульфатом натрію. Оцінку чистоти та кількості виділених *Ig G* собаки проводили шляхом денситометрії електрофореграм (Горбатюк О.Б. та ін., 2012).

Для *вивчення імунної відповіді* організму проводили статистичний аналіз щодо специфічної профілактики та поствакцинальних ускладнень у цуценят, що обслуговують у ветеринарних клініках міста Житомир за 2015–2016 роки. За визначений період було проведено 1080 профілактичних щеплень собак до року. Реактивність організму на перебування парвовірусу та після одужання визначали за *Ig G* (антитіл) до парвовірусу собак у сироватці крові методом ІФА. Встановлено період напруженості імунітету та визначені оптимуми щодо термінів вакцинації та ревакцинації на основі рівня антитіл і показників клітинного імунітету.

Постембріональний стан гуморальної ланки імунітету цуценят, народжених від сук, вакцинованих під час щенності, ми визначали за вмістом *Ig G* до парвовірусу в сироватках крові методом ІФА. Біологічний матеріал у цуценят відбирали на 45 добу життя, а у сук перед вакцинацією – у першій половині щенності.

Експерименти на тваринах проводили відповідно до правил, прийнятих Європейською Конвенцією із захисту хребетних тварин, що використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010).

Протокол досліджень схвалено комісією з біоетичної експертизи і дозволено у Житомирському національному агроекологічному університеті (протокол № 1 від 27. 02. 2018 р.) та Головним управлінням Держпродспоживслужби в Житомирській області («Дозвіл на проведення наукових експериментів, тестувань, з використанням експериментальних тварин» від 6. 03. 2018 р.).

Отримані результати обробляли статистично, з вирахуванням середніх арифметичних величин (M), середньої квадратичної похибки (m) і ступеня достовірності різниці (P), між показниками. Цифрові результати досліджень обробляли за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням комп'ютерних програм *Statistika 6.0* та *Microsoft Excel 2007*. Вірогідність розходжень між показниками оцінювали за критерієм Стюдента. Вираховували три ступені достовірності * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ (Мазур Т., 1998; Лопач С.Н. та ін., 2000; Кочетов А.Г. та ін., 2012).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Дослідження особливостей епізоотичного процесу парвовірусної та коронавірусної інфекції у собак. У результаті проведених моніторингових досліджень за 2007–2015 рр., було піддано дослідженню 3302 проби біологічного матеріалу, отримані від собак з «діарейним комплексом», наявність парвовірусного антигену лабораторно підтвердили у 1237, а коронавірусний – у 99 пробах. Згідно із результатами досліджень щодо епізоотологічних особливостей встановлено, що корона- та парвовірус вражає собак різного віку, єдиним винятком є цуценята до 2 місяців. У тварини старших вікових груп коронавірус діагностували навіть у віці 7 та 8 років, а найбільш схильними до захворювання були собаки від 5 до 8 місяців. Стосовно сприйнятливості собак до парвовірусу, відмічаємо два найбільш виражені спалахи: у віці 6-8 місяців та в 6-7 років.

Відповідно наших результатів, пік захворюваності залежно від пори року був наступним: за парвовірусу – у літньо-осінній; коронавірусу – у весняно-літній. Найбільшу схильність до парвовірусу проявляли собаки таких порід як: Лайка, Англійський бульдог та Бульмастиф; коронавірусну – Ротвейлер, Джек рессел тер'єр та Бігль.

У загальній статистиці в межах 2014–2015 рр було відібрано для комплексного аналізу проби від 146 собак, з яких причину незаразної етіології встановлено у 13, а заразної – у 87 % дослідних тварин. Виявлено, що найпоширенішою хворобою є лямбліоз – 19,5, вірусний гепатит – 18,8, парвовірусний ентерит – 13,6, криптоспоридіоз – 11,7, ротавірусний ентерит – 9,8, неоспороз – 6,5, коронавірусний ентерит та чума м'ясоїдних у 5,8 кампілобактеріоз – у 4,6 дослідних проб відповідно, і найменше під час проведення моніторингу виявляли сальмонельоз – 3,9 % проб відповідно. Водночас слід зазначити, що під час проведення діагностичних досліджень тільки у 46 собак виявлено лише один антиген, а в інших 100 тварин було два і більше збудники хвороб, що вивчали (рис. 3).

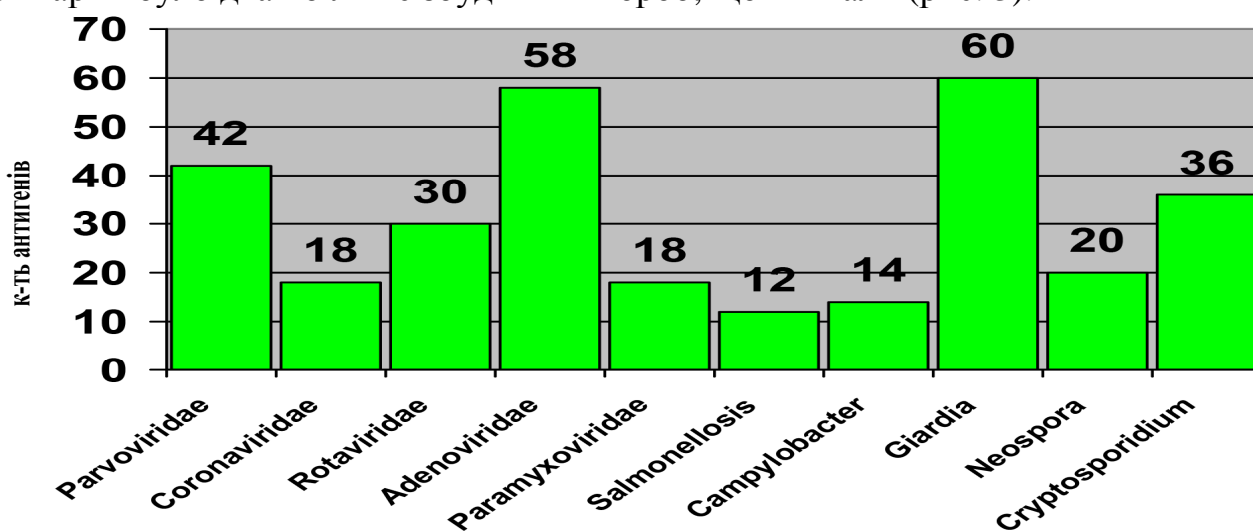


Рис. 3. Нозологічний профіль ентеритів у собак

Ентерити вірусної етіології частіше діагностували у цуценят перших місяців життя. Окремі випадки наявності вірусного антигену були зафіксовані у досить дорослих собак. Клінічні ознаки при цьому були слабо виражені, що свідчить про роль тварин старшого віку у збереженні та перенесенні вірусного агента, що підтримує епізоотичний процес.

Аналіз показників морфологічного складу крові у собак за парво- та коронавірусної інфекції. Для дослідження використовували біоматеріал (стабілізована кров і сироватка крові), отриманий від собак з характерними клінічними ознаками парвовірусної або коронавірусної інфекції та обов'язковим підтвердженням діагнозу одним із методів: експрес-тест (ІХА) або виявлення антигену (ПІР).

У собак, інфікованих ентеритами вірусної етіології, встановлено: за парвовірусного ентериту – еритропенію на 10 % ($P < 0,01$), зниження гематокритної величини на 2,5 %; за коронавірусного ентериту – еритропенію на 6 % і зниження гематокритної величини на 15 % відповідно. Показники еритроцитопоезу: середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (*МСНС*) і середній об'єм еритроцитів (*МСV*) були у межах норми, але на пікових значеннях. Щодо вмісту гемоглобіну в одному еритроциті (*МСН*), то цей показник у разі ПВЕ був на 5 % ($P < 0,05$) вищим за ліміт. За КВЕ *МСН* і *МСV* знаходилися в межах норми, а *МСНС* був на 5 % вище за норму.

У собак, хворих на парвовіроз, виявлено динамічне зростання паличкоядерних нейтрофілів майже у три рази, що свідчить про тяжкий стан тварин у термінальну стадію хвороби і розвиток дегенеративного процесу зсуву ядра вліво за рахунок молодих клітин. У різні стадії розвитку парвовірозу лейкоцитоз було встановлено лише на початковій стадії, а з розвитком патологічного процесу спостерігали подальше зменшення кількості лейкоцитів: у розгорнуту стадію хвороби на 50 % та термінальну – на 75 %.

Показники функціонального стану печінки у собак за ентеритів вірусної етіології були наступними: за ПВЕ зниження вмісту білка на 30 % ($P < 0,001$), альбумінів на 35 % ($P < 0,001$), гіперферментація АсАТ на 12 % ($P < 0,05$) і збільшення коефіцієнта де Рітиса на 7 %. За КВЕ встановлено зменшення вмісту білка на 22,5 % ($P < 0,05$), альбумінів на 64 % ($P < 0,001$) і зниження показників білкового коефіцієнта на 10 % ($P < 0,01$). Також відзначали зниження вмісту креатиніну за ПВЕ на 6 %, а за КВЕ сечовини – на 8 % ($P < 0,05$).

Встановлено біохімічні показники крові у собак за кардіальної та кишкової форм парвовірусної інфекції і встановлено незначні відхилення від фізіологічних лімітів, залежно від форми прояву захворювання: гіпоальбумінемію, гіпо- або гіперферментацію АлАТ і АсАТ та показника коефіцієнта Де Рітиса, які, в основному, характеризують функціональний стан печінки та серця. За парвовірусної інфекції встановлено поліорганну недостатність з розвитком патологічної імуносупресії та гепаторенального синдрому.

Аналізуючи одержані індекси морфологічних показників еритроцитопоезу, встановлено нормоцитарну анемію, але з тенденцією переходу до макроцитарної. Зміни біохімічних показників були специфічні й відображали глибину патологічних процесів, які ускладнювали перебіг вірусних ентеритів.

Дослідження показників клітинного і гуморального імунітету собак за парвовірусної і коронавірусної інфекції.

У собак за ентеритів вірусної етіології експериментально встановлено достовірне зниження кількості Т-лімфоцитів за ПВЕ на 37 % ($P < 0,001$), а за КВЕ на 15 % ($P < 0,01$) відповідно, кількість Т-хелперів достовірно ($P < 0,001$) знижувалась у двох дослідних групах: у першій (за ПВЕ) на 55 %, другій (за КВЕ) на 30 %, Т-

супресорів достовірно знижувалась у тварин двох дослідних груп: на 40 % ($P < 0,001$) – у тварин за парвовірозу та на 30 % ($P < 0,01$) – за коронавірусної інфекції.

Показник імунорегуляторний індекс за парвовірозу був на 25 % нижчим від показника у клінічно здорових собак, а за коронавірусної інфекції – в межах референтних показників. Кількість В-лімфоцитів у тварин першої групи достовірно на 25 % ($P < 0,001$) знижувалась, і на 35 % ($P < 0,001$) у тварин другої дослідної групи.

Аналіз показників гематологічних інтегральних індексів у собак за парвота коронавірусної інфекції.

Для встановлення порушення гуморальної та клітинної ланок імунної системи, мікро- і макрофагальної системи, зниження неспецифічного захисту організму був проведений аналіз інтегральних лейкоцитарних індексів на основі формули крові, що відображає стан нейрогуморального гомеостазу та імунологічної реактивності організму.

Показники інтегральних індексів інтоксикації при коронавірусній інфекції за експериментального відтворення хвороби відрізнялись від її спонтанного перебігу. Більш виражений гострий запальний процес з порушенням імунної реактивності за рахунок активності лише клітинної ланки імунітету і токсичним ураженням кісткового мозку мав природний перебіг КВЕ, на що вказувало підвищення ($P < 0,001$) ЛІІ (лейкоцитарний індекс інтоксикації), ІЗЛК (індекс зсуву лейкоцитів крові), ІІІ (показник інтоксикації) та зниження ЯІ (ядерний індекс) з ЗІ (загальний індекс).

Аналіз лейкоцитарних індексів за експериментального відтворення КВЕ свідчив про тяжкий стан організму за підгострого перебігу з характерним розвитком інтоксикації та пригнічення діяльності кісткового мозку.

Показники інтегральних індексів неспецифічної реактивності мали часткову тотожність у варіантах спонтанного і експериментального перебігу КВЕ з тією відмінністю, що натуральна хвороба значно агресивніше впливала на організм тварини. Значно розвинена ендогенна інтоксикація, порушення ефекторних і афекторних ланок імунітету з пригніченням його функцій, що відобразилось у нестачі блокаторів запалення, цитокінів, свідчила про супресію кісткового мозку на фоні гіпоксії головного мозку.

