6. Grimelius L. Silver stains in the study of endocrine cells of the gut and pancreas / L. Grimelius, E. Wilander // Invest. Cell. Pathol. – 1980. – V. 3. – № 1. – P. 3-12.
7. Immunohistochemistry of gastrointestinal endocrine cells in the Meckel's diverticulum of the bean goose, Anser fabalis latham / S.-K. Ku, H.-S. Lee, K.-D. Park [et al.] // Korean J. Biol. Sci. –2000. – № 4. – P. 375-379.
8. Singh I. A modification of the Masson-Hamperl method for staining of argentaffin cells / I. Singh // Anat. Anz. – 1964. – Bd. 115. – H.1, S. – P. 81-82.

УДК 619:616-076:619:616

Гаврилін П.М., доктор ветеринарних наук,

Прокушенкова О.Г., кандидат ветеринарних наук,

Недзвецький В.С., доктор біологічних наук,

Масюк Д.М., кандидат ветеринарних наук,

НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК

Дніпропетровського державного аграрного університету

МЕТОДИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ХВОРОБ ПТИЦІ

Рецензент – доктор ветеринарних наук О.А. Ткаченко

Встановлені оптимальні параметри двухетапного непрямого імуногістохімічного методу діагностики вірусних хвороб продуктивної птиці (на прикладі інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) і хвороби Марека). Фрагменти клоакальної сумки, селезінки, нирки, головного мозку відбирали враховуючи тропізм збудників хвороб. Блокування активності ендогенної пероксидази проводили розчином пероксиду водню у метанолі. Оптимальними параметрами демаскування антигенів була трикратна мікрохвильова обробка зрізів по 5 хвилин при потужності печі 600-800 Вт. Безпосередній аналіз проводили за допомогою поліклональних первинних антитіл специфічних до антигенів вірусу ІБХ і хвороби Марека та вторинних антитіл проти IgG кроля, які мічені пероксидазою хрону. Для візуалізації імунного забарвлення використовували розчин 3,3-діамінобензидина тетрагідрохлорида, в результаті чого виявлялись ділянки з контрастним коричневим забарвленням. Найбільш виражене імунне забарвлення при ІБХ було встановлено у гістологічних зрізах клоакальної сумки та селезінки, а при хворобі Марека у гліальних клітинах сірої речовини головного мозку.

Ключові слова: *імуногістохімічний метод, антитіло, імунне забарвлення, демаскування антигенів, блокування ендогенної пероксидази, інфекційна бурсальна хвороба птиці, хвороба Марека.*

Постановка проблеми. В умовах інтенсивного розвитку птахівництва в Україні, більшість підприємств не завжди дотримуються технологічних режимів, скорочують санітарні розриви, що призводить до накопичення патогенної вірусної і бактеріальної мікрофлори в навколишньому середовищі. Практика частої зміни схем вакцинації, спектра біопрепаратів, необгрунтоване використання живих і поліштамних вакцин призводить до розширення спектру мікроорганізмів, що циркулюють у господарстві. У сучасних умовах перебіг інфекційних хвороб продуктивної птиці відбувається переважно на тлі вакцинації, в субклінічній, латентній і асоційованій формах, що ускладнює діагностику, а в подальшому й профілактику та ліквідацію хвороб [1, 5].

Крім вірусних хвороб, пов'язаних з ураженням респіраторного тракту великої шкоди птахівничій галузі наносять імунодепресивні хвороби, такі як ІБХ, хвороба Марека, інфекційна анемія курчат, реовірусний теносіновіт. На тлі имунодепресивного стану птиці відбувається нашарування секундарних інфекцій, що супроводжується значною летальністю, втратою продуктивності, а також знижує ефективність специфічних профілактичних заходів, майже до прориву імунітету вакцинованої птиці [6].

