

ПАРАЗИТАРНІ ХВОРОБИ

УДК 636.92.09:616.98-07:578

Діагностика і диференційна діагностика вірусної геморагічної хвороби та еймеріозу кролів


Царенко Т.М.¹ , Папченко І.В.¹ , Антіпов А.А.¹ ,

Мазанний О.В.² , Корнієнко Л.Є.³ 

¹ Білоцерківський національний аграрний університет, м. Біла Церква

² Державний біотехнологічний університет, м. Харків

³ Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

 Кореспондентний автор: taras.m.tsarenko@gmail.com



Царенко Т.М., Папченко І.В., Антіпов А.А., Мазанний О.В., Корнієнко Л.Є. Діагностика і диференційна діагностика вірусної геморагічної хвороби та еймеріозу кролів. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2022. № 2. С. 42–54.

Tsarenko T., Papchenko I., Antipov A., Mazannyi O., Korniienko L. Diagnosis and differential diagnosis of viral hemorrhagic disease and eimeriosis of rabbits. *Nauk. visn. vet. med.*, 2022. № 2. PP. 42–54.

Рукопис отримано: 15.12.2022 р.

Прийнято: 23.12.2022 р.

Затверджено до друку: 27.12.2022 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2022-176-2-42-54

Галузь кролівництва в Україні є важливим сектором тваринництва, однак значну частину поголів'я кролів утримують у присадибних господарствах громадян. За умови відсутності системного ветеринарного обслуговування важливим є точна посмертна діагностика причин загибелі кролів у присадибних господарствах.

Еймеріоз кролів повсюдно виявляють в Україні і за змішаної кишкової та печінкової форми еймеріозу на тлі незадовільної годівлі й утримання у молодих кролів може стати причиною загибелі. Вірусна геморагічна хвороба кролів також поширена в Україні і є причиною загибелі кролів всіх вікових груп.

Було поставлено за мету вивчити патоморфологічні зміни за еймеріозу і вірусної геморагічної хвороби кролів та застосування лабораторних методів для підтвердження діагнозу.

Представлено результати патоморфологічної, копрологічної та лабораторної діагностики еймеріозу кролів. Полімеразну ланцюгову реакцію застосовували для підтвердження діагнозу на вірусну геморагічну хворобу кролів з одночасним визначенням генотипу збудника хвороби.

Встановлено ефективність використання додаткових методів посмертної діагностики еймеріозу (копрологічний, мікроскопічний) та вірусної геморагічної хвороби кролів (полімеразна ланцюгова реакція). У кролів, які загинули від геморагічної хвороби кролів інфекція була зумовлена вірусом першого типу.

Ключові слова: патолого-анатомічна діагностика, копроскопія, ПЛР, ураження печінки, *Eimeria. spp.*, RHDV.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Галузь кролівництва є поширена в усьому світі і нині нараховує понад 80 порід кролів різного напрямку продуктивності – хутрові, м'ясні тощо. В Україні розводять 12 порід кролів м'ясо-хутрового, хутрового та пухового напрямів [1].

Кролівництво є однією з перспективних галузей тваринництва з великим потенціалом до розвитку у агропромисловому секторі та у приватних, присадибних господарствах України. Кролівництво характеризується високими темпами відтворення поголів'я та швидкою окупністю інвестицій. Продукцією кролівництва є м'ясо кролів та цінні хутро і пух. Водночас

кролі невибагливі до кормової бази та технології утримання [1]. Традиційно кролі займають свою нішу серед інших видів продуктивних тварин, яких утримують у присадибних господарствах. Згідно з даними Державної служби статистики України [7], у період з 2011 до 2021 рр. у господарствах населення утримували від 5279,9 до 4365,5 тис. голів кролів. Тенденція до зниження поголів'я проявилась починаючи з 2015 року, водночас у промисловому кролівництві показник поголів'я за цей період зростає з 75,6 до 112,9 тис. голів. Попри тенденцію до скорочення загального поголів'я кролівництво залишається важливою галуззю агропромислового комплексу України.

Нині в Україні чисельність поголів'я кролів нараховує близько 5 млн, основна їх кількість зосереджена в підсобних господарствах населення, що обумовлює екстенсивні умови ведення галузі, за яких ветеринарне обслуговування не має систематичного прояву [7].

Еймеріоз (кокцидіоз) (англ. *Rabbit eimeriosis*) – це повсюдна протозойна інвазія тварин, що може негативно впливати на їх ріст і розвиток та спричинити значну смертність серед домашніх кролів [6, 11]. Питання збудника хвороби у кролів остаточно не вивчено, однак відомо що це внутрішньоклітинні паразити *Eimeria spp.* Зокрема у кролів розпізнають дві форми еймеріозу: печінковий та кишковий. Кишковий еймеріоз у дорослих кролів перебігає переважно легко, у яких формується носійство паразита, а у кролів до 6-міс. віку кишковий еймеріоз може мати значний вплив на здоров'я і зумовлювати їх загибель. Цьому сприяють ряд несприятливих чинників, зокрема незадовільні умови утримання, неповноцінна годівля тощо. Печінковий еймеріоз зумовлюють *Eimeria stiedae*, які спричиняють важкі пошкодження печінки, що зрідка можуть призводити до смерті кролів [2, 8, 15].

Прижиттєву діагностику еймеріозу зазвичай проводять за допомогою дослідження фекалій підозрюваних у захворюванні тварин. Рутинна діагностика кокцидіозу печінки у живих тварин може бути проведена за дослідження зразка фекалій та подальшого лабораторного дослідження для підтвердження виду еймерій [3, 17]. Дослідження мазків-відбитків є традиційним методом діагностики печінкового еймеріозу. Посмертна діагностика еймеріозу передбачає патолого-анатомічний метод із додатковим дослідженням фекалій та вмісту із осередків ураження еймеріями печінки. Також пропонують використовувати молекулярно-генетичне типування еймерій, виділених з печінки методом ПЛР для уточнення посмертного діагнозу [12].

Вірусна геморагічна хвороба кролів (ВГХК) (англ. *Rabbit hemorrhagic disease – RHD*) – висококонтагіозна вірусна хвороба, зумовлена РНК вірусом геморагічної хвороби кролів (англ. *Rabbit hemorrhagic disease virus – RHDV*) роду *Lagovirus* родини *Caliciviridae*. Хворіють домашні кролі та інші види європейських кролів *Oryctolagus cuniculus* у багатьох країнах світу, зокрема в Україні. За спалаху ВГХК рівень смертності кролів зазвичай коливається від 70 до 100 відсотків. Епізоотологічне значення мають два типи вірусу збудника геморагічної хвороби кролів – RHDV і RHDVa (перший тип) та RHDV2 (другий тип) [10].

Серологічна та генетична класифікація вірусу геморагічної хвороби кролів нині є предметом вивчення і в літературі зустрічається кілька підходів. Важливо зазначити, що раніше відомий і розповсюджений на території України штам RHDV та його варіанти (перший тип) у генетичному, антигенному, імунологічному і патогенному значенні значно відрізняється від штаму RHDV2 (другий тип), який вперше був виявлений у 2010 році у Франції та поширився по всьому світу. Між вірусами першого і другого типів немає перехресного імунітету і вакцини розроблені від першого типу вірусу геморагічної хвороби кролів не захищають тварин від захворювання у разі інфікування другим типом вірусу [3, 10].