Проведені дослідження показали, що у собак за парвовірозу спад інтегральних гематологічних показників відбувається з подальшим їх ростом, але все ж не досягає фізіологічного ліміту. Інтерпретація цих даних повинна враховувати пригнічення імунної системи, зокрема клітинної ланки, дефіцит лейкоцитів і супресію кісткового мозку, гіпоксію головного мозку та дефіцит цитокінів. Отже, показники гематологічних індексів інтоксикації у собак за ПВЕ свідчать про тяжкий перебіг захворювання зі слабо вираженою реактивністю та пригніченням імунної відповіді до критичних меж у термінальну стадію. У свою чергу, індекси неспецифічної реактивності, показники яких здебільшого були меншими від норми, вказували на тяжкий ступінь ендогенної інтоксикації, навіть з ефектом супресії кісткового мозку. Показники індексів активності запалення у собак за ПВЕ відображали пригнічення імунної відповіді організму та розвиток запального процесу.

Патоморфологічні зміни у собак за спонтанної форми парвовірусної інфекції. Патолого-анатомічні зміни у собак, загиблих від парвовірусного ентериту,

відповідають двом формам хвороби – кардіальній та кишковій. За кишкової форми парвовірусного ентериту основними патолого-анатомічними змінами є: геморагічний ентерит, серозно-геморагічне запалення брижових лімфовузлів, ознаки гепатиту та збільшення селезінки. Кардіальна форма хвороби характеризувалась гострим альтеративним міокардитом, у легенях – крововиливами та вогнищами ателектазів. За кишкової форми парвовірусної інфекції у печінці собак відбуваються дистрофічні зміни й руйнування гепатоцитів, у підшлунковій залозі – дистрофічні та некротичні зміни клітин екзокринної й ендокринної частин органа. Встановлені мікроскопічні зміни дають можливість стверджувати, що кишкова форма парвовірусної інфекції у собак призводить до розвитку гепато-панкреатичного синдрому (рис.4 та 5).

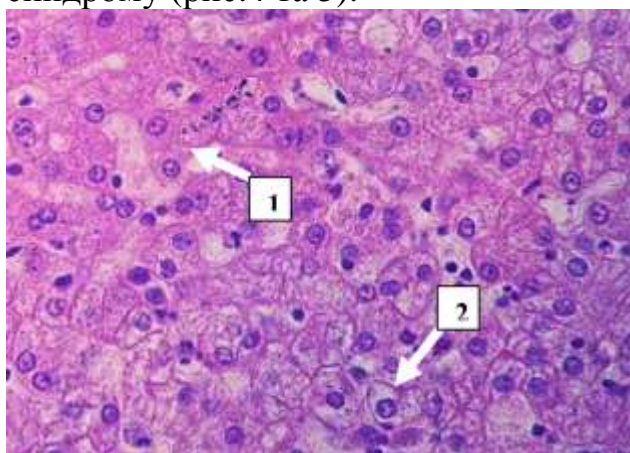


Рис. 4. Мікроструктура печінки собаки, що загинула від спонтанної кишкової форми парвовірусної інфекції: 1 – зерниста дистрофія гепатоцитів; 2 – гідропічна дистрофія гепатоцитів. Гематоксилін та еозин. $\times 1000$

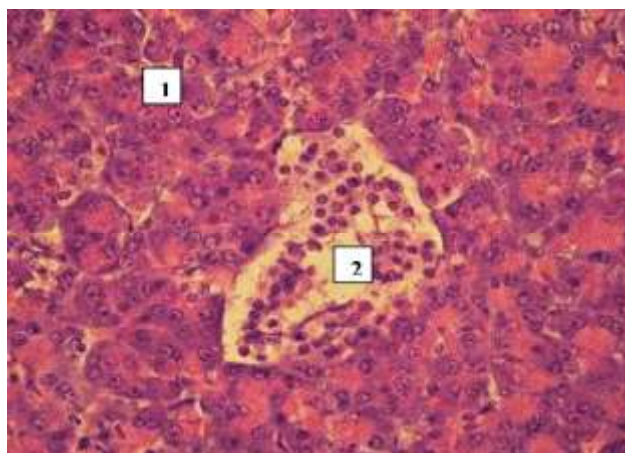


Рис. 5. Мікроструктура підшлункової залоза собаки при спонтанній кишковій формі парвовірусної інфекції: 1 – зерниста дистрофія панкреатоцитів; 2 – зерниста дистрофія та руйнування клітин всіх типів панкреатичного острівця. Гематоксилін та еозин. $\times 100$

Дослідження імунобіологічних властивостей польових ізолятів парвовірусу та коронавірусу собак на гетерологічних культурах клітин. Дослідження на виявлення моноінфекції парвовірусом та коронавірусом проводили шляхом ІХА (тест смужки), використовуючи діагностичні тест-системи *VetExpert* (CAV Ag, CDV Ag, CPV/CCV Ag та Rota Ag).

Експериментальний зразок парвовірусу був отриманий від безпородної собаки у термінальній стадії розвитку парвовірозу (лікування було неефективним, тому довелось провести евтаназію). Під час патологоанатомічного розтину трупа відбирали фрагменти тонкого кишечника (довжиною $5,0 \pm 1,0$ см) з його умістом. Патологічний матеріал поміщали у окремий стерильний пластиковий посуд із стерильним 0,85 % розчином хлориду натрію і наступним поступовим глибоким його заморожуванням.

Коронавірус був виділений від собаки породи французький бульдог віком 8 місяців. Від тварини відібрали ректальний змив, відповідно до правил відбору подібного патологічного матеріалу, піддавали необхідним антимікробним обробкам,

згідно із правилами таких маніпуляцій. Після необхідного комплексу підготовчих робіт, отриманий вірусомісний біоматеріал використовували для вірусологічних досліджень. Інкубацію вірусів на культурах клітин проводили не більше 10 діб за $t^{\circ} +37,5^{\circ}\text{C}$, контролюючи стан моношару клітин кожні 24 год під мікроскопом за малих збільшень ($\times 56$).

Виділення парвовірусного та коронавірусного польового ізоляту проводили шляхом культивування на культурах клітин. У результаті експерименту було встановлено, що найбільш чутливою лінією культур клітин для культивування польового ізоляту парвовірусу була нирка кроля (РК) (рис. 6).

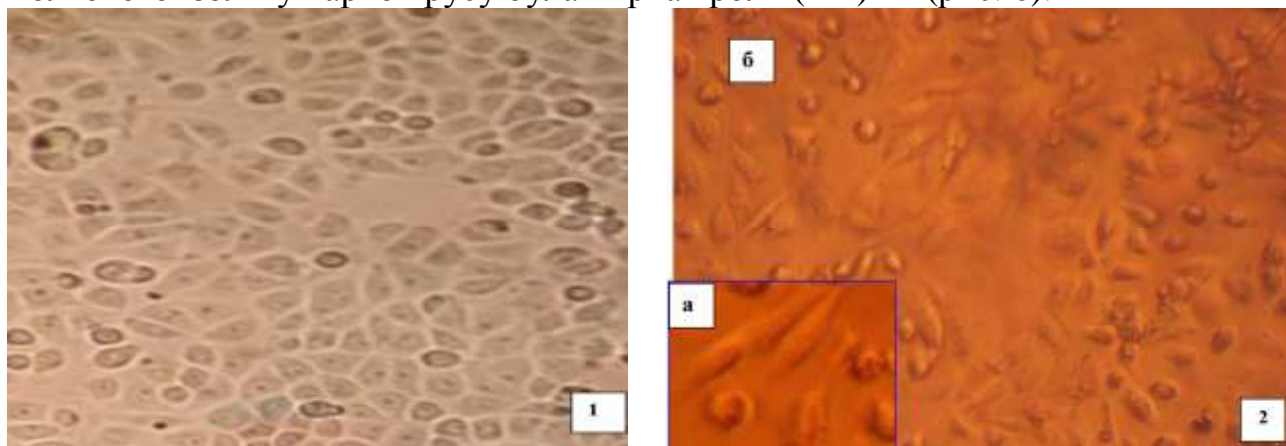


Рис. 6. Цитопатогенний вплив польового штаму парвовірусу на гетерологічну перещеплювальну культуру клітин РК ($\times 56$): 1 – стан культури клітин РК, 12 год після пересіву; 2 – прояв ЦПД у вигляді зморщення і набухання клітин (а) та руйнації цілісності моношару (б) – 48–72 год після зараження

Цитопатогенна дія парвовірусу проявлялася в такій послідовності: пригнічення процесів ділення клітин, часткове їх зморщення та затемнення у вигляді аглютинації клітин. Згодом розвивались класичні зміни, а саме: деструкція клітин шляхом їх витягування і набування форм «зірки», за чим слідував розрив стінки клітини з повною руйнацією моношару на 7-8 добу (рис. 6).

Чутливість клітинних ліній визначали не тільки за проявом ЦПД вірусу, а й за рівнем накопичення вірусу в клітинній суспензії. Титр інфекційної активності матеріалу визначали за методом Ріда і Менча, який на початку експерименту становив у середньому $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, після третього пасажу – до $2,7 \pm 0,06 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, а після п'ятого – збільшився до $3,8 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

Найбільш чутливою лінією культур клітин для культивування польового ізоляту коронавірусу собак була нирка хом'яка (ВНК-21), де первинну цитопатогенну дію фіксували через 48 год, а на 5–6 добу повну руйнацію моношару (рис. 7).

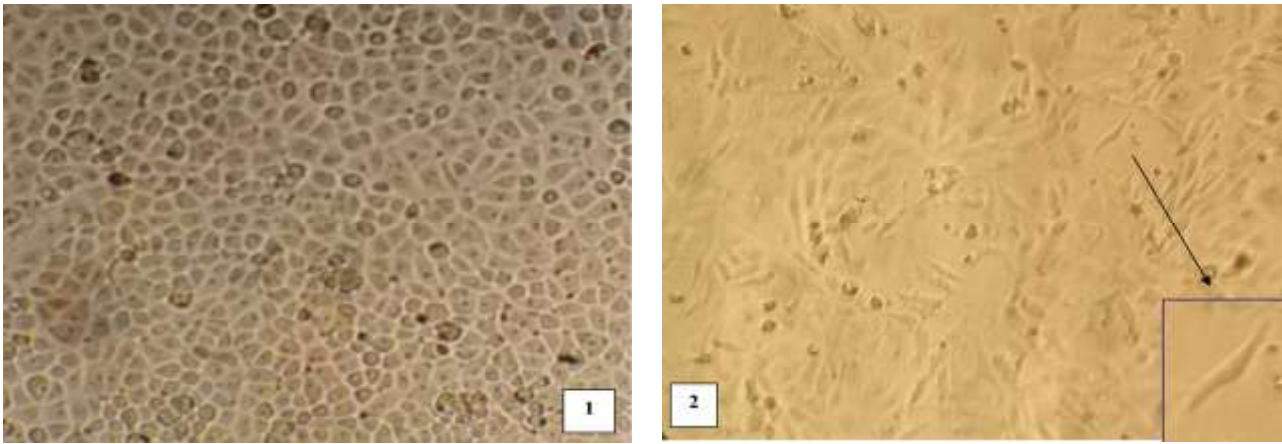


Рис. 7. – Цитопатогенний вплив польового штаму коронавірус на гетерологічну перещеплювальну культуру клітин ВНК-21 (×56): 1. – стан культури клітин ВНК-21, 12 год після пересіву; 2. – Прояв ЦПД через 36–48 год після зараження

За інкубації коронавірусу собак на перещеплювальних лініях культур клітин ВНК-21 інфекційний титр становив у середньому від $1,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ (перший пасаж), до $3,7 \pm 0,03 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ (третій), а після п'ятого пасажу – до $4,8 \pm 0,04 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

Експериментальне відтворення ПВЕ і КВЕ у собак та мікробіологічний контроль. Для вивчення патоморфологічних особливостей та специфіки патогенезу за парвовірусної і коронавірусної інфекції проведено експериментальне їх відтворення. Для інфікування були використані власне отриманий польовий штам парвовірусу та коронавірусу після депонування у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів, де пройшов процес реєстрації (коронавірус), наказ № 66 від 17. 12. 2018 під назвою «Nick» і (парвовірус) під назвою «Антей». Для виключення впливу на дослід паразитарного агента на 21 та 34 добу від народження собакам для дегельмінтизації застосовували антигельмінтик, у формі суспензії, на основі пірантелу.

У 45-добовому віці цуценят вагою $3,0 \pm 0,12 \text{ кг}$ відлучили від суки і розділені на три групи: перша (5 цуценят використовували для зараження культуральним парвовірусом); друга (5 цуценят заражали культуральним коронавірусом); третя (3 цуценят використовували для виявлення спонтанного виникнення хвороби на випадок інфікування до початку експерименту). Для експериментального відтворення інфекції було проведено інфікування дослідних тварин *per os* один раз на добу в дозі 5 мл/кг.

Перші загальні симптоми ПВЕ спостерігали на 4 добу, а початок специфічних клінічних ознак виявляли вже на шосту. Першими візуальними проявами були: погіршення апетиту, тварини забивались у темний куток і тиснулись одна до одної. Фекалії мали кашоподібну консистенцію з фрагментами слизу, через добу виявляли геморагічні тяжі. Проявлялась нечітко виражена блювота, блідість слизових оболонок.