Відомо, що благополуччя господарств щодо інфекційних хвороб залежить від своєчасного якісного проведення лабораторних досліджень. Засоби діагностики вірусних хвороб птиці, що використовуються на сьогоднішній день, трудомісткі та є недостатньо чутливими та специфічними. Із спектру сучасних високочутливих методів визначення і ідентифікації антигена збудника інфекції в Україні найбільш розповсюдженим є імуноферментний аналіз (ІФА), проте окрім переваг він має ряд певних недоліків. Цей метод дає інформацію про загальну концентрацію антигенів або антитіл в біологічному субстраті і не дозволяє провести їх диференційний кількісний аналіз, що має вирішальне значення для визначення штамів збудника або їх варіантів.

Перспективність розвитку імуногістохімічних досіджень полягає в тому, що вони поєднують у собі можливості сучасної гістології та імуногістохіміч-

ного аналізу на клітинному та тканинному рівнях і дають можливість проводити діагностику у фіксованому матеріалі навіть після тривалого його зберігання [9]. За своїм принципом методи імуногістохімії грунтуються на імуноферментному виявленні антигенів за допомогою специфічних або антивидових сироваток, мічених флюорохромами або ферментами, у зрізах тканин, мазках, моношарі клітин та ін. [10]. Реакція добре візуалізується в звичайному оптичному мікроскопі і не потребує дорогого устаткування. Пофарбовані зрізи можна зберігати протягом тривалого періоду часу, а архивні парафінові блоки використовувати у подальших ретроспективних дослідженнях.

Імуногістохімічні методики дослідження на теперешній час є невід'ємною частиною наукових досліджень. Застосування імуногістохімії значно розширює можливості морфології як у вивченні етіології, патогенезу патологічних процесів, так і в рутинній діагностичній практиці [8,9,11].

Мета і завдання досліджень: встановлення оптимальних параметрів имуногістохімічного методу з метою виявлення антигенів вірусу в органах і тканинах продуктивної птиці (на прикладі інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) і хвороби Марека).

Материал і методи: Дослідження проведені в лабораторії гістології, імуноцитохімії і патоморфології НДЦ біобезпеки і екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрного університету. Матеріал для дослідження відбирали від курчат-бройлерів 33-40 добового віку з клінічними та патоморфологічними ознаками ІБХ, хвороби Марека та здорових птиць контрольної групи відповідного віку безпосередньо після забою (n=7). Для імуногістохімічних досліджень відбирали фрагменти органів (клоакальна сумка, селезінка, нирки, головний мозок) безпосередньо після забою птиці із дотриманням вимог МЕБ та існуючих правил біоетики [7]. Для контролю відбирали проби з тих самих органів від 7 SPF (вільних від специфічих патогенів) курчат віком 7-10 тижнів.

В якості позитивного контролю використовували зрізи виготовлені із зразків від клінічно хворих курей, для яких наявність збудника вірусних хвороб доведена патоморфологічним, серологічним та імуноферментним методами. Сироватку крові хворих циплят використовували як джерела специфі-

чних антитіл до антигенів вірусу ІБХ та хвороби Марека.

Матеріал фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні. Нейтральний pH створювали за допомогою фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБР). Фіксацію проб проводили при кімнатній температурі (15–20^{0}С) впродовж 24-48 год, що забезпечувало мінімальне маскування антигенів. Критерієм завершення фіксації проби є рівномірне її ущільнення та рівномірне забарвлення на розрізі з відсутністю червоних або рожевих ділянок.

Після закінчення фіксації формалін з проб видаляли шляхом промивання їх в проточній воді протягом 24-48 год, в залежності від розмірів проби. Зневоднення (дегідратацію) та ущільнення зразків проводили за загальноприйнятою в гістології методикою [2]. Зрізи з парафінових блоків товщиною 4-6 мкм виготовляли за допомогою полозкового мікротому. Виготовлені зрізи з ванночки з теплою дистильованою водою виймали вертикально щоб в зрізах не залишалось бульбашок повітря, які погіршують якість препаратів та переносили на предметні скельця з адгезивною поверхнею (Super Frost/Plus Slides (Menzel-Glaser)). Висушували зрізи у вертикальному положенні у термостаті при температурі 37^0 С протягом 2-6 год або при кімнатній температурі протягом доби. Виготовлені зрізи використовували відразу для імуногістохімічної реакції або зберігали не більше 20 діб у морозильній камері загорнутими в алюмінієву фольгу при температурі мінус 20±1,0^0 С.

