

ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 619:616.992.28-07:636.52/.58(476)

Проведення комплексного мікологічного контролю для попередження виникнення аспергільозу у курчат

Тишківська Н.В.¹ , Лясота В.П.¹ , Тишківська А.М.² ,
Тишківський М.Я.¹ , Черниш І.О.¹ 

¹ Білоцерківський національний аграрний університет

² Національний університет біоресурсів і природокористування України

 Тишківська Н.В. natalya_tyshkivska@ukr.net



Тишківська Н.В., Лясота В.П., Тишківська А.М., Тишківський М.Я., Черниш І.О. Проведення комплексного мікологічного контролю для попередження виникнення аспергільозу у курчат. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2021. № 1. С. 92–103.

Tyshkivska N., Lyasota V., Tyshkivska A., Tyshkivsky M., Chernysh I. Conducting a comprehensive mycological study to prevent the occurrence of aspergillosis in chickens. Nauk. visn. vet. med., 2021. №1. PP. 92–103.

Рукопис отримано: 19.04.2021 р.

Прийнято: 01.05.2021 р.

Затверджено до друку: 25.05.2021 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2021-165-1-92-103

Захворювання птиці на аспергільоз реєструють у багатьох птахівничих господарствах, причинами виникнення захворювання є порушення санітарно-гігієнічних умов інкубаторіїв та пташників (несприятливий мікроклімат, уражені корми та підстилка мікроскопічними грибами). Щоб запобігти розвитку інфекції, необхідно контролювати забруднення повітря та обладнання в інкубаторіях; визначати показники безпечності кормів та води (рівень їх мікологічного обміненія) у пташниках; стежити за станом кормосховищ і системи водопостачання.

За результатами мікологічного дослідження патологічного матеріалу у 15,1 % загинувих курчат у віці від 3 до 5 днів та 6,6 % – віком 7–10 днів було встановлено діагноз аспергільоз.

Із легень загинувих курчат виділяли *Aspergillus flavus* (47 %), *Aspergillus fumigatus* (34,5 %), *Aspergillus niger* (10 %).

Макроскопічно виявляли набряк та гіперемію легень у курчат 3–5-добового віку. Утворення гранульом у легенях та серозних оболонках виявлено не було, що може свідчити про гостру форму перебігу патологічного процесу. У курчат 7–10-добового віку спостерігали сильне потовщення повітряно-носних мішків, легені з множинними сферичними гранульомами діаметром до 2 мм. Спори грибів, потрапляючи у легені, зумовлюють місцеву запальну реакцію – гостру пневмонію.

Гістологічно у курчат 3–5-добового віку виявлено потовщення стінки парабронхів через гіперплазію локальних лімфоїдних утворень (що забезпечують місцевий імунітет), ознаки розвитку інтерстиційної пневмонії. У паренхімі виявлено патогномонічну ознаку – утворення гігантських багатоядерних клітин, що є характерною ознакою мікотичних інфекцій у птиці. Злиття локальних легневих макрофагів, гістіоцитів, у багатоядерні клітини є передумовою утворення гранульом, що є специфічною імунною відповіддю у птиці на проникнення патогену. Із розвитком інфекційного процесу, мікроскопічно у легенях можна виявляти казеозні гранульоми та гіфи грибів.

За результатами гістологічного дослідження у курчат 7–10-добового віку у паренхімі легень виявлено формування мікотичних гранульом, що супроводжувалось утворенням зони коагуляційного некрозу, в яких виявляють гіфи грибів. По периферії розміщуються гігантські багатоядерні епітеліоїдні клітини, виявлення яких за гістологічного дослідження є підставою підозрювати інфікування птиці мікроскопічними грибами.

Мікроскопічні гриби *Aspergillus flavus* та *Aspergillus fumigatus* було виявлено у змивах із вентиляційної шафи інкубаторіїв; у повітрі із залу сортування курчат та у змивах зі змішувача кормів – *Aspergillus flavus*.

Ключові слова: аспергільоз, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, мікроміцети, плісеневі гриби, гістіоцити, гранульоми, філаїди, конідії, гіфи.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. У структурі мікозних патологій птиці провідне місце займає аспергільоз, що зумовлено значним розповсюдженням плісневих грибів *Aspergillus spp.*, здатністю розмножуватись на різних біологічних субстратах, а також їх морфологічними особливостями та впливом на організм тварин і птиці [1–2].

Aspergillus fumigatus вперше було виділено із легень загиблої дикої птиці на початку 1800-х років [3]. Серед загиблих були водоплавна птиця та чайки, які споживали корми, уражені плісневими грибами [3, 4]. *A. fumigatus* було ізольовано із легень хижих птахів, пінгвінів та папуг, яких утримували у неволі [4, 5]. Із домашньої птиці захворювання діагностували у курчат-бройлерів, курей, індиків та індишат, а також гусей і качок.