Діагноз на ВГХК ставлять комплексно, на основі епізоотологічних даних, клінічних ознак, патолого-анатомічного розтину з обов'язковим лабораторним підтвердженням [9].

Мета роботи – вивчити патоморфологічні зміни за еймеріозу та вірусної геморагічної хвороби кролів та застосування методу ПЛР для уточнення діагнозу.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проводили у період 2020–2022 рр. на базі секційної зали лабораторії патологічної анатомії кафедри ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського, лабораторії паразитології кафедри паразитології та фармакології, науково-дослідної лабораторії новітніх методів (ІФА та ПЛР) Білоцерківського національного аграрного університету.

У дослідах використовували трупи кролів, які надходили на дослідження від приватних власників Київської області. Для досліджень було відібрано 10 трупів кролів, віком від 2 до 24 місяців з патолого-анатомічними ознаками, характерними для печінкового еймеріозу та вірусної геморагічної хвороби кролів.

Розтин трупів проводили за К.І. Скрябіним (1928) [4, 5] у загальноприйнятій послідовності. Під час проведення патолого-анатомічного розтину для гістологічних досліджень від кролів відбирали невеликі, товщиною не більше 2 см шматочки дванадцятипалої та голодної кишок. Відібраний патологічний матеріал фіксували у 10 % нейтральному розчині формаліну, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації і заключали у целоїдин. Серійні целоїдинові зрізи товщиною 5–15 мкм зафарбовували гематоксиліном і еозином та заключали у бальзам. Всього було виготовлено і проаналізовано 3 десятки гістопрепаратів. Мікрофотографування проводили з використанням мікроскопа «OLIMPUS CX 41» за збільшень $\times 30$, $\times 60$, $\times 100$, $\times 200$.

Для копрологічного дослідження на еймеріоз від трупів відбирали фекалії та вміст характерних утворень у печінці. Для дослідження на вірусну геморагічну хворобу кролів відбирали проби печінки у кількості 200–300 мкг.

Інтенсивність еймеріозної інвазії визначали через підрахунок кількості ооцист еймерій в 1 г фекалій за допомогою камери для копрологічних досліджень, розробленої науково-педагогічними працівниками Білоцерківського НАУ.

Загалом досліджено 10 проб фекалій. Належність видів ооцист еймерій встановлювали за таблицею (1965) та визначником Є.М. Хейсіна (1967) з урахуванням їх форми, кольору, довжини та ширини, наявності чи відсутності мікропіле, полярної гранули, залишкового тіла, а також тривалості перебігу препатентного і патентного періодів [5].

Дослідження наявності РНК вірусу геморагічної хвороби кролів у тканинах печінки проводили у Науково-дослідній лабораторії новітніх методів (ІФА та ПЛР) БНАУ. Проби печінки у кількості 200–300 мкл суспендували у стерильних пластикових пробірках за допомогою вортекса із додаванням 100–200 мкл стерильного ізотонічного розчину. Отриману суспензію використовували для виділення РНК за допомогою набору Pathogen Kit (Indical Bioscience, Німеччина) за протоколом виробника. Одержували 50 мкл розчину нуклеїнових кислот з кожного зразка, які використовували для отримання кДНК за допомогою протоколу із застосуванням реактиву Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase (#EP0441) (США). Зразки кДНК зберігали за температури -20°C в умовах лабораторії.

Реакційну суміш для проведення ампліфікації готували на основі комерційного ПЛР-міксу OneTaq NEB QuikLoad Master Mix (#M0486) (New England Biolabs, США). До 10 мкл Master Mix додавали по 2,5 мкл праймерів (F та R), 7 мкл деіонізованої води та 3 мкл

досліджуваної кДНК, робочий об'єм ампліфікації становив 25 мкл.

Для постановки ПЛР використовували пару праймерів для ідентифікації генів вірусу геморагічної хвороби кролів спільних для першого і другого типів (RHDV-F/RHDV-R) та пару праймерів специфічних лише для другого типу вірусу (Fra109F/Fra567R). Праймери обирали згідно з рекомендаціями референтної лабораторії МЕБ п геморагічної хвороби кролів (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia E Dell'emilia Romagna "Bruno Ubertini", Brescia, Італія) [18]. Для внутрішнього контролю наявності цільової ДНК у пробах додатково використовували праймери для ідентифікації видоспецифічної РНК кроля [14], позитивна реакція з цими праймерами підтверджувала коректне виділення РНК на першому етапі та утворення кДНК і наявність його у досліджуваній пробі. Олігонуклеотидні праймери були синтезовані фірмою Metabion (Німеччина) (табл. 1).

Для ампліфікації використовували термоциклер GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США), за наступних температурних режимів для всіх випадків: ($94^{\circ}\text{C} - 1\text{ хв}$) – 1 цикл, ($94^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$, $52^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$, $68^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$) – 40 циклів, ($68^{\circ}\text{C} - 5\text{ хв}$) – 1 цикл. Детекцію результатів ампліфікації проводили у 1X TBE буфері в 2 % агаровому гелі з додаванням 0,5 % етидіуму броміду. До першої та останньої лунок гелю додавали маркер молекулярної маси від 1517 до 100 п.н. з кроком у 100 п.н. (New England Biolabs, США) (NEB #B7025). Аналіз реакції проводили враховуючи наявність специфічної смуги напроти лунки з позитивним контролем і відповідної кількості пар нуклеотидів та відсутністю відповідної смуги напроти лунки з негативними контролями. Як позитивні контролю використовували раніше досліджені позитивні проби кДНК від кролів. Як негативний контроль на етапі виділення і внесення використовували проби, у яких розчин кДНК у реакційній суміші був замінений на деіонізовану воду.

Таблиця 1 – Олігонуклеотидні праймери використані у дослідженні

Праймер	Послідовність нуклеотидів	Температура плавлення (T _m), °C	Використана температура відпалу (T _a), °C	Розмір продукту ампліфікації, п.н.
RHDV-F	5'-CCTGTTACCATCACCATGCC -3'	60	52	348
RHDV-R _{new}	5'-CAAGTTCARTGSCTGTTGCA -3'	60		
Fra109-F	5'- ACTACTAGCGTGGTCACCACC -3'	63	52	481
Fra567-R	5'- TTGTTATAAACGCTCAGGACCAAC -3'	62		
RS_F	5'-CAAAAGTAAGCTCAATTACCACCGTA-3'	63	52	110
RS_R	5'- ATAAGGGCTTTCGTATATTCGGAA-3'	60		

Результати дослідження. В результаті проведених досліджень було встановлено патолого-анатомічні зміни, що відповідають печінковому еймеріозу та вірусній геморагічній хворобі кролів, виявлені еймерії у фекаліях і печінці кролів та встановлено інфікування кролів вірусом геморагічної хвороби кролів.