Висушені зрізи депарафінували у ксилолі протягом 5 хв, а потім обробляли спиртами у концентрації, що знижується: 96%, 80%, 70%, 50% (по 3 хв в кожному).

У підготовлених зрізах блокували активність ендогенної пероксидази розчином пероксиду водню у метанолі 10 хв при температурі 20 – 24^{0}С. Для створення вологої атмосфери у пластиковій камері на її дно клали вологий фільтрувальний папір. Всі наступні інкубації зрізів проводили у вологій камері. Після блокування зрізи одноразово промивали ФСБР.

Для успішної взаємодії антигену та антитіла епітопи (антигенні детермінанти, що приймають участь у імунній реакції) повинні бути легкодоступними, тобто знаходитися на поверхні молекули. При денатурації молекул (наприклад, під дією фіксуючої рідини) епітопи можуть знижувати свою імуно-

генність. Також на просторову структуру молекул, тобто і на імуногенність її епітопів, впливає pH навколишнього середовища, показники якого повинні строго контролюватися. Фіксація тканин нейтральним формаліном, хоча і в меншій мірі, ніж інші фіксуючі рідини, але все ж змінює тривимірну структуру білка в досліджуваному матеріалі, що призводить до маскування антигенів. За певних умов тривимірну структуру білка можна відновити. Тому в процедуру обробки матеріалу при проведенні імуногістохімічних досліджень вводили етап демаскування.

Демаскування антигенів проводили шляхом нагрівання в мікрохвильовій печі. Випробувавши кілька режимів впливу мікрохвиль на досліджувані тканини ми встановили оптимальні параметри використання мікрохвильової печі. Теплову обробку проводили у звичайній побутовій СВЧ-печі трикратно по 5 хвилин при потужності 600-800 Вт. В якості розчину використовували ФСБР з фіксованим pH. При розміщенні скелець в мікрохвильовій печі ємності заповнювали розчином так, щоб він покривав зрізи. Відстань між скельцями має бути не менше 2-4 мм для вільного руху бульбашок повітря в рідині.

Наступний етап – інкубування зрізів із специфічними до антигенів вірусу хвороб антитілами, для чого наносили на кожний зріз від 0,05 $см^3$ до 0,1 $см^3$ робочого розчину антитіл. Для приготування робочого розчину специфічних до антигенів вірусу ІБХ та хвороби Марека антитіл у 10 $см^3$ ФСБР розчиняли 0,07 $см^3$ вихідного розчину кролячих специфічних до антигенів вірусів антитіл (Ig G). Скельця із зрізами розміщували у вологій камері і витримували 60 хв при температурі $37\pm0,5^0$ С.

Після інкубації із специфічними до антигенів вірусів ІБХ та хвороби Марека антитілами скельця із зрізами відмивали ФСБР три рази по 5 хв. Залишок розчину навколо зрізів ретельно видаляли за допомогою фільтрувального паперу.

На відмиті зрізи наносили від 0,05 $см^3$ до 0,1 $см^3$ робочого розчину вторинних антитіл. Для приготування робочого розчину у 10 $см^3$ ФСБР розчиняли 0,07 $см^3$ вихідного розчину антитіл проти IgG кроля, які мічені пероксидазою хрону. Інкубували зрізи протягом 60 хв при температурі $37\pm0,5^0$ С. Після

інкубації із вторинними антитілами скельця із зрізами відмивали ФСБР 3 рази по 5 хв. Залишок розчину видаляли за допомогою фільтрувального паперу.