Згідно із дослідженнями R. Zamboni, захворювання діагностували у курчат від 5 до 10-добового віку, за повідомленнями інших авторів [6] гострий аспергільоз виявляють у курчат у віці від 3-х діб до 20 тижнів, що призводить до летальності 4,5–90 % птиці. Виникнення гострої форми аспергільозу виникає внаслідок потрапляння значної кількості конідій у дихальні шляхи, хронічна – за імуносупресії [7].

У патогенезі аспергільозу контаміновані корми та підстилка мають провідне значення, адже вони багаті на органічну речовину, яка активізує проліферацію і спороношення *A. fumigatus*, виробляє значну кількість конідій, які залишаються життєздатними впродовж тривалого періоду та легко розповсюджуються у повітрі.

Основним чинником вірулентності *Aspergillus spp.* є невеликий розмір конідій (від 2 до 10 мкм), які легко потрапляють у дихальні шляхи та колонізують їх [8]. Високі концентрації конідій у навколишньому середовищі та тривалий вплив на господаря, разом із анатомічними характеристиками дихальних шляхів птиці, вважають важливим чинником патогенезу аспергільозу.

Зараження відбувається інгаляційно, через потрапляння дрібних гідрофобних спор грибів (конідій) у дихальні шляхи птиці. Після потрапляння конідій на слизову оболонку дихальних шляхів (гортані, трахеї, повітросних мішків та парабронхів) вони починають розмножуватись прямим поділом, утворюючи гіфи які формують міцелій [6]. Запальний процес характеризується місцевою клітинною інфільтрацією, формуванням гігантських клітин і ексудативними явищами, утворенням вузликів або гранулом [5–8].

Головною причиною виникнення захворювання є інфікування повітря, обладнання

плісневими грибами *Aspergillus spp.* в інкубаторіях, а також ураження кормів та підстилки, погана вентиляція у пташниках [3, 9].

Метою дослідження було провести комплексний мікологічний контроль з метою попередження розвитку аспергільозу у курчат.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом для дослідження слугували повітря, змиви із обладнання інкубаторію, змиви із пташника, корми, вода та патологічний матеріал від курчат віком від 3–5 та 7–10 діб.

Дослідження проводили за чинною нормативною документацією у Експертному центрі діагностики та лабораторного супроводу "Біолайтс", лабораторія акредитована відповідно до вимог ISO/IEC 17025. Відібраний патологічний матеріал (легені) висівали на середовище Сабуро згідно з чинними методиками [10].

Відбір зразків повітря, змивів з поверхні обладнання проводили у цеху інкубації. Окремо в інкубаційних залах відбирали змиви із поверхонь дверей і стін, а також в інкубаційних і вивідних шафах, підлоги, стін, приладів. У обстежуваних приміщеннях точки відбору проб встановлювали з розрахунку на кожні 20 м² площі – одна чашка Петрі за типом конверта.

Для відбору проб повітря застосовували седиментаційні способи (метод Коха). Культивування плісневих грибів проводили за температури 24 °С, впродовж 5–7 діб.

Для відбирання змивів використовували стерильні бактеріологічні аплікатори (сваби). Відбір проб-змивів із поверхонь технологічного обладнання та інвентарю проводили з площі в 100 см² за допомогою металевої рамки-трафарету розміром 10×10 см. Перед кожним накладанням на поверхню досліджуваного об'єкта рамку-трафарет фламбували на полум'ї спиртівки. За обмеження площі 100 см² тампоном на стрижні, змоченим у дистильованій воді, протирали дослідну поверхню і вносили його знову в пробірку.

У стерильні бактеріологічні аплікатори після відбору змивів в асептичних умовах доливали по 8,0 см³ стерильної дистильованої води. Добре віджатиї тампон видаляли та направляли на знезараження. Отриману завись у пробірках вважали вихідним (початковим) розведенням. Далі виготовляли ряд послідовних розведень відповідно до ДСТУ ISO 17604:2014 [11] та ISO 17604 [12], 1 см³ якого вносили у чашку Петрі і заливали 10–15 см³ середовища Сабуро. Посіви термостатували впродовж 5–7 діб за температури 25 °С.

Воду відбирали із водопровідної лінії у стерильну тару та разом із холодоагентами транспортували в лабораторію. Дослідження проводили згідно з ДСТУ 7487:2013 [13], 100 см³

води фільтрували через стерильні мембранні фільтри. Чашки з фільтрами інкубували у термостаті за температури 25 ± 2 °C, упродовж 7 діб, підраховуючи колонії щоденно.

Мікологічні дослідження кормів проводили згідно з методичними вказівками щодо санітарно-мікологічної оцінки та поліпшення якості кормів, затвердженими Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства АПК України № 15-14/73 від 06 березня 1998 року; ДСТУ 3570-97. Виділення грибів із концентрованих кормів та комбікормів здійснювали через посів їх суспензії. До 10 г сипкого корму додавали 100 см³ фізіологічного розчину, струшували 15–20 хв, одержували основне розведення 1:10, з якого готували розведення 1:100, 1:1000, 1:10000 (ступінь розведення залежить від вмісту в досліджуваному зразку спор грибів). Для посіву використовували суспензію в розведенні від 1:100 до 1:100000, 1 см³ вносили у чашку Петрі, заливали розплавленим та охолодженим середовищем Сабуро, рівномірно розподіляючи суспензію по всій поверхні живильного середовища. Згідно з ДСТУ 7954:2005 [10], культивування чашок проводили за температури 25 °C.