За експериментального відтворення КВЕ перші загальні симптоми спостерігали на 6–7 добу, а початок специфічних клінічних ознак виявляли на 8–9 добу.

Після позитивного результату діагностики у ІХА (тест-системи *VetExpert* на наявність антигену) проводили активну евтаназію, використовуючи внутрішньовенне введення препарату Тіопенат (діюча речовина – тіопентал натрію в

дозі 60 мг / кг маси тіла в 1 г порошку якого міститься тіопентал натрію – 950 мг). Відповідно до Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин, що використовують для експериментальних та інших наукових цілей.

Мікрофлора собак, експериментально уражених парво- і коронавірусом

Для підтвердження «чистоти» експерименту щодо відтворення ПВЕ і КВЕ, вивчали мікробний пейзаж кишечника дослідних тварин.

За експериментального відтворення парвовірусної інфекції представників патогенної мікрофлори виділено не було. За парвовірозу в мікробному пейзажі більшість складають бактеріальні асоціації 88 %, меншість 12 % – бактеріально-грибкові асоціації. За експериментального відтворення коронавірусної інфекції у складі бактеріальних асоціацій переважають представники індигенної мікрофлори, патогенів не виявляли. За ознаками таксономічної належності мікроорганізмів до різних груп більшість асоціацій були представлені бактеріями (90 %) і бактеріально-грибковими асоціаціями (10 %).

Патоморфологічні особливості за експериментальної парвовірусної інфекції. У цуценят, які були експериментально заражені ізолятом парвовіруса, культивованим у гетерологічній культурі клітин, основні макроскопічні зміни локалізувались у тонкій кишці. Проте геморагічний ентерит, типовий для спонтанної парвовірусної інфекції, не реєструвався. Натомість зовні тонка кишка була нерівномірно гіперемійована, місцями розширена. Слизова оболонка почервоніла, тьмяна, набрякла, з дрібними крапковими крововиливами. Кровоносні судини брижі та кишкової стінки були виразно розширені та переповнені кров'ю. По всій своїй довжині тонка кишка містила досить велику кількість рідини блідо рожевого кольору зі значними домішками слизу. Підшлункова залоза була сильно гіперемійована й набрякла, внаслідок чого добре виявлялась часточковість її будови.

Гістологічними дослідженнями встановлено, що на розтягнутих ділянках тонкої кишки ворсинки були викривлені та нерідко деформовані, внаслідок виразного набряку їх строми та субепітеліального набряку. У частині ядер ентероцитів виявлялися еозинофільні тільця-включення різних розмірів і форми. На інших ділянках реєстрували відсутність епітеліоцитів на апікальній частині ворсинок та їх часткове руйнування, яке найбільш виражене у ділянці верхівок. У цих місцях виявляли залишки зруйнованої строми, значні пласти їх епітелію і хаотичні скупчення епітеліальних клітин, з частково чи повністю зруйнованою цитоплазмою, але досить добре збереженими ядрами. У ядрах епітеліоцитів реєструвались еозинофільні тільця-включення, частина ядер була переважно еозинофільна. Такі тільця-включення є місцем скупчення вірусних частинок або їх білків (рис. 8).

Оскільки, як зазначалося вище, маркером наявності парвовірусу в ядрах уражених клітин є утворення внутрішньоядерних еозинофільних тілець-включень, можна зробити висновок, що у цуценят, експериментально заражених ізолятом парвовірусу, культивованим у гетерологічній культурі клітин, скупчення збудника знаходились в ядрах ентероцитів ворсинок.

Гістохімічно виявляли гіперплазію келихоподібних клітин крипт й виснаження функціонально активних клітин. Так, переважна більшість ентероцитів у криптах і ворсинках інтенсивно виділяла надзвичайно велику кількість секрету. Лише поодинокі келихоподібні клітини функціонували з меншою активністю, внаслідок

чого секрет досить рівномірно розтікався по поверхні сусідніх ентероцитів, за зразком здорової кишки.

У експериментально інфікованих цуценят також встановлено порушення гістохімічного складу секрету в келихоподібних клітинах крипт. Цей секрет, у переважній більшості таких клітин, нерівномірно зафарбовувався альціановим синім за рН 2,5 і 1,0. Тобто, в ентероцитах ворсинок і крипт тонкої кишки відбулося порушення синтезу протеогліканів різних груп (як із вмістом сіалової кислоти, так і з сульфатованими глікозаміногліканами).

Частина келихоподібних клітин, із невеликим вмістом секрету втрачала свою характерну природну форму. На нашу думку, це свідчило про певну ступінь функціонального виснаження таких одноклітинних залоз (рис. 9).

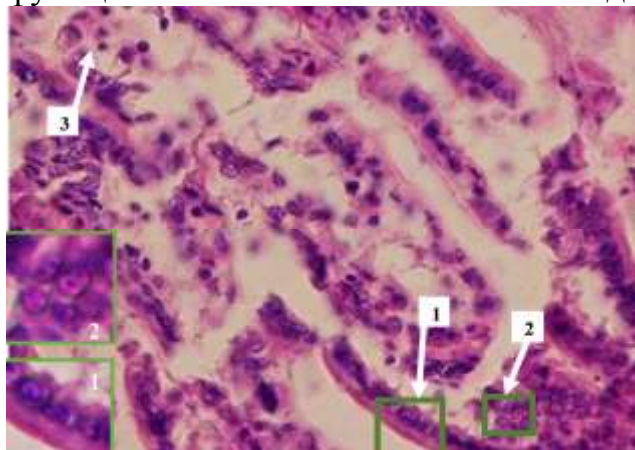


Рис. 8. Ділянка верхівок ворсинок дванадцятипалої кишки за експериментального зараження: 1 – еозинофільне ядро й еозинофільні тільця-включення в ядрі ентероцита в складі суцільного пласту епітелію; 2 – еозинофільне ядро й еозинофільні тільця-включення в ядрі клітин; 3 – зруйнована строма ворсинки. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

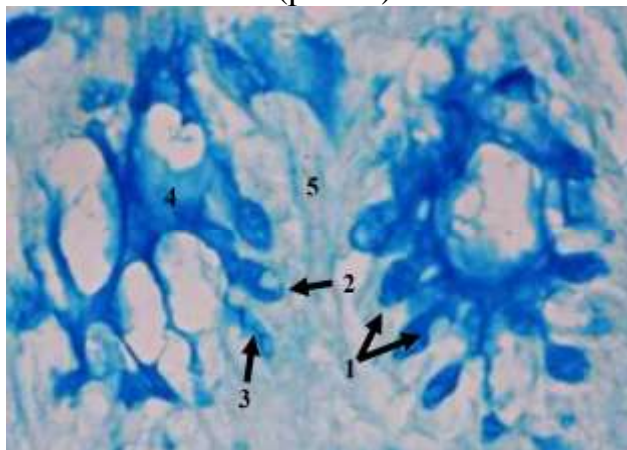


Рис. 9. Крипти клубової кишки за експериментального зараження: 1 – келихоподібні клітини в стані гіперергічної секреції; 2 – нерівномірне зафарбовування секрету келихоподібної клітини; 3 – «виснажена» келихоподібна клітина; 4 – секрет келихоподібних клітин у просвіті крипт; 5 – накопичення протеогліканів у стромі ворсинки. Альціановий синій рН 1,0. $\times 1000$

Наявність виразних мікроскопічних змін у м'язовій оболонці тонкої кишки встановлено на всіх її ділянках. Проте характер цих змін був неоднаковий. Він визначався не конкретним сегментом тонкої кишки, а залежав від її розтягненості. На ділянках, де тонка кишка не була розтягнена, реєструвалась зерниста дистрофія внутрішнього й зовнішнього шарів її м'язової оболонки.

Проведені гістохімічні дослідження виявили, що у цитоплазмі гладких м'язових клітин внутрішнього шару м'язової оболонки тонкої кишки, в стані скорочення, накопичувалась велика кількість кислих білків. У стані розслаблення переважали основні білки.

У ділянці дна крипт сліпої та ободової кишок при зруйнованій верхній частині крипт, велика кількість епітеліальних клітин перебувала у стані зернистої дистрофії

та містили внутрішньоядерні еозинофільні тільця-включення. Частина таких ядер була деформована, а самі клітини – зруйновані. Також у ділянці дна крипт реєструвався сильний субепітеліальний набряк (рис. 10).

Під час руйнування значної частини ентероцитів крипт вцілілі епітеліальні клітини витягувалися вздовж базальної мембрани, набуваючи плоскої форми. В епітеліоцитах крипт з мікроскопічними ознаками гідропічної дистрофії, зазвичай, з'являвся набряк ядра. Частина цих ядер була деформована, без ядерець. Руйнування клітин відбувалося внаслідок розриву апікальної частини оболонки клітини. Місцями спостерігали руйнування базальної мембрани епітелію крипт. На дні крипт, у яких зруйнувалась значна кількість ентероцитів, виявлялась велика кількість клітинного детриту (рис. 11). Крім того, було встановлено руйнування та некроз слизової оболонки тонкого відділу кишечника.

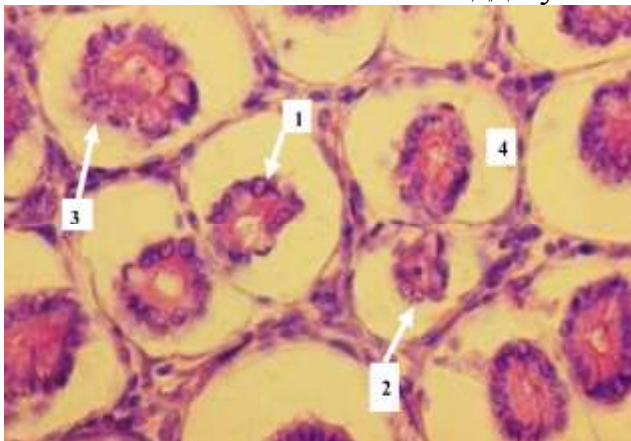


Рис. 10. Ділянка дна крипт сліпої кишки за експериментального зараження: 1 – еозинофільне тільце-включення в ядрі епітеліальної клітини; 2 – деформовані ядра епітеліоцитів з еозинофільними тільцями включеннями; 3 – зерниста дистрофія й руйнування епітеліальних клітин з еозинофільними тільцями-включеннями в їх ядрах; 4 – субепітеліальний набряк. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

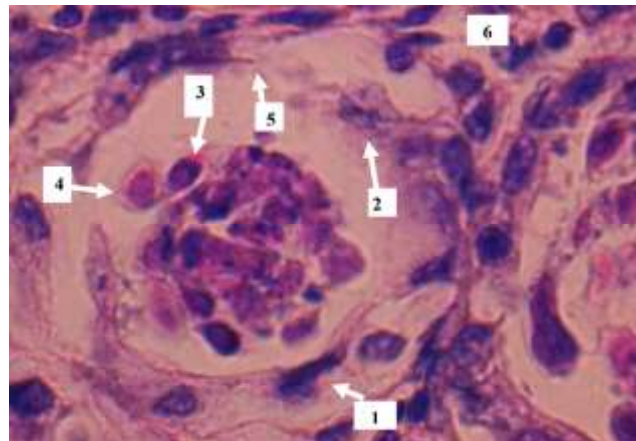


Рис. 11. Ділянка дна крипт сліпої кишки за експериментального зараження: 1 – плоский ентероцит; 2 – руйнування ентероциту; 3 – злуцений ентероцит з еозинофільним тільцем-включенням у ядрі; 4 – злуцений ентероцит з повністю еозинофільним ядром; 5 – руйнування базальної мембрани епітелію крипти; 6 – набряк слизової оболонки. Гематоксилін та еозин. $\times 1000$

За експериментального відтворення ПВЕ собак, у ядрах епітеліальних клітин крипт сліпої й ободової кишок також були знайдені еозинофільні тільця-включення. Натомість, мікроскопічні зміни в слизовій оболонці сліпої й ободової кишок за спонтанної кишкової форми парвовірусної інфекції, кардинально відрізнялися від експериментального перебігу хвороби. Так слизова оболонка була нерівномірно інфільтрована лімфоцитами, малою кількістю моноцитів та поодинокими нейтрофілами й еозинофілами. При цьому, на окремих ділянках сліпої й ободової кишок, така інфільтрація була майже відсутня. Просвіти багатьох крипт були розширені. Реєструвалась гіперплазія келихоподібних клітин, гіпертрофія частини з

них та гіперсекреція слизу, який не лише вкривав поверхню епітелію слизової оболонки, але й у великій кількості знаходився в просвіті багатьох крипт.

Мікроскопічні та гістохімічні зміни поодиноких і скупчених лімфоїдних вузликів, м'язової та серозної оболонок у ділянках виразного руйнування крипт сліпої й ободової кишок були аналогічні змінам, виявленим у тонкій кишці.