Важливим етапом будь-якого імуногістохімічного методу є візуалізація результатів реакції „антиген-антитіло". Виявити антитіла, що зв'язалися з антигенами, можна використовуючи різні мітки, пов'язані з Fc-фрагментом антитіл. Такими мітками є флюорохроми, ферменти, метали та металопротеїни, радіоізотопи, проміжні сполучні речовини (біотин, дігоксин та ін.). Вони можуть бути кон'юговані як з первинними антитілами, так і з вторинними. Якщо мітка кон'юговані з первинними антитілами – це прямий метод візуалізації. Чутливість цього методу вкрай низька, тому що на одну молекулу антигену припадає одна мітка. При використанні непрямого методу чутливість набагато підвищена, коли первинні антитіла не несуть на собі ніякого мітки, на відміну від вторинних, для яких первинні антитіла є антигеном. У своїй роботі ми використовували двохетапний непрямий метод.

Забарвлення ділянок на зрізах, з якими специфічно реагують антитіла, проводили при температурі 20 – 24^0 С. На кожний зріз наносили від 0,05 $см^3$ до 0,1 $см^3$ розчину 3,3-діамінобензидину тетрагідрохлориду (ДАБ) і пероксиду водню у трис-буфері (рН 7,2). Реакцію фарбування проводили 4-6 хв. Після чого скельця із зрізами відмивали дистильованою водою 2 хв. В подальшому зрізи дофарбовували гематоксиліном Ерліха, зневоднювали спиртами у концентрації, що зростає та ксилолом і заводили в канадський бальзам або полістерол.

Для правильної інтерпретації імуногістохімічного дослідження одночасно з досліджуваними препаратами обробляли контрольні зрізи: позитивний і негативний контроль антигену, негативний контроль антитіл. Аналіз зрізів проводили методом світлової мікроскопії, фотографували за допомогою цифрової камери і зберігали зображення у форматі малюнків на електронних носіях.

Результати досліджень. Дослідження свідчать, що при візуалізації позитивної реакції на зрізах реєструються ділянки з контрастним коричневим імунозабарвленням. Інтенсивність якого прямо пропорційна кількості антигенів вірусу в межах розведення відповідних специфічних антитіл. Якщо імунні комплекси не сформувались (негативний результат) зрізи забарвлю-

ються гематоксиліном у світло-синій колір без наявності контрастного коричневого забарвлення. Можливе лише незначне рівномірне коричневате забарвлення на рівні фону. При порівнянні зрізів позитивного контролю з дослідними локалізація імунного забарвлення була збіжною для відповідних органів. На гістологічних зрізах органів тварин контрольної групи позитивної реакції не спостерігалось.

При мікроскопії гістопрепаратів забарвлені імунні комплекси виявляли переважно у протоплазмі і частково у плазматичній мембрані клітин. Антиген у гістологічних препаратах органів птахів дослідної групи після імуногістохімічного фарбування мав вигляд локальних або дифузних скупчень коричневого кольору округлої та глибчастої форми.

Вірус ІБХ має високу лімфотпропність. Гістологічні зміни в сумці Фабриціуса супроводжувалися ураженням лімфоцитів, локальними некрозами фолікулів, макрофагальним лізисом мозкової речовини фолікулів. Локальні некрози мозкової речовини фолікулів мали вигляд великих, чітко обмежених округлих скупчень клітинного детриту. В деяких фолікулах спостерігався викид некротичних мас у просвіт бурси. При дослідженні імуногістохімічних змін у клоакальній сумці було встановлено, що антиген у вигляді дрібних глибок накопичувався в усіх зонах лімфоїдного осередку бурси. Найбільш виражене імунне забарвлення реєструвалось у зовнішньому кортикальному шарі, де відбувається созрівання і проліферація В-лімфоцитів (рис.1).

Позитивне імунозабарвлення реєструвалось у протоплазмі лімфоцитів білої та червоної пульпи селезінки. У нирках епітеліальні клітини проксимальних звивистих канальців збільшені, межі між клітинами нечіткі, цитоплазма клітин тьмяна з слабо помітною зернистістю, окремі ядра клітин знаходяться в стані розпаду. Просвіт дистальних звивистих канальців та збиральних трубочок канальців збільшений. Антиген накопичувався у епітелії канальців нирок та у капсулах клубочків (рис.2).