Патолого-анатомічні зміни. За результатами патолого-анатомічного дослідження у 5 трупів кролів із 10 були виявлені ознаки вірусної геморагічної хвороби кролів. Водночас у 3 із них спостерігали печінкову форму еймеріозу. У двох трупах виявили кишкову форму еймеріозу, ще у двох – асоційований кишковий і печінковий еймеріоз, у одного – катаральний риніт і двосторонню гостру катаральну бронхопневмонію без ознак еймеріозу і вірусної геморагічної хвороби кролів (табл. 2).

Трупи кролів, які загинули від кишкової форми еймеріозу були незадовільної вгодованості або виснажені. Шерстний покрив скуйовджений, тьмяний, а в ділянці анального отвору забруднений рідкими фекаліями. Слизові оболонки мали переважно сірий колір. Жирові відкладення в підшкірній клітковині були відсутні, а скелетні м'язи значною мірою піддалися атрофії.

Легені мали червонувато-сіре забарвлення, еластичні, місцями виділялись невеликі світліші вираження альвеолярної емфіземи (наслідок загальної анемії). На розрізі легені такого ж кольору як ззовні, помірно вологі, малокровні, малюнок виражений.

Серце збільшене через розширення правої половини. Епікард гладенький, блискучий. Серце не однотонно забарвлене в сіро-черво-

ний, а місцями в сірий колір. В порожнині серця містилась невелика кількість згорнутої крові темно-червоного кольору. Міокард зів'ялої консистенції, дещо сухуватий, забарвлений, як і зовні, малюнок стертий.

Печінка не збільшена, не однотонно забарвлена в коричневий, світло-коричневий і червоно-коричневий колір. На розрізі вона забарвлена як і ззовні, помірно волога, малюнок не виражений. Жовчний міхур містив невелику кількість густої жовчі темно-зеленого кольору.

Селезінка не збільшена, капсула її злегка зморшкувата, на розрізі паренхіма темно-червона, помірно волога, малюнок не виражений.

Нирки не збільшені, злегка зів'ялої консистенції, не однотонно забарвлені в коричневий і світло-коричневий колір. На розрізі кіркова речовина забарвлена, як і зовні, а мозкова – сіро-червонувата, помірно волога, малюнок стертий.

Шлунок містив невелику кількість корму кашоподібної консистенції. Слизова оболонка шлунка сірого кольору, вкрита значною кількістю сірого слизу.

Тонкий кишечник, меншою мірою товстий – наповнені газами. Стінка тонкого кишечника потоншена, особливо в передній її частині. В просвіті тонкого кишечника містилась невелика кількість рідкого хімусу сірого кольору з домішками слизу. Слизова оболонка в передній частині майже позбавлена епітеліального покриву, а в міру віддалення від шлунка набула нерівного злегка горбистого рельєфу. Колір слизової оболонки був сірий або сіро-червонуватий. В товстому кишечнику містились не сформовані фекалії сіро-зеленого кольору, а слизова оболонка мала сіре забарвлення.

Таблиця 2 – Патолого-анатомічні зміни у досліджених трупах кролів

Номер трупа кроля	Патзміни характерні для кишкового еймеріозу	Патзміни характерні для печінкового еймеріозу	Патзміни характерні для вірусної геморагічної хвороби кролів
1	наявні	відсутні	відсутні
2	відсутні	наявні	наявні
3	відсутні	наявні	наявні
4	наявні	наявні	відсутні
5	наявні	наявні	відсутні
6	відсутні	відсутні	наявні
7	відсутні	наявні	наявні
8	відсутні	відсутні	наявні
9	наявні	відсутні	відсутні
10	відсутні	відсутні	відсутні

За асоційованого кишкового і печінкового еймеріозу у трупів кролів спостерігали додатково специфічні вclusions у печінці, печінка була помірно збільшена. У трьох трупів, які загинули від вірусної геморагічної хвороби під капсулою печінки також виявили поодинокі сіро-жовтуваті вузлики різної форми, які мали чіткі контури. Видаливши їх з паренхіми печінки кінчиком скальпеля, виявили, що вони інкапсульовані. Такі утворення були відібрані для мікроскопічного дослідження (рис. 1).

Однак, у цих трупів патолого-анатомічна картина відрізнялась від попередньо описаної. Трупи кролів були доброї вгодованості без ознак виснаження та атрофії скелетної мускулатури, про що свідчили відкладання жиру у підшкірній клітковині, сальнику, брижі кишечника та під епікардом. Характерною була поза трупа кроля, а саме кінцівки випрямлені, голова завернута на спину (явище опістотону), що проявляється внаслідок впливу вірусу на нервову систему (рис. 2).

У двох кролів шерстяний покрив у ділянці мордочки був забруднений кров'янистими виділеннями із носових отворів. Це пов'язано, ймовірно, з інтенсивним застоєм крові в слизовій оболонці носової порожнини, розривом стінок кровоносних судин та проявом носової кровотечі.

Типовими змінами для усіх досліджених трупів з підозрою на вірусну геморагічну хво-

робу кролів були виражений застій крові в легенях, трахеї, у нирках, печінці і селезінці (рис. 3).

Легені забарвлені в темно-червоний колір різної інтенсивності, тістоподібної консистенції, на розрізі такого ж кольору, вологі, за натискання на них із судин виділяється кров, а із бронхів світла піниста рідина. Часто така піниста рідина заповнює просвіт трахеї. Слизова оболонка трахеї набуває різної інтенсивності темно-червоного кольору, як наслідок застою венозної крові в судинах підслизової основи. У двох кролів у діафрагмальних частинах легень були виявлені плямисті крововиливи (рис. 4).

Серце загіблених кролів мало ознаки зернистої дистрофії. Воно було збільшене через розширення правої половини і набувало округлої форми. Як ззовні, так і на розрізі змінилось забарвлення від сіро-червоного до сірого кольору. Сірі ділянки мали не чіткі, розмиті контури. Природний малюнок міокарда не виражений. В порожнинах серця містилась значна кількість темно-червоної крові.

Печінка у кролів була не збільшена, пружної або злегка зів'ялої консистенції. За інтенсивного застою крові вона набувала темно-червоного кольору, за менш інтенсивного – була не однотонно забарвлена в темно-червоний, коричневого і світло-коричневий колір (рис. 5). На розрізі печінка волога або помірно волога і мала такий колір як ззовні, малюнок не виражений. Жовчний міхур містив помірну кількість жовчі темно-зеленого кольору.