За експериментального парвовірусу у собак печінка була помірно набрякла. На частині ділянок внутрішньочасточкові капіляри були розширені й переповнені кров'ю. Печінкові тріади – виразно набряклі, їх вени – розширені й переповнені кров'ю. В частині вен виявлялися лімфоцити з внутрішньоядерними еозинофільними тільцями-включеннями. Артерії печінкових тріад не містили клітин крові. Пухка волокниста сполучна тканина в усіх тріадах була набрякла (рис. 12).

У ниркових тільцях встановлено наростання набряку судинних тріад та руйнування подоцитів, яке призводить до значного підвищення проникливості фільтраційного бар'єру нирок. Вже на цій стадії в частині ниркових тілець відбувалось руйнування парієнтального листка їх капсули, а у подальшому – фрагментація клубочка. Такі зміни супроводжувались накопиченням у порожнині капсули фільтрату, що призводило до збільшення розміру ниркових тілець. Значне порушення фільтраційного бар'єру нирок супроводжувалось виходом у порожнину капсули еозинофільних білків (рис. 13).

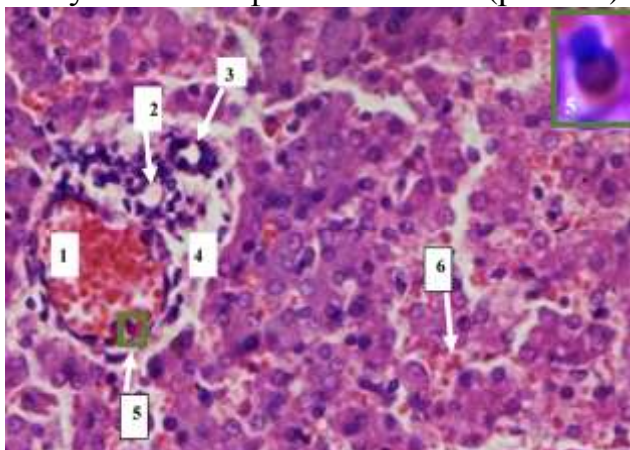


Рис. 12. Мікроструктура печінки за експериментального зараження: 1 – розширена, переповнена кров'ю вена печінкової тріади; 2 – артерія печінкової тріади; 3 – жовчна протока; 4 – набряк сполучної тканини печінкової тріади; 5 – лімфоцит з еозинофільним внутрішньоядерним тільцем-включенням у просвіті вени печінкової тріади; 6 – еритроцити в розширеному внутрішньочасточковому капілярі. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

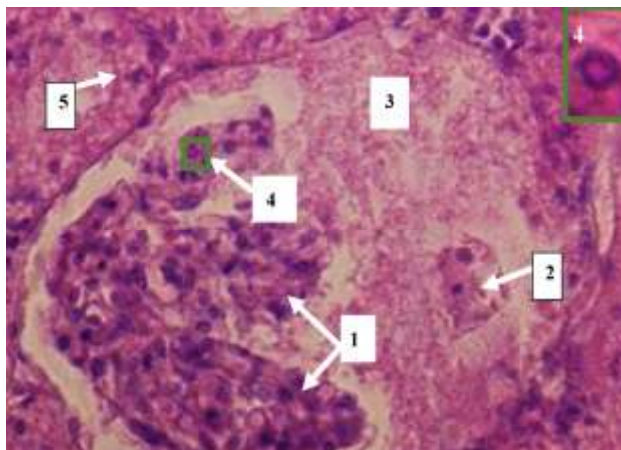


Рис. 13. Ниркове тільце за експериментального зараження: 1 – фрагментація клубочка; 2 – фрагмент клубочка в стані некрозу та руйнування; 3 – білковий компонент; 4 – мезангіоцит з еозинофільним внутрішньоядерним тільцем-включенням; 5 – частковий лізис цитоплазми клітин епітелію звивистого каналця. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

В ядрах частини мезангіоцитів багатьох ниркових тілець виявлялись еозинофільні тільця-включення. На нашу думку, це свідчить про можливість реплікації парвовірусу собак у нирках *in vivo*. Враховуючи одержані результати та раніше відомі факти, можна стверджувати, що парвовірус собак, культивований в гетерологічній культурі клітин або набуває здатності більш повільно розмножуватись в клітинах, внаслідок чого уражені клітини крипт встигали переміщуватися аж на верхівки ворсинок, або (що менш ймовірно) використовує для своєї реплікації якісь інші клітинні механізми.

Патоморфологічні особливості за експериментальної коронавірусної інфекції. Макроскопічні зміни в органах цуценят, експериментально інфікованих ізолятом коронавірусу, культивованим у гетерологічній культурі клітин, були подібними, хоча й мали незначні індивідуальні особливості щодо ступеня їх прояву.

Основні макроскопічні зміни локалізувалися в тонкій кишці. Її стінка була дещо гіперемійована. Кровоносні судини брижі розширені, кровонаповнені, а лімфатичні судини – розширені й переповнені лімфою. Слизова оболонка – набрякла, незначно гіперемійована, вкрита густим, білим слизом. Тимус був в'ялої консистенції, набряклий, нерівномірно гіперемійований.

Мікроскопічні зміни ворсинок на різних відділах тонкої кишки відрізнялись між собою. На більшості ділянок дванадцятипалої, порожньої та клубової кишок ворсинки були частково або повністю зруйновані, внаслідок чого в слизовій оболонці могли виявлятися тільки їх залишки (рис. 14). Тут також реєстрували некроз верхньої частини ворсинок та виявляли невелику кількість невикорочених ворсинок зі збереженим епітелієм (рис. 15). На ділянках порожньої кишки, де помітно більш виразне руйнування ворсинок, у криптах спостерігали зернисту дистрофію ентероцитів, виразний субепітеліальний набряк та руйнування частини епітеліальних клітин (рис. 16).

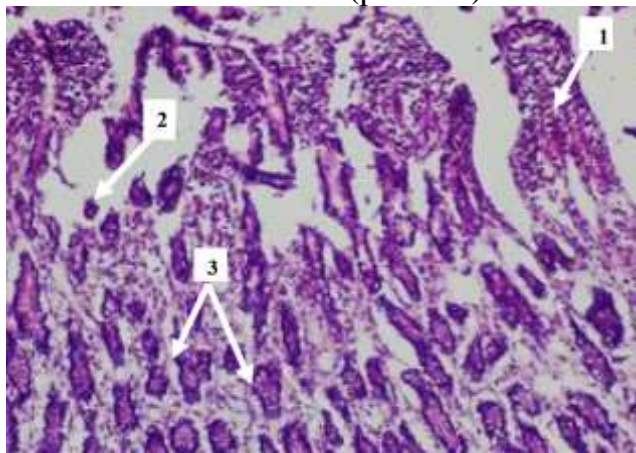


Рис. 14. **Фрагмент клубової кишки за експериментального зараження:** 1 – злипання залишків ворсинок слизової оболонки; 2 – відсутність ворсинок; 3 – крипти. Гематоксилін та еозин. × 100

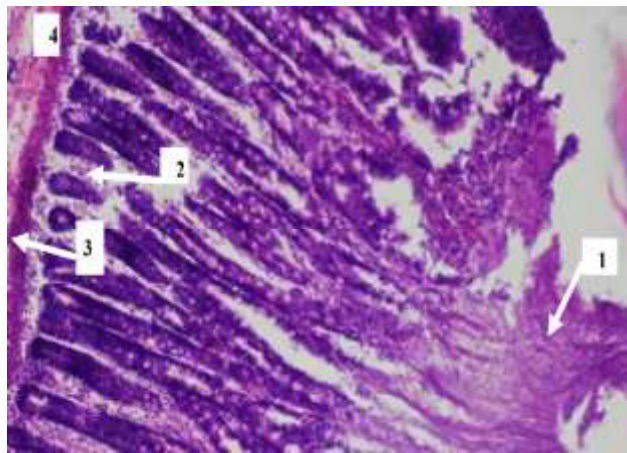


Рис. 15. **Фрагмент дванадцятипалої кишки за експериментального зараження:** 1 – некроз верхівок ворсинок; 2 – набряк у ділянці крипт; 3 – зерниста дистрофія клітин м'язової пластинки; 4 – набряк підслизової основи. Гематоксилін та еозин. × 100

У клубовій кишці мали місце гіперплазія та гіпертрофія поодиноких і скупчених лімфоїдних вузликів. Хоча розміри цих вузликів, порівняно з аналогічними утвореннями у контрольних собак, були збільшені, лімфоцити в них розташовувались розріджено.

Мікроскопічні зміни м'язової оболонки тонкої кишки також були однаковими в усіх відділах. Ці зміни були менш виражені у цуценят за спонтанного інфікування парвовірусом, ніж у тварин, інфікованих експериментально.

Мікроскопічна будова капсули печінки та міжчасточкової сполучної тканини у цуценят за експериментального коронавірусу була не змінена. Проте орган був нерівномірно дифузно набряклий, а центральні вени переважної більшості печінкових часточок – досить розширені. Більша частина гепатоцитів знаходилась у стані зернистої дистрофії. Певна кількість печінкових клітин перебувала в стані гідропічної дистрофії, при якій в цитоплазмі утворювались вакуолі різних розмірів і форми, котрі не зафарбовувались еозином. Кількість і розміри таких вакуолей в клітинах була неоднакова, а в окремих гепатоцитах був знайдений повний плазмоліз. Частина дистрофічно змінених гепатоцитів перебувала на різних стадіях руйнування (рис. 17). Зміни з боку Купферовських клітин (у т. ч. гіпертрофія/гіперплазія), як і в випадку парвовірусної інфекції, встановлені не були.

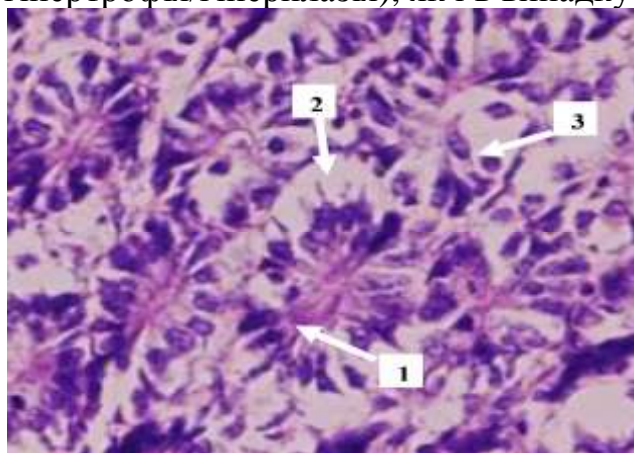


Рис. 16. Крипти порожньої кишки за експериментального зараження: 1 – зерниста дистрофія ентероцитів крипт; 2 – субепітеліальний набряк; 3 – руйнування ентероцитів крипт. Гематоксилін та еозин. $\times 1000$

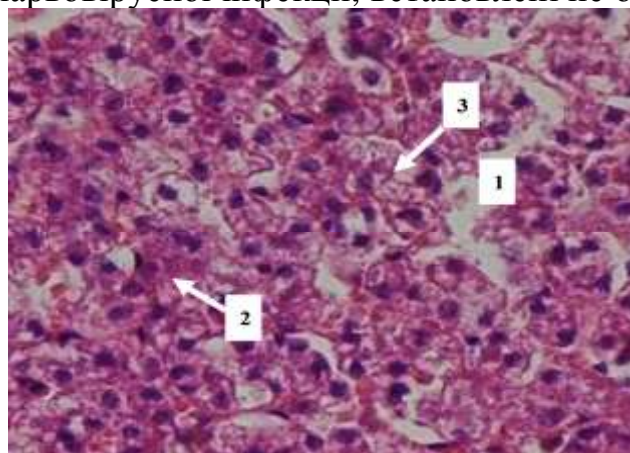


Рис. 17. Мікроструктура печінки за експериментального зараження: 1 – набряк; 2 – зерниста дистрофія гепатоцитів; 3 – гідропічна дистрофія гепатоцитів. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

Дослідження показників клітинного і гуморального імунітету собак після вакцинації.

За інтерпретації імунологічних показників собак після вакцинації встановлено пригнічення клітинної ланки імунітету після введення вакцини, з поступовим відновленням і стабілізацією, через 21 добу ($P < 0,001$), після імунізації показників імунної відповіді. Через пів року після вакцинації спостерігали стабілізацію показників імунітету, більшість показників імунного статусу були на рівні з референтними показниками, і лише незначне зменшення кількості лімфоцитів Т-хелперів і Т-супресорів. Показники напруженості імунітету у собак, через 18–20

місяців вдвічі нижче ($P < 0,001$) за фізіологічний ліміт, що свідчать про низький захисний рівень, і передбачає його стабілізацію шляхом бустер імунізації.