При проведенні блокування ендогенної пероксидази у зрізах нирок птиці була виявлена найбільша її активність. Вірус хвороби Марека має нейротропну дію. У головному мозку хворої птиці реєстрували периваскулярні

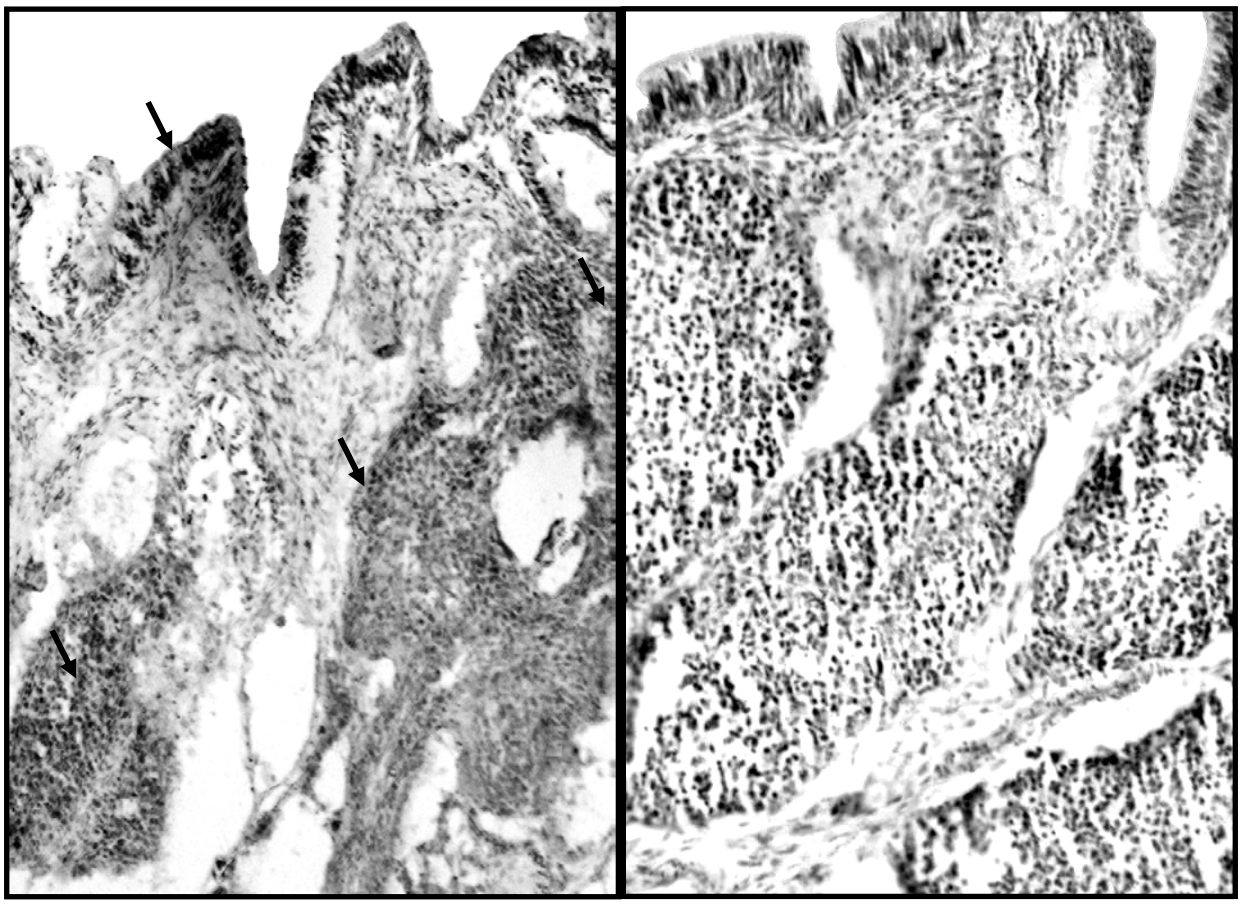

Рис.1. Гістопрепарат клоакальної сумки при інфекційній бурсальній хворобі птиці: А – позитивне; Б – негативне імунозабарвлення. Olympus CX41, х 400.