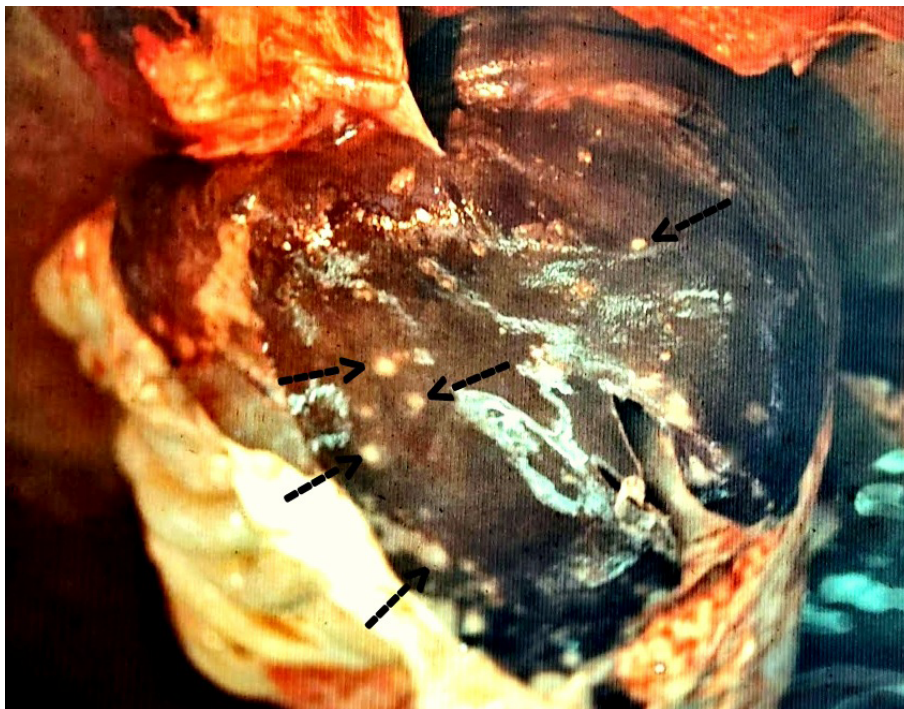


Рис. 1. Инкапсульовані некрози в печінці кролів за печінкового еймеріозу (вказані стрілками).



Рис. 2. Положення трупа кроля (явище опістотону), який загинув від вірусної геморагічної хвороби кролів.

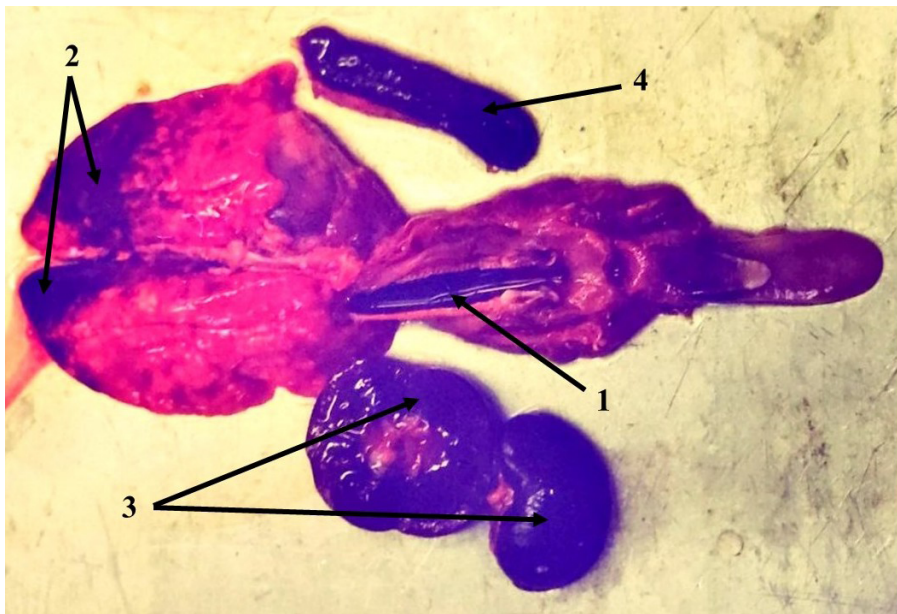


Рис. 3. Інтенсивно виражений застій крові в трахеї (1), легенях (2), нирках (3), селезінці (4).

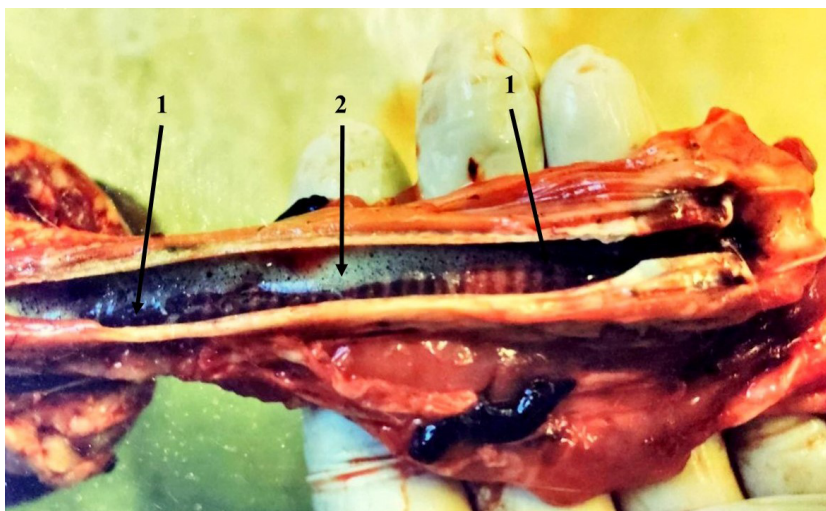


Рис. 4. Застій крові в трахеї (1) і наявність у ній пінистої рідини (2).



Рис. 5. Застій крові в печінці кроля.

Нирки не збільшені, пружної консистенції, забарвлені в темно-коричневий колір. На розрізі помірно вологі, кіркова речовина темно-коричнева, а мозкова – темно-червона, малюнок не виражений. Селезінка не збільшена, краї її загострені, злегка зів'ялої консистенції, на розрізі темно-червона, волога, малюнок не виражений.

Під час дослідження головного мозку і носової порожнини спостерігали інтенсивне кровонаповнення судин оболонок мозку і слизової оболонки носової порожнини (рис. 6).

Зміни у шлунку та кишечнику у більшості кролів з ознаками вірусної геморагічної хвороби кролів були відсутні.

Гістологічні зміни. Для виявлення прояву деструктивних змін за еймеріозу кролів на мікроскопічному рівні було відібрано фрагменти тонкого кишечника в передній, середній і задній його частинах. Результати дослідження показали, що найбільш деструктивних змін зазнала передня частина тонкого кишечника. Епітеліальний покрив повністю відсутній, залишились лише розпушені підслизова і м'язова оболонки (рис. 7).

У середній і задній частинах тонкого кишечника епітеліальний покрив також був повністю зруйнований, але на його місці розташовані нашарування фібрину, інфільтровані клітинами крові (лейкоцитами) і сполучнотканного походження.



Рис. 6. Застій крові в оболонках мозку (1) та слизовій оболонці носової порожнини (2).