Вивчали також рівень напруженості імунітету у дорослих собак після вакцинації, а саме, чітко відображену, імунну відповідь у зростанні *Ig G* на 14 добу – $302,4 \pm 18,2$ і 21 добу – $340,1 \pm 22,3$ Од/мл після вакцинації. У собак через 4 місяці після вакцинації цей показник становив $41,1 \pm 3,3$, а через 6 місяців – $24,2 \pm 2,4$ Од/мл відповідно. Слід зазначити, що концентрація поствакцинальних антитіл, через 7–8 місяців після вакцинації, є на досить низькому рівні і передбачає відновлення. (Рис. 18).

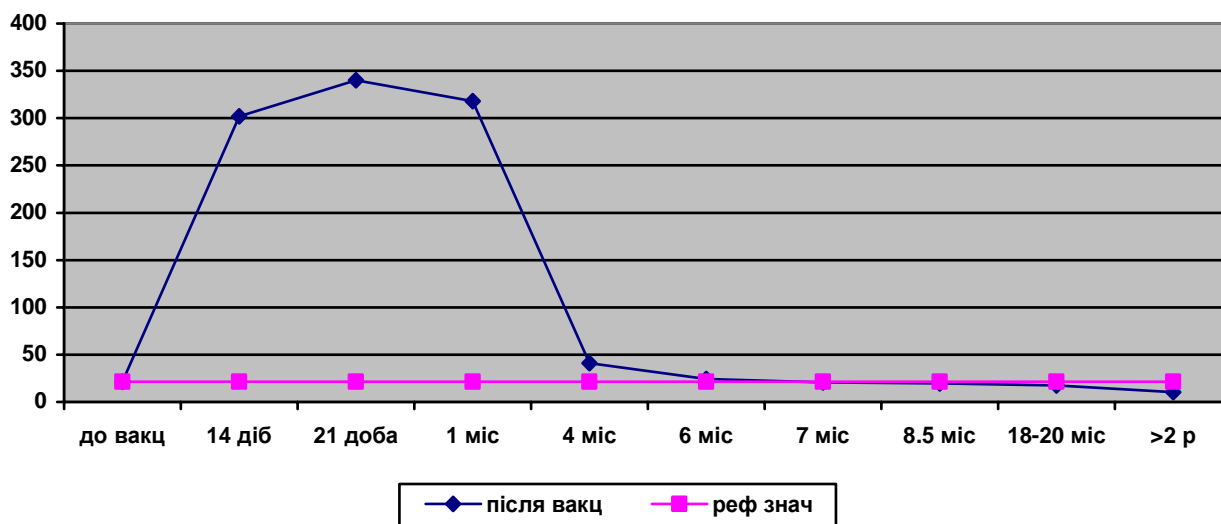


Рис. 18. Динаміка показників *Ig G* до парвовірусної інфекції у собак після вакцинації

Встановлено роль трансплацентарної передачі антитіл від сук до їх цуценят після народження і доцільність бустер імунізації під час щенності. Для дослідження була сформована група собак породи Лабрадор та Німецька вівчарка віком від 3 до 4 років, яких регулярно, не порушуючи схеми, вакцинували. Остання вакцинація була проведена на 20–23 добу щенності. Для оцінки функціонального стану гуморальної ланки імунітету цуценят, отриманих від сук, вакцинованих під час щенності, визначали вміст імуноглобуліну класу *G* до парвовірусу в сироватках крові за допомогою ІФА. Біологічний матеріал у цуценят відбирали на 45 добу життя. Було встановлено, що материнські антитіла передаються трансплацентарно в межах від 6,7 до 8,2 % відповідно.

Розроблення технології отримання специфічних *Ig G* до парвовірусу собак. З 1080 собак до року, яким проводили вакцинацію, поствакцинальні ускладнення було виявлено у 26 тварин. Залежно від типу вакцини показник ускладнень (розвиток клінічних ознак ПВЕ) знаходився в межах від 0,34 до 5 %.

Ми провели дослідження пов'язані з одержанням, очисткою і концентрацією *Ig G* із сироватки крові собак, гіперімунізованих проти вірусних хвороб (аденовірус двох типів, парвовірус, коронавірус та пароміксовірус) шляхом афінної хроматографії. Результат – отримання очищених антитіл у високій концентрації, які проявляли стабільність за тривалого зберігання (рис. 19). Виділений *Ig G* придатний для удосконалення діагностики та як препарат специфічної терапії. У разі

застосування останнього собакам, не виявлено алергічних, токсичних або інших негативних наслідків, тварини були клінічно здорові.

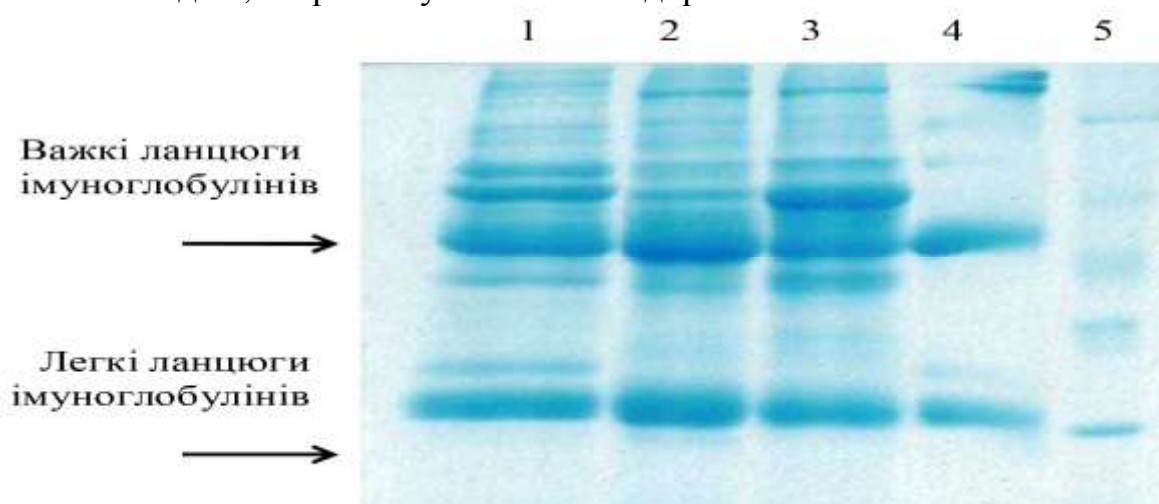


Рис. 19. Електрофореграма фракцій антитіл очищених на біоафінному сорбенті: 1 – фракція *Ig G* собаки, отримана шляхом висолювання сульфатом амонію; 2 – лікувальний глобулін глобакан – 5; 3 – полівалентна сироватка гіскан – 5; 4 – фракція *Ig G* собаки, отримана шляхом очищення на сорбенті з іммобілізовим білком А *Staphylococcus aureus*; 5 – білки-маркери молекулярної маси

Концентрування сульфатом амонію збільшує вміст *Ig G* у середньому на 30 % (табл. 1), при цьому значним є рівень насиченості різноманітними білковими фракціями (рис. 19).

Таблиця 1

Вміст *Ig G* в дослідному матеріалі

Нативний зразок (сироватка), Од/мл	Після концентрування сульфатом амонію (сироватка), Од/мл	Очищення на афінному сорбенті, Од/мл	Повторне концентрування сульфатом амонію, Од/мл
24,22	29,699	-	-
15,262	21,468	11,855	69,954
16,150	22,771		
16,475	23,529	10,949	65,256
14,388	19,550		

Очищення афінним сорбентом дає позитивний результат очистки сягав 90 %, але низький вміст *Ig G* у межах 11 Од/мл. Надалі дослідну очищену сироватку повторно концентрували сульфатом амонію, що забезпечило зростання вмісту *Ig G* майже в 4 рази, порівняно з початковою пробою, і до 3 разів, порівняно з першим концентруванням. Таким чином, було отримано високоочищену, сконцентровану пробу сироватки з *Ig G*.

Важливо зазначити, що дослідний імуноглобулін, перш за все, отримано від гомогенних тварин. Це знизило розвиток імуного конфлікту, який спостерігався у разі використання комерційних сироваток та імуноглобулінів, отриманих від

великої рогатої худоби і коней. По-друге, рівень очистки становить 90 %, тоді як у існуючих комерційних біопрепаратів у межах 70 %.

Удосконалення схеми специфічного лікування. Для удосконалення лікування парвовірусної інфекції експериментально створено специфічний імуноглобулін *Ig G* шляхом афінної хроматографії з використанням сорбентів на основі іммобілізованих імуноглобулінозв'язувальних білків, зокрема, рекомбінантного білка А *Staphylococcus aureus*. З цією метою була використана сироватка собак на 21 добу після вакцинації і на основі методики сорбції та концентрування отриманий високоочищений концентрований імуноглобулін – КПВІ (концентрований противірусний імуноглобулін). Клінічними дослідженнями встановлено його безпечність та нетоксичність. Експериментальні клінічні дослідження проводили на цільових тваринах – собаках (n=10) породи Лабрадор та Німецька вівчарка віком від 3 до 5 років яким вводили КПВІ в дозі 2,0 см³, з повторним введенням через 24 години. Впродовж усього часу, 21 доби, тварини перебували під постійним наглядом, який включав огляд та термометрію. У жодної з дослідних собак не було виявлено хоча б мінімальних відхилень від фізіологічного стану. Високий рівень стабільності – не менше 6 місяців, яку визначали шляхом довготривалого зберігання за різних температурних режимів органолептичного контролю. Так концентрацію імуноглобуліну класу G у початковому зразку за t= +4 °C становила 825,1±14,2, через 6 місяців 682,9±12,3 Од/мл, а за t= -24 °C – 775,81±12,7 Од/мл.

Розробка тест-системи полімеразно-ланцюгової реакції для діагностики парвовірусу, отриманого з гетерологічних перещеплювальних ліній культур клітин. Розробку специфічних праймерів для виявлення парвовірусу собак на основі ПЛР проводили за використання бази даних *GenBank*, *EMBL* (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека).

Аналіз літературних джерел дозволив визначити кілька маркерних послідовностей: «SET1 та SET2», що придатні для розробки специфічних праймерів.

Нуклеотидну послідовність праймерів для виявлення парвовірусу собак підібрано із використанням програми *Primer Express (Applied Biosystems)* (табл. 2). Олігонуклеотидні праймери синтезували на виробничих потужностях *HVD Biotech Vertriebs (Австрія)*.

Таблиця 2

Послідовності олігонуклеотидних праймерів до парвовірусу собак «Антей»

SET1- FORWARD (CPVF)	5'- tctttgcctcaatctgaagg -3'
SET1- REVERSE (CPVR)	5'- cagtaatatagtttgtatttcc -3'
PROBE	5'-agacgtggtgtaactcaaatg-3'
SET2- FORWARD (CPVF)	5'- gcatttggtagacaacatgg -3'
SET2- REVERSE (CPVR)	5'- ttgaatccaatctccttctgg -3'
PROBE	5'- gcacatcaagatacaggaag-3'

Отриманий культуральний парвовірус проявляв неспецифічну реакцію у ході діагностичного дослідження у стандартному ПЛР (рис. 20). Було проведено підбір

праймерів і корекцію режимів реакції, що розширило можливості діагностики парвовірусної інфекції у собак.

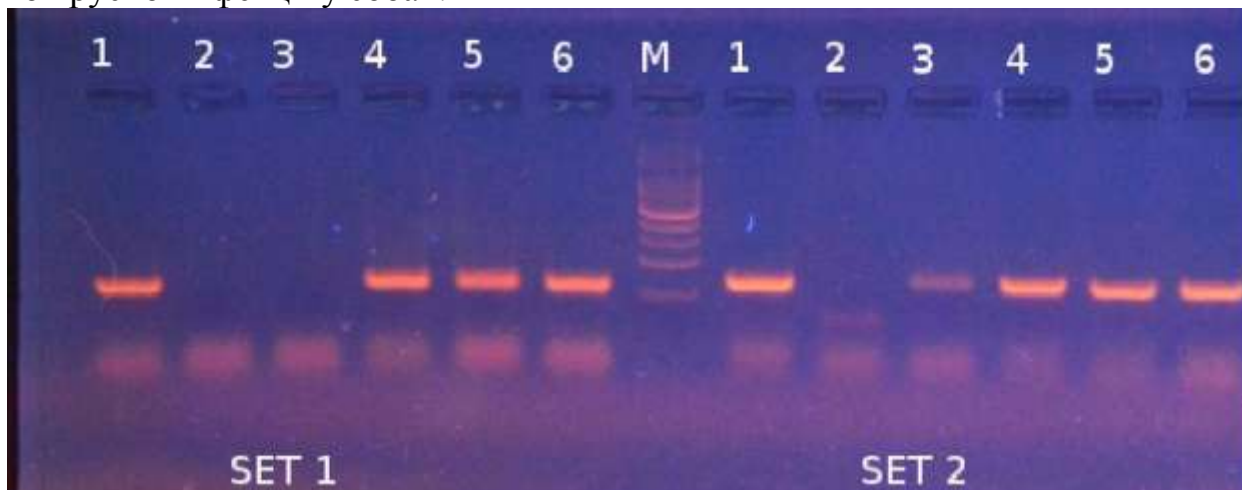


Рис. 20. **Результати апробації ПЛР:** 1 – початковий зразок для зараження перещеплювальних ліній культур клітин і накопичення культуральної вірусної маси; 2 – вірусний ізолят на культурі клітин СПЕВ; 3 – вірусний ізолят на культурі клітин ВНК-21; 4 – вірусний ізолят на культурі клітин RK13; 5 – зразок отриманий від тварин після експериментального відтворення ПВІ; 6 – збірна проба після концентрування зворотним діалізом 1:10; М – маркер молекулярних мас *100 bp DNA Ladder*

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, із застосуванням комплексних методів досліджень, з'ясовано біологічні властивості парво- та коронавірусів собак, а саме: виявлена придатність їх культивування на гетерологічних перещеплювальних лініях культур клітин з можливістю накопичення вірусної біомаси для відтворення експериментальної інфекції в інтактних цуценят з метою детального і поглибленого обґрунтування патогенезу вірусних ентеритів, їх своєчасної диференційної діагностики, ефективного лікування та специфічної профілактики.