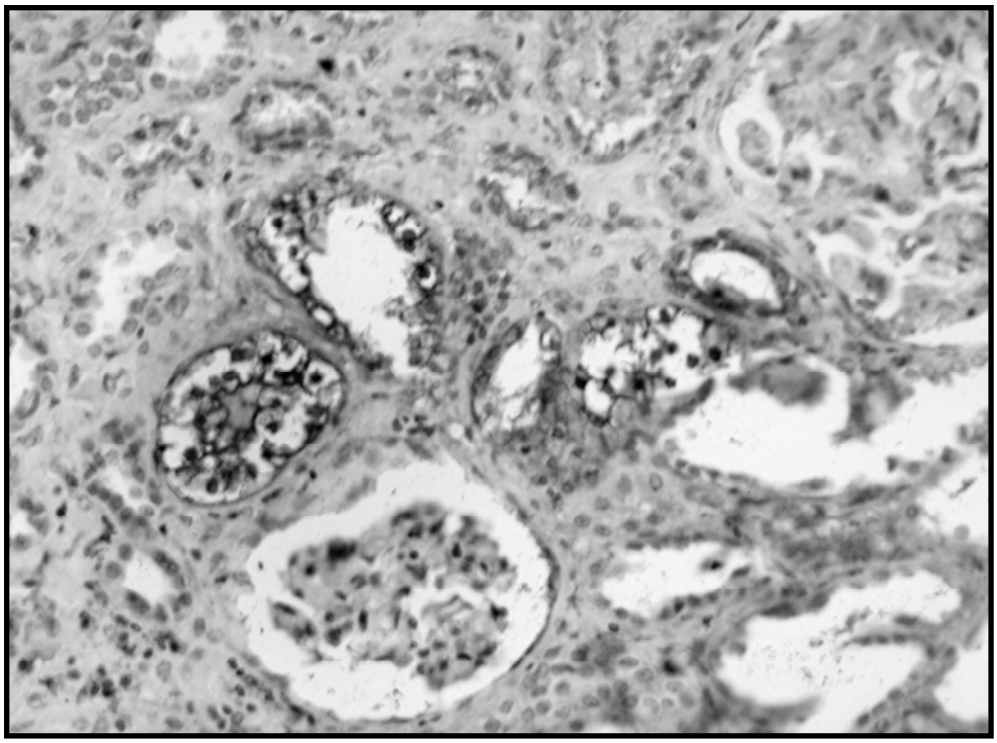

Рис. 2. Гістопрепарат нирок з позитивним імунозабарвленням при інфекційній бурсальній хворобі птиці. Olympus CX41, х 400.

інфільтрати і дегенеративні зміни нейронів. Антиген накопичувався у гліальних клітинах сірої речовини головного мозку (рис.3). Імунне забарвлення реєструвалося в усіх шарах кори головного мозку і провлялось коричневим кольором тіла і відростків нейронів (рис.4).