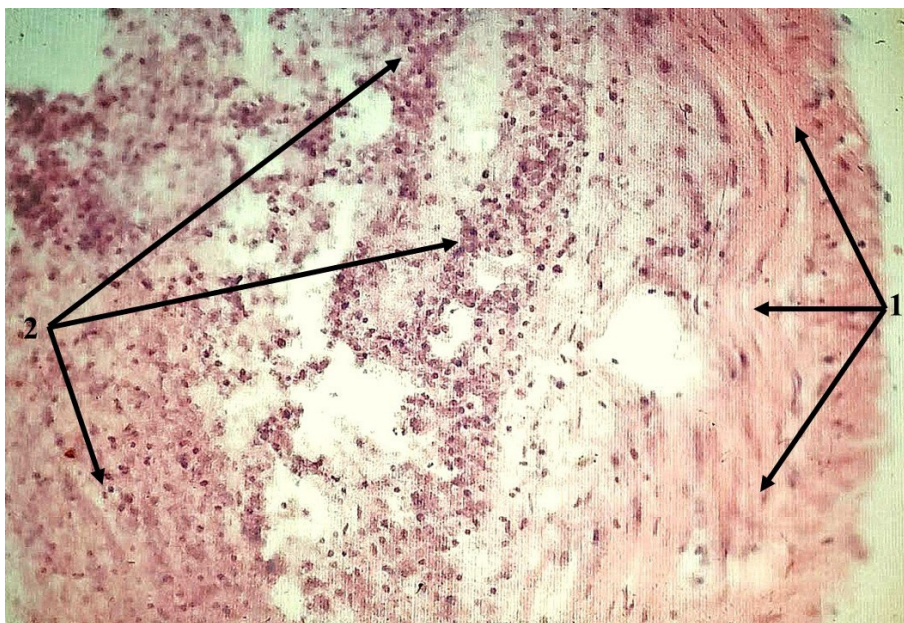


Рис. 7. Повне руйнування слизової оболонки тонкого кишечника кроля за еймеріозу (1 – м'язова оболонка; 2 – білково-некротичний детрит, збільшення 10 x 20).

Копрологічні та мікроскопічні дослідження. Проведені дослідження копрологічного матеріалу, відібраного від трупів 2 кролів з ознаками кишкової форми еймеріозу виявили ооцисти еймерій (рис. 8). Видовий склад представлено трьома видами еймерій, а саме: *Eimeria stiedae*, *Eimeria perforans*, *Eimeria magna*. Серед еймерій були ідентифіковані види *Eimeria stiedae* у більше ніж 80,0 % проб та *Eimeria perforans* і *Eimeria magna* меншою

мірою. Інтенсивність інвазії коливалась від 0,5 до 15 тис. ооцист в 1 г фекалій.

У 3 кролів, які загинули з ознаками вірусної геморагічної хвороби в інкапсульованих утвореннях вилучених із печінки виявили масу ооцист (рис. 9).

За мікроскопії вмісту некротичних вузликів також виявили наявність еймерій переважно виду *Eimeria stiedae*.

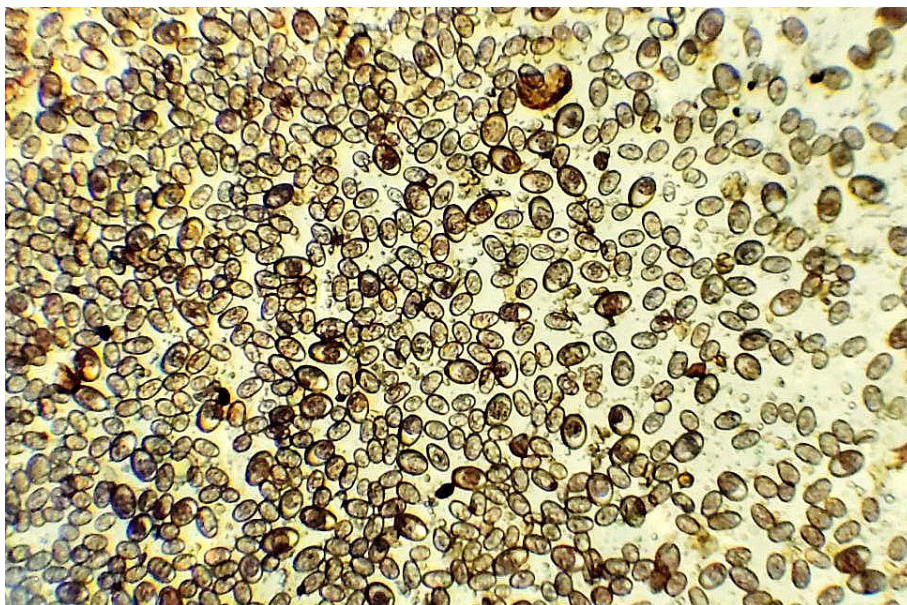


Рис. 8. Ооцисти еймерій в нативному мазку із фекалій з прямої кишки трупів кроля (збільшення 7x20).

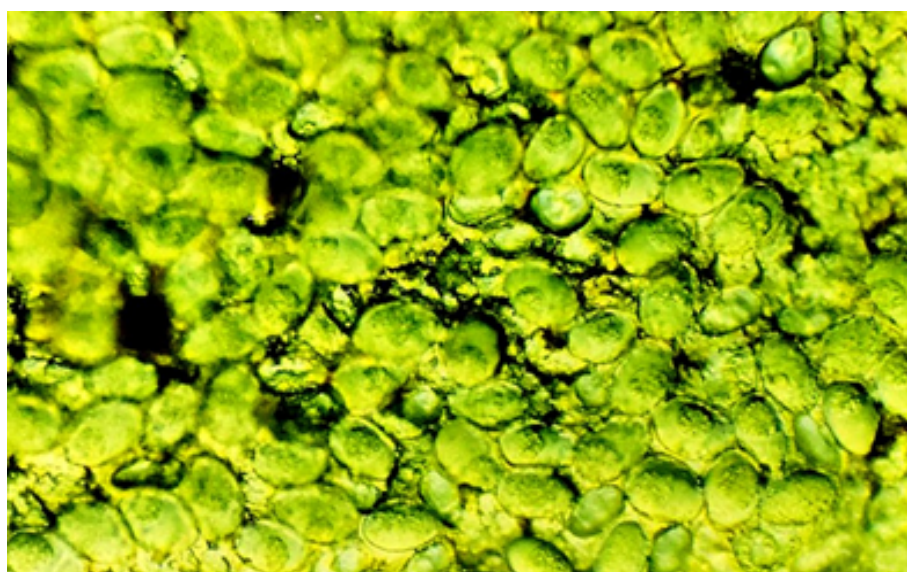


Рис. 9. Ооцисти еймерій у інкапсульованій некротичній масі з печінки кроля (збільшення 7x40).

Молекулярно-генетичні дослідження. Виявлення РНК вірусу в печінці кролів методом ПЛР дозволило встановити остаточний діагноз на вірусну геморагічну хворобу кролів.

На першому етапі молекулярно-генетичних досліджень було проведено ПЛР з праймерами специфічними до 12S мітохондріальної rRNA гена кроля (*Oryctolagus cuniculus*) з кДНК отриманих із зразків печінки від трупів кролів. В усіх 10 досліджуваних зразках на електрофореграмі було ідентифіковано специфічні смужки на рівні 110 пар нуклеотидів, що свідчить

про задовільне виділення нуклеїнових кислот, зокрема РНК із зразків (рис. 10).