Встановлено епізоотологічні, гематологічні, біохімічні, імунологічні та патоморфологічні особливості парво- й коронавірусної інфекції; запропоновані схеми удосконалення методів діагностики та лікувально-профілактичних заходів.

1. Нозологічний профіль заразних хвороб (87 % патологій) собак з діарейним симптомокомплексом у м. Житомир формується із 10 нозоодиниць. Частка парвовірусної інфекції у заразній патології складає 13,6, а коронавірусної – 5,8 %. Найчастіше парвовіроз у собак виявляють у літньо-осінній період за домінуючою схильністю порід.

2. Ентеритам вірусної етіології притаманний складний патогенез хвороби, розвиток якого залежить від прояву гематологічних змін:

– за змішаної форми парвовірусної інфекції виявляли еритропенію на 10 % ($P < 0,01$), лейкопенію на 35 % ($P < 0,001$) та лімфопенію на 40 % ($P < 0,001$), зниженням гематокритної величини на 2,5 %, збільшення кількості тромбоцитів на 40 % ($P < 0,05$), збільшення *MCH* на 15 % ($P < 0,05$), зменшення рівня загального білка на 30 % ($P < 0,001$) та альбумінів на 40 % ($P < 0,001$), збільшення вмісту білірубину

($P < 0,01$), гіперферментацію лужної фосфатази ($P < 0,001$) та збільшення коефіцієнта де Рітіса $P < 0,05$ і гіперферментацію АсАТ на 20 % ($P < 0,05$);

– за кардіальної форми прояву парвовірусної інфекції у собак встановлено зниження кількості лімфоцитів у 3 рази ($P < 0,001$) та вмісту загального білка – на 30 % ($P < 0,001$), збільшення кількості моноцитів на 40 % ($P < 0,05$), гіперферментацію АсАТ ($P < 0,001$) у 2,8 рази і збільшення коефіцієнта де Рітіса на 30 % ($P < 0,05$), показників еритропоезу, а саме *МСН* – на 5 %, *МСV* – на 7 % та *МСНС* – на 3 %;

– за кишкової форми прояву парвовірусного ентериту у хворих собак виявляли зниження кількості еритроцитів і лейкоцитів на 15 %, вмісту загального білка на 29 % ($P < 0,001$), рівня креатиніну ($P < 0,001$) та зменшення коефіцієнта де Рітіса ($P < 0,001$), при цьому встановлено збільшення ШОЕ ($P < 0,05$) та гіперферментацію АлАТ ($P < 0,001$);

– коронавірусний ентерит характеризується зменшенням гематокритної величини на 20 %, еритропенією на 15 %, збільшенням кількості тромбоцитів на 35 % ($P < 0,05$), *МСНС* на 5 %, лейкопенією та лімфопенією у 2 рази ($P < 0,001$), збільшенням вмісту білірубіну ($P < 0,05$), зменшенням рівня загального білка на 40 % ($P < 0,05$), альбумінів у 3 рази ($P < 0,001$) та білкового коефіцієнта ($P < 0,01$), зниженням коефіцієнта де Рітіса ($P < 0,05$) і вмісту сечовини на 20 % ($P < 0,05$), гіперферментацією лужної фосфатази удвічі ($P < 0,001$), порівняно з фізіологічним лімітом;

– аналіз результатів індексів морфологічних показників еритроцитопоезу свідчить про розвиток нормоцитарної та макроцитарної анемії за КВЕ і за ПВЕ відповідно.

3. У собак за парвовірусної інфекції відбуваються порушення в системі лейкоцитопоезу, що проявляється лейкопенією, еозинофілією, базофілією, збільшенням молодих клітин нейтрофільного ряду, зсувом ядра вліво, що свідчить про розвиток поліорганної патології: гепаторенальний синдром, панкреатит, розлади роботи шлунково-кишкового тракту, деградація клітин і тканин, а також ендогенна інтоксикація, що спричинює ураження імунної системи.

4. Враховуючи показники інтегральних гематологічних індексів за коронавірусної інфекції, встановили інтоксикацію, дефіцит цитокінів та нестачу блокторів запалення, несприятливу динаміку імунних реакцій, а саме домінування клітинної системи імунітету з порушенням взаємодії ефекторних і афекторних ланок імунної відповіді.

5. За ентеритів вірусної етіології у собак визначено достовірне зменшення кількості Т-лімфоцитів (за ПВІ – на 37 % ($P < 0,001$), а за КВІ – на 15 % ($P < 0,01$)) та зниження кількості антиген презентуючих клітин – В-лімфоцитів (за ПВІ на 25 % ($P < 0,001$), а за КВІ на 35 %), що означає ослаблення імунної відповіді і розвиток імуносупресії.

6. Встановлено, що для польового ізоляту парвовірусу найбільш чутливою є перещеплювальна лінія культури клітин РК-13. Після адаптації вірусу цитопатогенну дію спостерігали через 72 години інкубації, повну руйнацію моношару спостерігали на 7–8 добу. Титр інфекційної активності зростав з кожним новим пасажем і до п'ятого становив $3,8 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$. До польового ізоляту коронавірусу собак найбільш чутливими є лінії перещеплювальних культур клітин

ВНК-21: первинну цитопатогенну дію фіксували через 48 год, а на 5–6 добу повну руйнацію моношару. Титр інфекційної активності послідовно зростав і до п'ятого пасажу становив $4,8 \pm 0,04 \text{ Ig TЦД}_{50/\text{см}^3}$ відповідно. Експериментальне відтворення польового ізоляту парво- та коронавірусної інфекції у інтактних цуценят можливе за перорального способу введення культурального вірусомісного матеріалу з розрахунку 5 мл/кг маси тіла тварини.

7. Патологоанатомічні зміни за коронавірусного ентериту цуценят 45–55 добового віку характеризувались: катарально-десквативним ентеритом, застійною гіперемією та дистрофією печінки, панкреатитом, дилатацією правого шлуночка серця, застійною гіперемією та набряком легень. Мікроскопічно у дванадцятипалій, порожній та клубовій кишках запальний процес супроводжувався некрозом верхніх частин ворсинок і їх десквамацією.

8. Мікроскопічно в органах імуногенезу цуценят (за експериментального відтворення парвовірусного ентериту) виявлено: у тимусі – набряк, дезорганізацію тимічних тілець, порушення процесів диференціації лімфоцитів у кірковій та мозковій речовинах часточок; у селезінці – набряк, значні ділянки накопичення гемосидерину, як наслідок розпаду великої кількості еритроцитів.

9. У дослідних цуценят за парвовірозу мікроскопічно виявлено: в серці – дифузний набряк міжм'язової сполучної тканини, зерниста дистрофія кардіоміоцитів; у легнях – набряк, венозний застій; у тонкій кишці – дезорганізація та руйнування крипт, некроз і десквамацію епітелію ворсинок, помірна гіпертрофія лімфоїдних вузликів слизової оболонки. Характерним є наявність еозинофільних тілець-включень в цитоплазмі епітеліоцитів крипт.

10. Мікроскопічні зміни у собак за кишкової форми спонтанного парвовірусного ентериту характеризуються дистрофічно-некробіотичними змінами в печінці, підшлунковій залозі та нирках, що свідчить про наявність у хворих собак гепато-панкреато-ренального синдрому.

11. У собак після вакцинації проти парвовірусної інфекції впродовж 21 доби зростає вміст специфічних імуноглобулінів класу G (до $340 \pm 22,3 \text{ Од/мл}$), з подальшим зниженням впродовж 7–8 місяців (після останньої вакцинації) до критичного рівня ($\leq 20,8 \pm 1,8 \text{ Од/мл}$), що передбачає проведення бустер імунізації задля створення напруженого специфічного імунітету.

12. Дослідженнями доведено, що експериментально отриманий шляхом висолюванням сульфатом амонію препарат КПВІ (Ig G) за чистотою та кількісним умістом загального імуноглобуліну був на рівні комерційно доступних препаратів Глобкан-5 та Гіскан-5 – 70 %, а застосування афінної очистки на сорбенті з іммобілізованим білком A *Staphylococcus aureus* забезпечило отримання фракції тотальних Ig G собаки з чистотою близько 90 % і високою стабільністю не менше 6 місяців.

13. Для виявлення та ідентифікації геному парвовірусу собак у ПЛР підібрані олігонуклеотидні праймери SET2 – CPVF (*gcatttggtagacaacatgg*) CPVR (*ttgaatccaatctccttctgg*), що дозволяють ампліфікувати певні ділянки геному вірусу з високою специфічністю.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Для встановлення патоморфологічного діагнозу на парвовірусну і коронавірусну інфекцію собак доцільно використовувати методичні рекомендації «Патоморфологічна діагностика парвовірусного та коронавірусного ентериту у собак», затверджені НМР «Науково-методичного центру інформаційно-аналітичного забезпечення діяльності вищих навчальних закладів «Агроосвіта» (протокол № 6 від 01.10.2018 р.).

2. Для отримання інформації щодо ендогенної інтоксикації організму собак, стану неспецифічної реактивності на різних стадіях його патологічного процесу за хвороб різної етіології пропонуємо використовувати методичні рекомендації «Інтегральні гематологічні індекси оцінки ступеня ендогенної інтоксикації у собак» затверджені НМР Держпродспоживслужби України (протокол № 3 від 20.12.2018 р.).

3. Для вірусологічних досліджень з метою виділення, адаптації та накопичення парвовірусу і коронавірусу собак рекомендуємо використовувати методичні рекомендації «Особливості культивування вірусів собак родини *Parvoviridae* та *Coronaviridae*», затверджені НМР «Науково-методичного центру інформаційно-аналітичного забезпечення діяльності вищих навчальних закладів «Агроосвіта» (протокол № 6 від 01.10.2018 р.).

4. Для біологічної промисловості запропоновано спосіб виділення імуноглобуліну класу *G (Ig G)* собаки, специфічного до парвовірусної інфекції, який може бути використаний з лікувальною (створення специфічного глобуліну) та діагностичною (як компонент для вестерн-блоту) метою.

5. Вакцинацію цуценят проводити тільки після визначення рівня імуноглобулінів класу *G (Ig G)* у 5-тижневому віці, за визначення *Ig G* більше 50 Од/мл вакцинувати *Puppy DP*, далі за схемою: у 7–8 тижнів – імунізація вакциною *DHPPI+L* та у 9–11 тижнів – ревакцинація *DHPPI+LR*. У разі зменшення у 5-тижневому віці показника *Ig G* до 40 Од/мл і нижче – вакцинувати за загальною схемою, починаючи у 7–8 тижнів з однією ревакцинацією через 21 добу.

6. Уперше на території України виділений штам «*Nick*» коронавірусу собак, задепонований у депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (наказ № 66 від 17.12.2018 р.) та штам «*Антей*» парвовірусу собак, виділений на гетерологічних перещеплювальних лініях культур клітин задепонований у депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (наказ № 66 від 17.12.2018 р.).

7. Уперше в Україні запропоновано схему використання гетерологічних ліній культур клітин для виділення, культивування та накопичення коронавірусу собак (патент України на корисну модель «Спосіб культивування коронавірусу собак» № u 201811498) і парвовірусу собак (патент України на корисну модель «Спосіб культивування парвовірусу собак» № u 201902860).

8. Отримані результати пропонуємо використовувати під час написання відповідних розділів підручників і навчальних посібників з епізоотології, вірусології, імунології, патологічної анатомії та лабораторної діагностики.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія:

1. Лісова В.В., Радзиховський М.Л. Коронавірусна інфекція собак : монографія. Київ: ЦП «Компринт», 2019. 126 с. *(Здобувачем проведено аналіз літературних даних порівняно з одержаними результатами вивчення особливостей коронавірусу та його патогенний вплив на організм собак, оформлено ілюстративний матеріал, підготовлено монографію до друку).*

Статті у наукових фахових виданнях України:

2. Радзиховський М.Л. Епізоотологічні особливості парвовірусного ентериту собак. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*. Харків, 2016. Вип. 32, Ч. 2. С. 130–134.