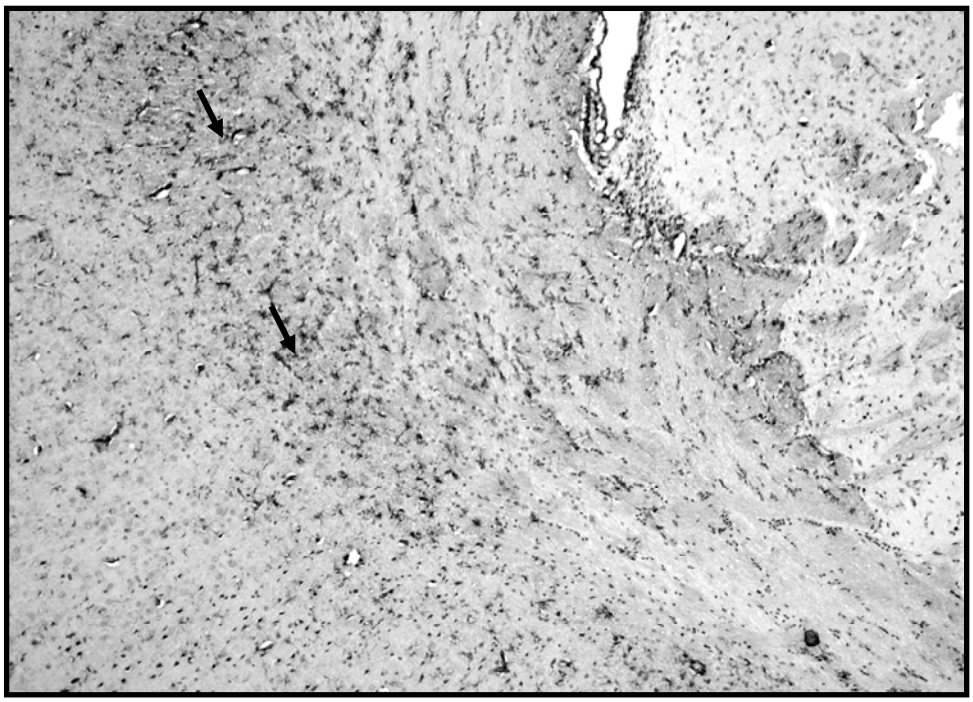

Рис. 3. Гістопрепарат головного мозку птиці з позитивним імунозабарвленням при хворобі Марека. Olympus CX41, x 100.

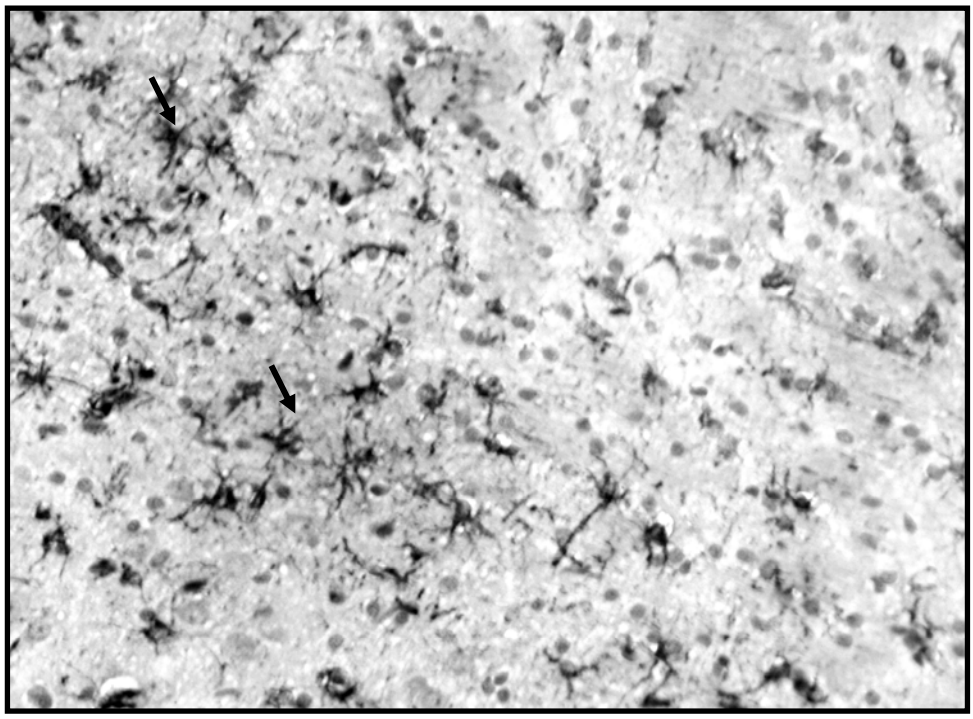

Рис.4. Гістопрепарат головного мозку птиці з позитивним імунозабарвленням при хворобі Марека. Olympus CX41, X400.

Отже, отримані результати свідчать про те, що імуногістохімічні методи виявлення антигенів вірусних хвороб птиці можуть надати вичерпну інформацію про імуногенні особливості віруса, тропність і кількісний вміст в органах і тканинах.