Результати ПЛР із праймерами специфічними до ділянки гена VP60 вірусу геморагічної хвороби кролів (RHDV-F/RHDV-Rnew), які ампліфікують всі відомі варіанти відповідного вірусу, першого типу (RHDVa, RHDV) і другого типу (RHDV2) показали наявність РНК вірусу у пробах від трупів № 6–10, та її відсутність у пробах № 1–5, відповідно за наявністю і відсутністю специфічної смужки довжиною 348 п.н. (рис. 11).

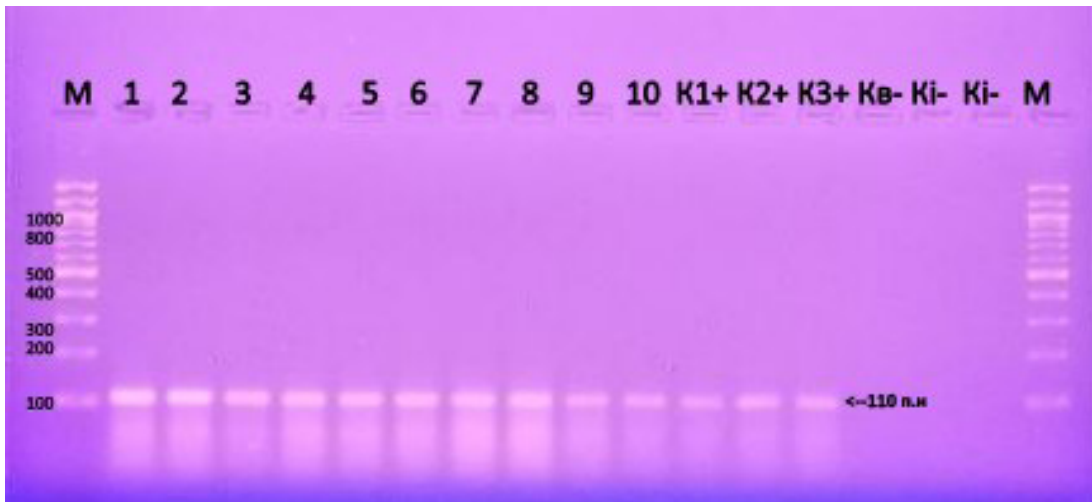


Рис. 10. Електрофореграма продуктів ампліфікації специфічної для кролів РНК (1–10 – досліджувані проби; K1, K2, K3 – позитивні контролю, Kв– – негативний контроль внесення; Ki– – негативний контроль виділення РНК).

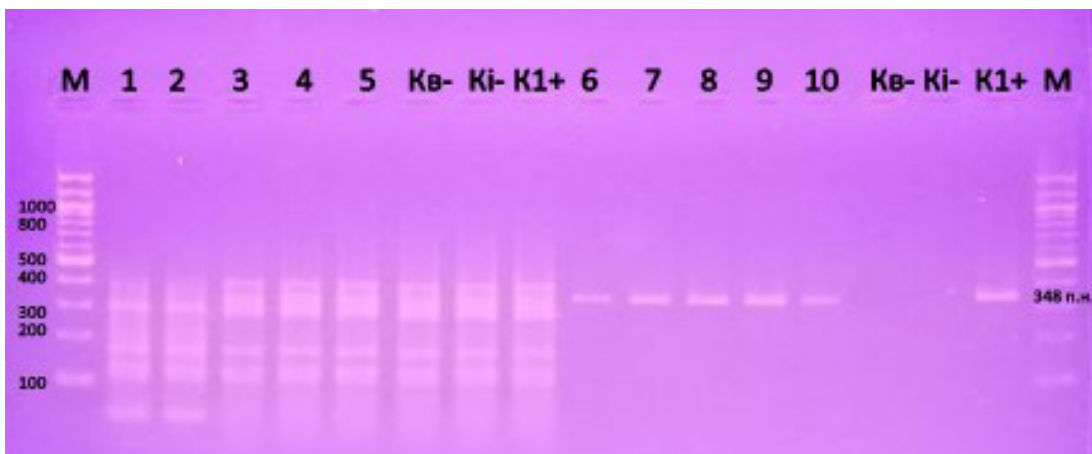


Рис. 11. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянки гена VP60 вірусу геморагічної хвороби кролів (1–10 – досліджувані проби; Kв– – негативний контроль внесення; Ki– – негативний контроль виділення РНК; K1+ – позитивний контроль).

Дослідження у ПЛР проб кДНК із праймерами Fga109F/Fga567R, які ампліфікують лише специфічну ділянку вірусу геморагічної хвороби кролів другого типу (RHVD2), показало відсутність у всіх пробах специфічних продуктів ампліфікації (фрагмент у 481 п.н.).

Обговорення. Особливості присадибного кролівництва в Україні визначають відсутність системного ветеринарного обслуговування і невчасної профілактики хвороб кролів. У таких умовах посмертна діагностика хвороб кролів набуває особливого значення. Патолого-анатомічний метод дослідження є достатньо інформативним, щоб встановити підозру на інфекційні інвазійні хвороби кролів. Разом із

знанням епізоотичної ситуації у регіоні це дає змогу комплексно встановлювати попередній діагноз, однак у будь-якому випадку діагноз на інфекційні та інвазійні хвороби потребує лабораторного підтвердження з ідентифікацією збудника хвороби [3].

Хвороби кролів, які розглянуто у цьому дослідженні, повсюдно поширені у присадибних господарствах з вирощування кролів в Україні, також зустрічаються у дикій природі [13]. Водночас із патолого-анатомічним розтином для встановлення посмертного діагнозу важливо використовувати додаткові методи дослідження [16].

Дослідження трупів кролів, які надходили до секційної зали ФВМ БНАУ показали, що попередньо встановлений патолого-анатомічний діагноз на кишковий і печінковий еймеріоз підтверджується копрологічними дослідженнями та дослідженнями вмісту інкапсульованих некротичних осередків, у яких мікроскопічно ідентифіковано еймерії.

Еймеріоз більше небезпечний для молодих кролів, особливо за незадовільної годівлі та утримання. Кишковий еймеріоз зумовлює ураження кишечника, поглиблює виснаження кролів та в кінцевому результаті призводить до загибелі тварини, яка знаходиться у стані виснаження та інтоксикації. За значної інтенсивності інвазії та ураження *Eimeria stiedae* у кролів розвивається печінковий еймеріоз, який виражається в утворенні некротичних інкапсульованих осередків під капсулою печінки, які містять велику кількість еймерій. У дорослих кролів печінковий еймеріоз може не призводити до загибелі.