3. Радзиховський М.Л. Моніторинг ентеритів вірусної етіології у собак *Науковий вісник ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. Сер. Ветеринарні науки*. Львів, 2016. Т. 18, № 1 (65), Ч. 1. С. 138–142.

4. Радзиховський М.Л. Епізоотологічні особливості ротавірусного ентериту собак. *Наук.-техн. бюл. НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. Дніпро, 2016. Т. 4, № 4. С. 49–53.

5. Радзиховський М.Л., Дишкант О.В., Розумнюк А.В. Морфологічні та біохімічні показники крові собак уражених парвовірусним ентеритом. *Ветеринарна біотехнологія. Бюлетень Інституту ветеринарної медицини НААН*. Київ, 2016. Вип. 29. С. 226–232. *(Здобувачем здійснені морфологічні дослідження крові та їх аналіз).*

6. Радзиховський М.Л., Горальський Л.П., Заїка С.С. Патологоанатомічні зміни при коронавірусному ентериті у собак. *Вісник ЖНАЕУ*. Житомир, 2017. Т. 3, № 1 (60). С. 303–307. *(Здобувачем здійснені патологоанатомічні дослідження та їх аналіз).*

7. Радзиховський М.Л. Показники еритроцитопоезу у собак за парвовірусного ентериту. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. Біла Церква, 2017. Вип. 2 (136). С. 97–101.

8. Радзиховський М.Л., Розумнюк А.В., Полупан І.М. Показники еритроцитопоезу у собак за коронавірусного ентериту. *Ветеринарна біотехнологія*. Київ, 2017. Вип. 31. С. 128–134. *(Здобувачем здійснені лабораторні дослідження та їх аналіз).*

9. Радзиховський М.Л., Дишкант О.В., Лісова В.В., Пінський О.В. Гемаглютинувальні властивості парвовірусу собак. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Сер. Ветеринарні науки*. Харків, 2018. Т. 3, Вип. 35, Ч. 2. С. 46–50. *(Здобувачем здійснені лабораторні дослідження та їх аналіз).*

10. Радзиховський М.Л. Морфологічні показники крові у собак за різних форм прояву парвовірусного ентериту. *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок України і Інституту біології тварин НААН*. Львів, 2018. № 2, Вип. 19. С. 152–157

11. Горальський Л.П., Радзиховський М.Л., Заїка С.С. Патоморфологічна диференційна діагностика парвовірусного та коронавірусного ентериту у собак. *Наукові горизонти*. Житомир, 2018. № 9–10 (71). С. 3–7. *(Здобувачем здійснені патоморфологічні дослідження та їх аналіз).*

12. Радзиховський М.Л. Мікроскопічні зміни в тонкій кишці цуценят при експериментальному зараженні ізолятом парвовіруса, культивованим у гетерологічній культурі клітин. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. Біла Церква, 2018. Вип. 1 (140). С. 122–127.

13. **Радзиховський М.Л.**, Горальський Л.П., Борисевич Б.В., Дишкант О.В. Інтегральні індекси інтоксикації у собак за коронавірусного ентериту. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. Біла Церква, 2018. Вип. 2 (144). С. 13–19. (Здобувачем здійснені лабораторні дослідження та їх аналіз).

14. Радзиховський М.Л. Гістологічні зміни у собак за кишкової форми парвовірусного ентериту. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. Харків, 2018. № 2. С. 59–62.

15. Радзиховський М.Л. Макроскопічні зміни у цуценят за експериментального відтворення коронавірусного ентериту. *Вісник ПДАА. Сер. Ветеринарна медицина*. Полтава, 2018. № 4. С. 174–177.

16. Радзиховський М.Л. Гістологічні зміни в печінці та нирках за експериментального відтворення парвовірозу у собак. *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок України і Інституту біології тварин НААН*. Львів, 2019. № 1, Вип. 20. С. 123–129.

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

17. Радзиховський М.Л. Епізоотологічні особливості коронавірусного ентериту собак. *Науковий вісник НУБіП України. Сер. Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва*. Київ, 2016. № 237. С. 321–328.

18. Радзиховський М.Л. Гематологічні та біохімічні показники крові собак уражених коронавірусним ентеритом. *Науковий вісник ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького*. Львів, 2017. Т. 19, № 77. С. 170–174.

19. **Радзиховський М.Л.**, Заїка С.С. Патоморфологічна характеристика парвовірусного ентериту в собак. *Науковий вісник ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького*. Львів, 2017. Т. 19, № 82. С. 45–49. (Здобувачем здійснені патологоанатомічні дослідження та їх аналіз).

20. Лісова В.В., **Радзиховський М.Л.** Патоморфологічна діагностика ентеритів вірусної етіології у собак. *Науковий вісник ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького*. Львів, 2018. Т. 20, № 83. С. 299–303. (Здобувачем здійснені патологоанатомічні дослідження та їх аналіз).

21. Лісова В.В., **Радзиховський М.Л.**, Стеблінова А.О. Мікроскопічні зміни в печінці й підшлунковій залозі собак при кишковій формі парвовірусного ентериту. *Науковий вісник НУБіП України. Сер. Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва*. Київ, 2018. № 285. С. 346–351. (Здобувачем здійснені гістологічні дослідження та їх аналіз).

22. Радзиховський М.Л. Порівняння чутливості перещеплювальних ліній культур клітин до коронавірусу собак. *Вісник ДДАЕУ*. Дніпро, 2018. № 1–2 (47). С. 157–160.

23. Радзиховський М.Л. Мікроскопічні зміни в товстій кишці цуценят за експериментального зараження ізолятом парвовіруса, культивованим у

гетерологічній культурі клітин. *Науковий вісник ЛНУВМ та БТ С.З. Гжицького*. Львів, 2018. Т. 20, № 88. С. 98–101.

ім.

24. **Радзиховський М.Л.**, Горальський Л.П., Дишкант О.В. Динаміка лейкоцитарних індексів за парвовірусного ентериту у собак. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. Дніпро, 2019. Vol. 7 (1). С. 3–7. (Здобувачем здійснені лабораторні дослідження та їх аналіз).

25. Горальський Л.П., **Радзиховський М.Л.**, Дишкант О.В. Мікроскопічна будова серця, органів кровотворення та імунного захисту собак за експериментального відтворення парвовірозу. *Наукові горизонти*. 2019. № 6 (79). С. 9–14. (Здобувачем здійснені гістологічні дослідження та їх аналіз).

26. Лісова В.В., **Радзиховський М.Л.** Морфологічні особливості різних форм парвовірусної інфекції собак. *Ukrainian journal of veterinary sciences*. Київ, 2019. Vol. 10 (2). Р. 37–44. (Здобувачем здійснені патологоанатомічні дослідження та їх аналіз).

27. Goralskii L., **Radzikhovsky N.**, Dyshkant O., Dunaievska O., Sokulskiy I. Experimental study of tropism in cultivated canine coronavirus in the small intestine of puppies / // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10 (4). Р. 489–496. doi: 10.15421/021972 (Здобувачем здійснені гістологічні дослідження та їх аналіз).

Статті у наукових фахових виданнях інших держав, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

28. **Радзиховський Н.Л.**, Заика С.С., Дышкант О.В. Патолого-анатомические изменения у собак при ассоциированном течении парвовирусного энтерита с аденовирусным гепатитом. *Сельское хозяйство проблемы и перспективы. Сер. Ветеринария*. Гродно, 2018. Т. 40. С. 182–190. (Здобувачем здійснені патологоанатомічні дослідження та їх аналіз)

29. **Радзиховський Н.**, Дишкант О. Эпизоотологические особенности болезней собак, вызванных энтеровирусами. *Ученые записки УО ВГАВМ*. Витебск, 2018. Т. 54, Вып. 2. С. 51–55. (Здобувачем здійснений епізоотологічний аналіз)

30. **Радзиховський Н.Л.**, Дышкант О.В., Бахур Т.И., Патафеева В.А. Сравнительные показатели эритроцитопоеза у собак при энтеритах вирусной этиологии. *Ученые записки УО ВГАВМ*. Витебск, 2018. Т. 54, Вып. 3. С. 37–40. (Здобувачем здійснені морфологічні дослідження крові та їх аналіз).

31. **Радзиховський Н.**, Дышкант О., Бахур Т., Столярова Ю. Сравнение чувствительности перевиваемых культур клеток к парвовирусу собак. *Ветеринарный журнал Беларуси*. Витебск, 2018. Вып. 2 (9). С. 57–60. (Здобувачем здійснені вірусологічні дослідження та їх аналіз).

Патенти:

32. **Радзиховський М.Л.**, Дишкант О.В. Патент України № 137015: Спосіб культивування парвовірусу собак № U201902860; заявл. 22.03.2019; опубл. 25.09.2019, Бюл. № 18. (Здобувач брав участь у проведенні досліджень і оформленні патенту України).

33. Горальський Л.П., **Радзиховський М.Л.**, Дишкант О.В. Патент України № 133896: Спосіб культивування коронавірусу собак: № U201811498; заявл. 23.11.2018; опубл. 25.04.2019, Бюл. № 8. (Здобувач брав участь у проведенні досліджень і оформленні патенту України).

Посібник:

34. Довгій Ю.Ю., Радзиховський М.Л., Дубова О.А., Фещенко Д.В., Нікітін О.А., Бахур Т.І., Дишкант О.В., Довгій М.Ю. Паразитарні та інфекційні хвороби м'ясоїдних тварин : навч. посібник / за ред. Ю.Ю. Довгія. Вид. 2-ге, пер. і доп. Житомир: Полісся, 2016. 320 с. *(Здобувачем написано розділ «Вірусні хвороби»).*

Методичні рекомендації:

35. Радзиховський М.Л., Горальський Л.П., Костюк В.К. Патоморфологічна діагностика парвовірусного та коронавірусного ентериту у собак : методичні рекомендації. Житомир: Рута, 2018. 20 с. (Затверджено НМР Науково-методичного центру інформаційно-аналітичного забезпечення діяльності вищих навчальних закладів «Агроосвіта», 1 жовтня 2018 року, протокол № 6). *(Здобувач проводив морфологічні дослідження та узагальнення отриманих результатів).*

36. Радзиховський М.Л., Горальський Л.П., Костюк В.К. Особливості культивування вірусів собак родини Parvoviridae та Coronaviridae. Житомир: Рута, 2018. 20 с. (Затверджено НМР «Науково-методичного центру інформаційно-аналітичного забезпечення діяльності вищих навчальних закладів «Агроосвіта», 1 жовтня 2018 року, протокол № 6). *(Здобувач особисто проводив вірусологічні дослідження та узагальнення отриманих результатів).*

37. Радзиховський М.Л., Горальський Л.П., Дишкант О.В. Інтегральні гематологічні індекси оцінки ступеня ендогенної інтоксикації у собак. Житомир: Рута, 2018. 20 с. Затверджені Науково - методичною радою Держветфітослужби № 3 від 20.12 2018 року. *(Здобувач проводив статистичні дослідження та узагальнення отриманих результатів і підготовку матеріалів до друку).*

Тези наукових доповідей:

38. Радзиховський М.Л., Дишкант О.В. Інфекційні ентерити у собак *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин* : матеріали щорічної наук.-практ. конф. молодих вчених, 16 червня 2016 р. Київ : НААН України, Інститут ветеринарної медицини, Київ, 2016. С. 68–70. *(Здобувачем здійснені моніторингові дослідження та їх аналіз).*

39. Радзиховський Н.Л. Никитин О.А. Заразные болезни собак и кошек в городе Житомир. *Инфекционные болезни животных и антимикробные средства* : междунар. науч.-практ. конф. Саратов, 2016. С. 183–186. *(Здобувачем здійснені моніторингові дослідження та їх аналіз).*

40. Радзиховський М.Л. Нозологічний профіль ентеритів у собак. *Біологія тварин. Актуальні проблеми сучасної біології тваринництва та ветеринарної медицини* : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., 29–30 вересня 2016 р. Львів, 2016. № 3, Т. 18. С. 176.

41. Горальський Л.П., Радзиховський М.Л. Патоморфологічні зміни в органах травлення собак за коронавірусного ентериту. *Сучасні проблеми ветеринарної медицини з питань інфекційної патології та патоморфології тварин* : матер. всеукр. наук.-практ. інтернет-конф., 18–19 травня 2017 р. Полтава, 2017. С. 74–75. *(Здобувачем здійснені патоморфологічні дослідження та їх аналіз).*

42. Радзиховський М.Л., Дишкант О.В. Морфологічні особливості показників крові у собак за інфекційних ентеритів. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин* : матеріали щорічної наук.-практ.

конф. молодих вчених, присв. 40-річчю заснування Інституту ветеринарної медицини ІВМНААН. Київ, 2017. С. 72–74. (Здобувачем здійснені морфологічні дослідження крові та їх аналіз).