Висновки: 1. Імуногістохімічна діагностика ІБХ та хвороби Марека базується на двухетапному непрямому методі, який складається із послідовних етапів: відбору та фіксації матеріалу, отримання парафінових зрізів, зневоднення, блокування ендогенної пероксидази, демаскування антигенів, інкубації з сироватками, імунного забарвлення, дофарбовування і заключення гістологічних зрізів. Враховуючи специфічність досліджуваних органів, блокування активності ендогенної пероксидази проводили розчином пероксиду водню у метанолі. Оптимальними параметрами демаскування антигенів у мікрохвильовий печі була трикратна обробка зрізів по 5 хвилин при потужності печі 600-800 Вт. Безпосередній аналіз проводили за допомогою поліклональних специфічних до антигенів вірусу ІБХ та хвороби Марека первинних антитіл та вторинних антитіл проти IgG кроля, які мічені пероксидазою хрону. Для візуалізації імунного забарвлення використовували розчин 3,3-діамінобензидина тетрагідрохлорида, в результаті чого виявлялись ділянки з контрастним коричневим забарвленням.

2. Враховуючи лімфотропність віруса ІБХ найбільш виражене імунне забарвлення було виявлено у гістологічних зрізах клоакальної сумки, особливо у її зовнішньому кортикальному шарі, де відбувається созрівання і проліферація В-лімфоцитів, а також у селезінці. Нейротропність вірусу хвороби Марека, найбільш інформативно, проявилась в імунних забарвленнях гліальних клітин сірої речовини головного мозку.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Алиев А.С., Кудрявцев Ф.С., Джавадов М.И. Лабораторная диагностика инфекционного бурсита кур // Ветеринария. — 1990. — № 5. — С. 37–39.
2. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології / Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. – Житомир : Полісся, 2005. – 288 с.
3. Иммуноморфологические методы исследований. Под ред. Лефковитс И.И., Пернис Б.М. «Мир». – 1988. – 530 с.
4. Полак Д. Введение в иммуноцитохимию. Современные методы и проблемы

[Текст] / Полак Д., Ван Норден С. – М.: Мир, 1987. – 82 с. (Введення в імуноцитохімію. Сучасні методи та проблеми)
5. Смоленский В.И. Разработка средств специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни / Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России. — М., 1999. — Т. 2. — С. 244–248.
6. Сюрин В.Н., Диагностика вирусных болезней животных [Текст] : моногр. // Белоусова Р.В., Фомина Н.В.; – М.: Агропромиздат, 1991. – 528с. (Діагностика вірусних хвороб)
7. Яблонський, В.А. Проблеми біоетики у ветеринарній медицині: методична розробка / В.А. Яблонський, О.А. Яблонська; НАУ. – К.; ПП "Графіка", 2007. – 19 с.
8. Fan A.G., Nakane P.K. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies // J. Immunol Meth.-1981.-Vol.47.-P.129-141.
9. Kiernan J.A. Histological and histochemical methods: theory and practice.-New York: Pergamon Press, 1981.-81 p.
10. Hsu S.M. et al. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures // J. Histochem. Cytochem.-1981-Vol.29.-P.577-585.
11. Van Regenmortel MH, Joisson C, Wetter C. Comparative immunological methods [Text]: J. Methods Enzymol. – 1993. – V. 224. – P. 130-140. (Порівняльні імунологічні методи).

УДК 619:611.3:616-091.8:579.852.13:636.4

Гаркуша С. Є. кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ГІСТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В М'ЯЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ КАРДІАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ ШЛУНКА ПРИ КИШКОВОМУ КЛОСТРИДІОЗІ ПОРОСЯТ

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Ж. Г. Стегней

Серед інших хвороб свиней досить часто реєструються анаеробні інфекції, а саме – кишковий клостридіоз. В даній статті представлені результати гістологічних змін в м'язовій оболонці кардіальної частини шлунка поросят, що загинули від кишкового клостридіозу. Робота виконана на кафедрі патологічної анатомії Національного університету біоресурсів і природокористування України та у свинарських господарствах промислового типу Київської області. Успішна боротьба з кишковим клостридіозом можлива лише за умов комплексного вивчення різних сторін етіології, епізоотології, патогенезу, клінічної та патолого-анатомічної картин.