Вірусна геморагічна хвороба кролів уражує невакцинованих кролів і найчастіше призводить до їх загибелі. Патолого-анатомічні зміни за цієї хвороби характеризуються ураженням органів дихання та внутрішніх органів і нервової системи. Хоча здебільшого такі зміни є характерними і їх легко ідентифікувати, за блискавичного перебігу хвороби або з інших причин патолого-анатомічні ознаки можуть бути виражені слабо. У таких випадках особливо важливим є диференційна діагностика від хвороб, які перебігають із ураженням органів дихання та внутрішніх органів, зокрема печінки. Дослідження вказують, що метод ПЛР є швидким і точним методом посмертної діагностики геморагічної хвороби кролів. Водночас за використання апробованих праймерів можливо не лише встановити остаточний діагноз, а також диференціювати перший і другий типи збудника, що має важливе епізоотологічне значення. У наших дослідженнях встановлено лише наявність у позитивних пробах РНК вірусу геморагічної хвороби кролів першого типу.

Інвазія дорослих кролів печінкової форми еймеріозу рідко призводить до загибелі тварин, про що свідчить наявність таких осередків у печінці частини кролів, що загинули від вірусної геморагічної хвороби, яка слугувала причиною загибелі.

Висновки.

1. Дослідження трупів кролів виявили характерні патолого-анатомічні зміни для кишкової й печінкової форм еймеріозу та вірусної геморагічної хвороби кролів, а також їх асоційований перебіг. Методами копрологічних, мі-

кроскопічних і молекулярно-генетичних досліджень відповідні діагнози були підтверджені та показано їх ефективність за комплексного використання.

2. Вірусну геморагічну хворобу кролів діагностують посмертно за результатами патолого-анатомічного розтину та методом ПЛР. Важливим для з'ясування епізоотичної ситуації та перспективи використання відповідних вакцин є встановлення за результатами молекулярно-генетичних досліджень належності збудника хвороби до 1-го або 2-го типів. У дослідженні трупів кролів був виявлений вірус геморагічної хвороби кролів лише 1-го типу, що вказує на його циркуляцію у присадибних господарствах Київської області.

3. Мікроскопічні дослідження вмісту кишечника і уражених тканин печінки трупів кролів у комплексі із патолого-анатомічними дослідженнями дозволяють встановити остаточний діагноз на еймеріоз у кишковій або печінковій формах прояву.

4. Виявлення еймерій у фекаліях або печінці кролів не завжди вказують на причину смерті, а лише за наявності характерних для еймеріозу патолого-анатомічних змін у кишечнику та виснаження. Зокрема, наявність печінкової форми еймеріозу у кролів задовільної вгодованості не слід вважати за причину їх загибелі, якщо інші патолого-анатомічні зміни і результати ПЛР-дослідження підтверджують вірусну геморагічну хворобу кролів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Власенко І.В. Кролівництво – резерв в забезпеченні продовольчої безпеки держави. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. 2012. № 2–4. С. 15–18.
2. Гаврилiна О.Г., Колесник А.О. Особливості лабораторної діагностики еймеріозу кролів. Науково-технічний бюлетень Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. 2016. № 4. С. 55–58.
3. Інфекційні та інвазійні хвороби кролів/ Л.Є. Корнієнко та ін. Біла Церква, 2003. 288 с.
4. Патолого-анатомічний розтин трупів сільськогосподарських тварин з основами судової ветеринарії: методичні рекомендації для студентів освітнього рівня – магістр та слухачів Інституту післядипломного навчання/І.В. Папченко та ін. Біла Церква. 2019. 47 с.
5. Патолого-анатомічні зміни за еймеріозу кролів: матеріали II Міжнародної наукової конференції «Традиційні та інноваційні підходи до наукових досліджень» м. Одеса (10 вересня 2021 р.) / І.В. Папченко та ін. Вінниця: «Європейська наукова платформа», 2021. С. 89–92.

6. Розповсюдження та клінічна картина при еймеріозі кролів/ М.В. Сімоненко та ін. Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: зб. наук. праць. Біла Церква, 2002. Вип. 21. С. 196–198.

7. Тваринництво України 2020. Статистичний збірник. Держана служба статистики. 2021. С. 53–59.

8. Франчук Л.О. Поширення та форми перебігу змішаної еймеріозної інвазії у кролів. Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки: зб. наук. пр. 2010. Вип. 56. С. 148–153.

9. Abrantes J., Lopes A.M. A Review on the Methods Used for the Detection and Diagnosis of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Microorganisms*. 2021. Vol. 9. no. 5. P. 972–982. DOI:10.3390/microorganisms9050972.

10. Abrantes J., van der Loo W., Le Pendu J., Esteves P.J. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet. Res.* 2012. Vol. 43. no.1. P. 12–22. DOI:10.1186/1297-9716-43-12.

11. El-Akabawy L.M., Zayan K.A., Tantawy A.A., Omar Rem. Anticoccidial efficacy of propolis and toltrazuril against *Eimeria stiedae* in New Zealand white rabbit's. *Zag. Vet. J.* 2004. Vol. 32. no.1. P. 129–145.

12. Molecular diagnosis of *Eimeria stiedae* in hepatic tissue of experimentally infected rabbits/ K.M. Hassan et al. *Exp. Parasitol.* 2016. no. 169. P. 1–5. DOI:10.1016/j.exppara.2016.07.001.

13. Kim D.Y., Reilly T.J., Schommer S.K., Spagnoli S.T. Rabbit tularemia and hepatic coccidiosis in wild rabbit. *Emerg. Infect. Dis.* 2010. Vol. 16. no. 12. P. 2016–2017. DOI:10.3201/eid1612.101013.

14. Polymerase chain reaction detection of rabbit DNA in food and animal feed/I. Martin et al. *World Rabbit Science.* 2009. no.17. P. 27–34. DOI:10.4995/wrs.2009.667.

15. Oncel T., Gulegen E., Senlik B., Bakirci S. Intestinal coccidiosis in angora rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Eimeria intestinalis*, *Eimeria perforans* and *Eimeria coecicola*. *YYU Vet. Fak. Derg.* 2011. no. 22. P. 27–29.

16. Sivajothi S., Reddy B.S., Rayulu V.C. Study on impression smears of hepatic coccidiosis in rabbits. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology.* 2016. Vol. 40. no. 3. P. 906–909. DOI:10.1007/s12639-014-0602-8.

17. Sivajothi S., Reddy B.S., Rayulu V.C. Intestinal coccidiosis infection in domestic rabbits. *Inter. J. Biol. Res.* 2013. Vol. 2. no. 2. P. 48–50.

18. Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain/R. Velarde et al. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2017. Vol. 64. no. 6. P. 1750–1761. DOI:10.1111/tbed.12562.

REFERENCES

1. Vlasenko, I.V. (2012). Krolivnytstvo – rezerv v zabezpecheni prodovolchoi bezpeky derzhavy [Rabbit breeding – a reserve in ensuring food security of

the state]. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii imeni S.Z. Gzhytskoho* [Scientific Bulletin of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after S.Z. Grzycki]. no. 2-4, pp. 15–18. (in Ukrainian).

2. Gavrylina, O.G., Kolesnyk, A.A. (2016). Osoblyvosti laboratornoi diahnostryky eimeriozu kroliv [Features of laboratory diagnosis of rabbit eimeriosis]. *Naukovo-tekhnichnyi biuletyn Naukovo-doslidnoho tsentru biobezpeky ta ekolohichnoho kontroliu resursiv APK* [Scientific and Technical Bulletin of the Research Center for Biosafety and Environmental Control of Agricultural Resources]. no. 4, pp. 55–58. (in Ukrainian).