43. **Radzykhovskiy N.**, Dyshkant O. Peculiarities of cultivation on enterovirus cell cultures of dogs BTRP Ukraine Regional. *One Health Research Symposium* : 16–20 April 2018. Kyiv, 2018. P. 210. (Здобувачем здійснені лабораторні дослідження та їх аналіз).

44. **Радзиховський М.Л.**, Дишкант О.В. Моніторинг заразних хвороб собак і котів у м. Житомир. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин* : матеріали щорічної наук.-практ. конф. молодих вчених, присв. 100-річчю НААН України, 19 липня 2018 р. Київ : Компринт, 2018. С. 79–80. (Здобувачем здійснені моніторингові дослідження та їх аналіз).

45. **Радзиховський М.Л.**, Дишкант О.В., Нікітіна Ю.О. Мікроскопічні зміни в підшлунковій залозі собак за парвовірусного ентериту. *Science and technology of the present time : priority development directions of Ukraine and Poland*, 19–20 October 2018. Wolomin, Republic of Poland. 2018. Vol. 6. С. 78–82. (Здобувачем здійснені мікроскопічні дослідження та їх аналіз).

46. Соколюк В.М., **Радзиховський М.Л.**, Дишкант О.В., Колеснік Н.Л. Парвовірусний ентерит собак. Коронавірусний ентерит собак. *Science, research, development #12 Economy. Management. State and Law Vol. 2 Belgrade (Serbia)* 29.12.2018–30.12.2018. P. 7–19. (Здобувачем здійснені моніторингові і лабораторні дослідження та їх аналіз).

47. Радзиховський М.Л. Мікрофлора кишечника собак за коронавірусного ентериту. *BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* : 20–24 May 2019. Kyiv, 2019. P. 248.

АНОТАЦІЯ

Радзиховський М.Л. Патоморфологія, діагностика, лікування та профілактика ентеритів вірусної етіології у собак. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальностями 16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин і 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, 2021.

Дисертація присвячена проблематиці інфекційних ентеритів собак. У роботі науково обґрунтовано результати досліджень епізоотологічних особливостей парво- та коронавірусної інфекції та встановлено їх роль у нозологічному профілі ентеритів собак.

З'ясовані зміни гематологічних показників у собак за парво- і коронавірусного ентериту. Визначені коливання морфологічних і біохімічних показників крові залежно від різних клінічних форм парвовірусної інфекції.

Для оцінки порушень гуморальної та клітинної ланок імунітету, мікро- і макрофагальної системи, зниження неспецифічного захисту організму запропоновано і науково обґрунтовано проведення аналізу інтегральних

лейкоцитарних індексів на основі формули крові, що відображає стан нейрогуморального гомеостазу.

Встановлено показники клітинного імунітету в собак, хворих на парво- і коронавірусний ентерит, котрі порівняні з динамікою результатів після вакцинації для визначення оптимального терміну ревакцинації. Визначено зміни показників гуморального імунітету проти парвовірусного ентериту після переохворювання у певні поствакцинальні періоди, враховуючи концентрації специфічного *Ig G* та напруженість передачі материнських антитіл.

Розроблена і апробована схема отримання фракції тотальних *Ig G* методом афінної хроматографії за допомогою сорбентів на основі іммобілізованих імуноглобулінів зв'язувальних білків, зокрема, рекомбінантного білка А *Staphylococcus aureus* з високим рівнем стабільності.

Виділені польові штами корона- та парвовірусу, проведено їх ізоляцію й адаптацію в системі *in vitro* та визначено патогенність на сприйнятливих тваринах. Експериментально доведено можливість адаптації та накопичення польового ізоляту парво- та коронавірусу в системі *in vitro* на гетерологічних культурах клітин з визначенням їх патогенності. Показано, що виділений польовий ізолят здатен викликати розвиток хвороби у собак за експериментального інфікування.

Проведені дослідження щодо виділення мікробіоти кишечника, обґрунтоване всебічне розуміння причин розвитку патологічного процесу за парво- і коронавірусного ентериту.

З метою удосконалення діагностики інфекції розроблено протокол постановки ПЛР для виявлення ДНК парвовірусу в біологічному матеріалі.

Проведеними дослідженнями встановлено, що мікроскопічні та гістохімічні зміни в органах і тканинах собак, експериментально інфікованих парвовірусом дещо відрізняються від таких у спонтанно хворих тварин. Однак, макроскопічні зміни були подібними.

Експериментально встановлено, що за коронавірусної інфекції у цуценят основні макроскопічні зміни локалізувалися в тонкому кишечнику.

На підставі вивчення макро- та мікроскопічних змін у тканинах і клітинах організму собак за парво- та коронавірусної інфекції при природному і експериментальному інфікуванні встановлені діагностичні маркери та розроблена схема диференційної патоморфологічної діагностики.

Ключові слова: собака, парвовірусний ентерит, коронавірусний ентерит, еритроцитопоз, лейкоцитопоз, імунітет, культуральні властивості, ПЛР, *Ig G*, біопроба, макроскопічні та мікроскопічні особливості.

АННОТАЦІЯ

Радзиховский Н.Л. Патоморфология, диагностика, лечение и профилактика энтеритов вирусной этиологии у собак. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 16.00.02 – патология, онкология и морфология животных и 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого, Львов, 2021.

Диссертация посвящена проблематике инфекционных энтеритов собак. В работе научно обоснованы результаты исследований эпизоотологических особенностей парво- и коронавирусной инфекции и установлена их роль в нозологическом профиле энтеритов собак. Проведенные исследования показали, что инфекционная патология собак с симптомокомплексом поражения желудочно-кишечного тракта и развитием энтерита достаточно многовекторный нозологический профиль, который включает вирусные, бактериальные и паразитарные болезни. У собак с поражением желудочно-кишечного тракта, сопровождающегося геморрагическим энтеритом, по результатам наших исследований, установлена причина незаразной этиологии в 13, а заразной - у 87% исследовательских животных, к тому же 63% собак были поражены инфекционным антигеном, а 37 - инвазивных.

Выявлены изменения гематологических показателей у собак при парво- и коронавирусном энтерите. Определены колебания морфологических и биохимических показателей крови при различных клинических формах парвовирусной инфекции. При энтеритах вирусной этиологии отмечается сложный патогенез, который характеризуется воспалительными процессами, гемолизом красных кровяных клеток, развитием анемии, истощением и снижением мышечной массы. В некоторых случаях отмечали гепатопатию и нарушения в сердечно-сосудистой системе.

Для оценки нарушений гуморального и клеточного звеньев иммунитета, микро- и макрофагальной системы, снижение неспецифической защиты организма предложено и научно обосновано проведение анализа интегральных лейкоцитарных индексов на основе формулы крови, которая отображает состояние нейрогуморального гомеостаза.

Интегральные гематологические индексы при геморрагических энтеритах собак позволяют количественно и своевременно оценить состояние иммунной системы организма больных собак, невозможно достаточно полно и объективно оценить такое состояние по результатам общего анализа крови.

Коронавирусная энтерит у собак сопровождается эндогенной интоксикацией, уровень которой был более выражен у собак при естественном инфицировании. У собак при парвовирусной инфекции происходят нарушения в системе лейкоцитопоезу, что свидетельствует о развитии полиорганной патологии: гепаторенальный синдром, панкреатит, нарушения работы желудочно-кишечного тракта, эндогенная интоксикация при которой происходит поражение иммунной системы.

Установлены показатели клеточного иммунитета у собак, больных парво- и коронавирусным энтеритом в сравнении с динамикой результатов после вакцинации для определения оптимального срока ревакцинации. Определены изменения показателей гуморального иммунитета против парвовирусного энтерита после заболевания в определенные поствакцинальные периоды, учитывая концентрации специфического *Ig G* и напряженность передачи материнских антител.

Разработана и апробирована схема получения фракции тотальных *Ig G* методом аффинной хроматографии с помощью сорбентов на основе иммобилизованных

иммуноглобулинов связующих белков, в частности рекомбинантного белка А *Staphylococcus aureus* с высоким уровнем стабильности.

Выделены полевые штаммы коронавируса «Nick» и парвовируса «Антей», зарегистрированные в депозитории национального центра штаммов микроорганизмов Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов. Проведена их изоляция и адаптация в системе *in vitro* и определена патогенность на восприимчивых животных. Экспериментально доказана возможность адаптации и накопления полевого изолята парво- и коронавируса в системе *in vitro* на гетерологичных культурах клеток с определением их патогенности. Показано, что выделенные полевые изоляты способны вызвать развитие болезни у экспериментально инфицированных собак.

Проведены исследования по выделению микробиоты кишечника, обосновано всестороннее понимание причин развития патологического процесса. При экспериментальном воспроизведении исследуемых инфекций представителей патогенной микрофлоры выделено не было. В микробном пейзаже доминируют индигенные бактериальные ассоциации.

С целью усовершенствования диагностики инфекции разработан протокол постановки ПЦР для выявления ДНК парвовируса в биологическом материале.

Проведенными исследованиями установлено, что микроскопические и гистохимические изменения в органах и тканях собак, экспериментально инфицированных парвовирусом, несколько, отличались от таковых у спонтанно больных животных. В то же время, макроскопические изменения были подобными.

Экспериментально установлено, что при коронавирусной инфекции у щенков основные макроскопические изменения локализовались в тонком кишечнике.

На основании изучения макро- и микроскопических изменений в тканях и клетках организма собак под воздействием парво- и коронавирусной инфекции при естественном и экспериментальном инфицировании обнаружены диагностические маркеры и разработана схема дифференциальной патоморфологической диагностики.

Ключевые слова: собака, парвовирусный энтерит, коронавирусный энтерит, эритроцитопоз, лейкоцитопоз, иммунитет, культуральные свойства, ПЦР, IgG, биопроба, макроскопические и микроскопические особенности.

ANNOTATION

N. Radzikhovskii Pathomorphology, diagnosis, treatment and prevention of enteric viral etiology in dogs. – On the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of veterinary sciences on specialties 16.00.02 – pathology, oncology and morphology of animals and 16.00.03 – veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology Lviv national university of veterinary medicine and biotechnologies of a name of Gzhytsky, Lviv , 2021.

The dissertation is devoted to the problem of infectious enteritis in dogs, namely parvovirus and coronavirus. The paper scientifically substantiates the results of studies of epizootological features and establishes the role of parvo- and coronavirus infection in the nosological profile of enteritis in dogs.

The difference in hematological and biochemical parameters of blood was found and the deviation of hematopoiesis parameters in dogs with parvovirus and coronavirus enteritis was established. The fluctuations of these indicators for different forms of parvovirus infection in dogs were also determined.

To establish the violation of the humoral and cellular parts of the immune system, micro- and macrophage system, reducing nonspecific protection of the organism, it is proposed and scientifically substantiated to analyze integrated leukocyte indices based on blood formula, which reflects the state of neurohumoral homeostasis and immunological reactivity.

The indicators of cellular immunity in dogs with parvovirus and coronavirus enteritis and compared with the indicators at different times after vaccination to determine the optimal time of revaccination. Changes in humoral immunity in dogs against parvovirus enteritis were determined, taking into account the concentrations of specific class G immunoglobulin, during conversion to post-vaccination periods and the intensity of maternal antibody transmission.

A scheme for obtaining a fraction of total Ig G by affinity chromatography using sorbents based on immobilized immunoglobulin binding proteins, in particular, recombinant protein A *Staphylococcus aureus* with a high level of stability, was developed and tested.

A field strain of coronavirus and parvovirus was isolated, isolated and adapted in the in vitro system, and pathogenicity in susceptible animals was determined. The possibility of adaptation and accumulation of the field isolate of parvovirus and coronavirus in the in vitro system on heterologous cell cultures with determination of their pathogenicity has been experimentally proved.

It has been shown that the field isolate of parvovirus and coronavirus isolated on heterologous cell cultures is able to cause the development of the disease by experimental infection in dogs.

Studies on the excretion of intestinal microbiota have substantiated a comprehensive understanding of the causes of the pathological process in parvovirus and coronavirus enteritis.

In order to improve the diagnosis of infection, a PCR protocol was developed to detect parvovirus DNA in biological material.

Our histological and histochemical studies showed that microscopic and histochemical changes in the organs and tissues of experimentally infected dogs differed slightly from those in spontaneously infected animals with parvovirus infection. As for the macroscopic changes, they were similar. It was experimentally established that in coronavirus infection in puppies the main macroscopic changes were localized in the small intestine.

Based on the study of macro- and microscopic changes at the tissue and cellular levels in dogs with parvovirus and coronavirus infection in natural and experimental infection, diagnostic markers were identified and a scheme of differential pathomorphological diagnosis was developed.

Keywords: *dog, parvovirus enteritis, coronavirus enteritis, erythrocytopenia, leukocytopenia, immunity, cultural properties, PCR, IgG, bioassay, macroscopic and microscopic features.*