3. Kornienko, L.E. (2003). Infektsiini ta invaziini khvoroby kroliv [Infectious and invasive diseases of rabbits]. *Bila Tserkva*, 288 p. (in Ukrainian).

4. Papchenko I.V. (2019). Patoloho-anatomichni roztytn trupiv silskohospodarskykh tvaryn z osnovamy sudovoi veterynarii: metodychni rekomendatsii dlia studentiv osvithnoho rivnia – mahistr ta slukhachiv Instytutu pisljadiplomnoho navchannia [Pathological and anatomical autopsy of farm animals with the basics of forensic veterinary medicine: methodical recommendations for students of educational level - master and students of the Institute of Postgraduate Studies]. *Bila Tserkva*, 47 p. (in Ukrainian).

5. Papchenko, I.V. (2021). Patoloho-anatomichni zminy za eimeriozu kroliv: Materialy II Mizhnarodnoi naukovoï konferentsii «Tradytiini ta innovatsiini pidkhody do naukovykh doslidzhen» [Pathological and anatomical changes in eimeriosis of rabbits: proceedings of the II International Scientific Conference "Traditional and innovative approaches to scientific research"]. *Odesa* (September 10, 2021): "European Scientific Platform". pp. 89–92. (in Ukrainian).

6. Simonenko, M.V. (2002). Rozpovsiudzhennia ta klinichna kartyna pry eimeriozi kroliv [Distribution and clinical picture of rabbit eimeriosis]. *Visnyk Bilotserkiv. derzh. ahrar. un-tu: zb. nauk. Prats* [Bulletin of Bila Tserkva State Agrarian University: collection of scientific works]. *Bila Tserkva*, Issue 21, pp. 196–198. (in Ukrainian).

7. Tvarynnytstvo Ukrainy 2020 [Livestock of Ukraine 2020]. *Statystychnyi zbirnyk* [Statistical collection]. *Derzhana sluzhba statystyky* [State Statistics Service]. 2021, pp. 53–59. (in Ukrainian).

8. Franchuk, L.O. (2010). Poshyrennia ta formy perebihu zmishanoi eimerioznoi invazii u kroliv [Distribution and forms of mixed eimeria infection in rabbits]. *Ahrarnyi visnyk Prychornomoria. Veterynarni nauky: zb. nauk. pr.* [Agrarian Herald of the Black Sea region. Veterinary Sciences: collection of scientific articles]. Issue 56, pp. 148–153. (in Ukrainian).

9. Abrantes, J., Lopes, A.M. (2021). A Review on the Methods Used for the Detection and Diagnosis of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Microorganisms*. Vol. 9, no. 5, pp. 972–982. DOI:10.3390/microorganisms9050972.

10. Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., Esteves, P.J. (2012). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus

(RHDV) a review. *Vet. Res.* Vol. 43, no. 1, pp. 12–22. DOI:10.1186/1297-9716-43-12.

11. El-Akabawy, L.M., Zayan, K.A., Tantawy, A.A., Omar, Rem. (2004). Anticoccidial efficacy of propolis and toltrazuril against *Eimeria stiedae* in New Zealand white rabbit's. *Zag. Vet. J.* Vol. 32, no.1, pp. 129–145.

12. Hassan, K.M. (2016). Molecular diagnosis of *Eimeria stiedae* in hepatic tissue of experimentally infected rabbits. *Exp. Parasitol.* Vol. 169, pp. 1–5. DOI:10.1016/j.exppara.2016.07.001.

13. Kim, D.Y., Reilly, T.J., Schommer, S.K., Spagnoli, S.T. (2010). Rabbit tularemia and hepatic coccidiosis in wild rabbit. *Emerg. Infect. Dis.* Vol. 16, no. 12, pp. 2016–2017. DOI:10.3201/eid1612.101013.

14. Martin, I. (2009). Polymerase chain reaction detection of rabbit DNA in food and animal feed. *World Rabbit Science.* no. 17, pp. 27–34. DOI:10.4995/wrs.2009.667.

15. Oncel, T., Gulegen, E., Senlik, B., Bakirci, S. (2011). Intestinal coccidiosis in angora rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Eimeria intestinalis*, *Eimeria perforans* and *Eimeria coecicola*. *YYU Vet. Fak. Derg.* no. 22, pp. 27–29.

16. Sivajothi, S., Reddy, B.S., Rayulu, V.C. (2016). Study on impression smears of hepatic coccidiosis in rabbits. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology.* Vol. 40, no. 3, pp. 906–909. DOI:10.1007/s12639-014-0602-8.

17. Sivajothi, S., Reddy, B.S., Rayulu, V.C. (2013). Intestinal coccidiosis infection in domestic rabbits. *Inter. J. Biol. Res.* Vol. 2, no. 2, pp. 48–50.

18. Velarde, R. (2017). Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain. *Transboundary and Emerging Diseases.* Vol. 64, no.6, pp. 1750–1761. DOI:10.1111/tbed.12562.

Diagnosis and differential diagnosis of viral hemorrhagic disease and eimeriosis of rabbits

Tsarenko T., Papchenko I., Antipov A., Mazanyni O., Korniienko L.

The rabbit breeding industry in Ukraine is an important element of animal husbandry, most of the rabbits are in private households. In the absence of systematic veterinary care, accurate postmortem diagnosis of the causes of death of rabbits in households is important.

Rabbit eimeriosis is widespread in Ukraine and with mixed intestinal and hepatic forms of eimeriosis against the background of unsatisfactory feeding and maintenance in young rabbits can cause death. Viral hemorrhagic disease of rabbits is also common in Ukraine and causes the death of rabbits of all ages.

The aim was to study the pathomorphological changes in eimeria and viral hemorrhagic disease of rabbits and the use of other methods to confirm the diagnosis.

The article presents the results of pathological, coprological and microbiological diagnosis of rabbit eimeriosis. Polymerase chain reaction was used to confirm the diagnosis of viral hemorrhagic disease of rabbits with the simultaneous establishment of the genotype of the pathogen.

The effectiveness of the use of additional methods of postmortem diagnosis of eimeria (coprological, microscopic) and viral hemorrhagic disease of rabbits (polymerase chain reaction) was established. In rabbits that died from rabbit hemorrhagic disease the infection was caused by the virus of the first type.

Key words: pathological and anatomical diagnosis, coproscopy, PCR, liver damage.



Copyright: Царенко Т.М. та ін. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Царенко Т.М.

<https://orcid.org/0000-0003-4373-5958>

Папченко І.В.

<https://orcid.org/0000-0003-2476-8770>

Антипов А.А.

<https://orcid.org/0000-0003-3955-3377>

Мазанний О.В.

<https://orcid.org/0000-0002-4442-4011>

Корнієнко Л.Є.

<https://orcid.org/0000-0002-6962-8272>