Належність мікроскопічних грибів до певних родів визначали через оцінювання морфології колоній грибів на середовищах та морфологію конідієносних структур [13].

Колонії грибів, що вирости на середовищі Сабуро відбирали, екстрагували згідно з методикою та наносили на лунки металевої мішені мас-спектрометра для ідентифікації [14–16].

За допомогою програмного забезпечення MALDI Biotyper проводили автоматичну ідентифікацію на підставі порівняння зібраних вихідних спектрів гриба із референтними спектрами бази даних приладу, а також із бібліотекою Бельгійського університету (BCCM, Belgian Co-Ordinateo collections of micro-organism).

Під час розтину трупів курчат вивчали макроскопічні зміни. Патолого-анатомічно було досліджено 12 трупів курчат віком від 3 до 5-ти діб.

Для гістологічного дослідження відібрані зразки легень фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну впродовж 24 годин [17]. Проводку здійснювали за допомогою напівавтоматичного гістологічного процесора Leica Histo Core Pearl, згідно зі стандартним протоколом спиртів зростаючої концентрації та ксилолу. Заливку у парафінові блоки здійснювали на станції для заливки та охолодження Leica Arcadia. Готові парафінові блоки товщиною 5 мікрометрів нарізали за допомогою ротаційного мікротома Leica 2125RTS. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Мікроскопію проводили за допомогою мікроскопа Leica DM 2000LED та планохроматичних об'єктивів N PLAN із збільшенням $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ камери Leica MC170 HD, та програмного забезпечення Leica LAS X.

Результати дослідження. Впродовж 2018–2020 рр. у Експертний центр діагностики та лабораторного супроводу "Біолайтс" надійшло 812 трупів птиці із підозрою на аспергільоз. Із них 123 – трупи курчат-бройлерів у віці від 3 до 5 діб, що становить 15,1 %, та 54 (6,6 %) – у віці 7–10 діб, решта курчата старших вікових груп. Діагноз встановлювали за результатами патолого-анатомічного, гістологічного та мікологічного дослідження (рис. 1).

Макроскопічні зміни у птиці різних вікових груп суттєво відрізнялися. У курчат віком від 3 до 5 діб відмічали набряк та гіперемію легень, наявність казеозного ексудату на повітряноносних мішках (рис. 1 а). У курчат віком 7–10 діб спостерігали сильне потовщення повітряноносних мішків, легені з множинними сферичними гранулематозними вузликами діаметром до 2 мм (рис. 1 б).



а



б

Рис. 1. Макроскопічне дослідження патматеріалу.

Спори грибів потрапляють у легені через верхні дихальні шляхи, слизову оболонку носової порожнини та трахею, де можуть зумовлювати місцеву запальну реакцію. Після потрапляння у легені виникає розлитий запальний процес – гостра пневмонія [18, 19].

Внаслідок посіву легень загиблих курчат віком 3–5 та 7–10 діб на середовищі Сабуро відмічали ріст мікроскопічних грибів, що складалися з однотипного міцелію (шириною 4–6 мкм), іноді виявляли "головки" з конідіями (рис. 2). За посіву на середовище Сабуро мікроміцети росли швидко, утворюючи плоскі колонії, спочатку білі, дещо пухнасті або оксамитові, потім набували синюватого, коричневого, жовтуватого забарвлення залежно від виду; при цьому поверхня їх ставала борошнистою, порошкуватою (рис. 2).

За мікроскопії колоній плісневих грибів було виявлено конідіальні головки різних розмірів (до 3 мм x 15–20 мкм в діаметрі), кулясті, темно-коричневі, філаїди нанесені на коричневій, часто перегороджені метули, конідії кулясті, іноді еліптичні (рис. 3).

За результатами ідентифікації мікроскопічних грибів методом мас-спектрометрії MALDI TOF [16], було підтверджено видову належність плісневих грибів – *Aspergillus fumigatus* (рис. 4).

Із легень досліджених курчат виділяли *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* та *Aspergillus niger*. Слід відмітити, що *Aspergillus flavus* виявляли у 47 % випадків, *Aspergillus fumigatus* – у 34,5 %, *Aspergillus niger* – у 10 % досліджених зразків. Одночасне виявлення *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* та *Aspergillus niger* зустрічали у двох випадках, що становить 1,6 %.

Поряд із мікологічним дослідженням проводили гістологічне дослідження легень, від хворих курчат (рис. 5).

За гістологічного дослідження тканини легень курчат віком 3–5 діб було виявлено низку характерних змін. Потовщення стінки парабронхів внаслідок гіперплазії локальних лімфоїдних утворень (що забезпечують місцевий імунітет) (рис. 5 а).

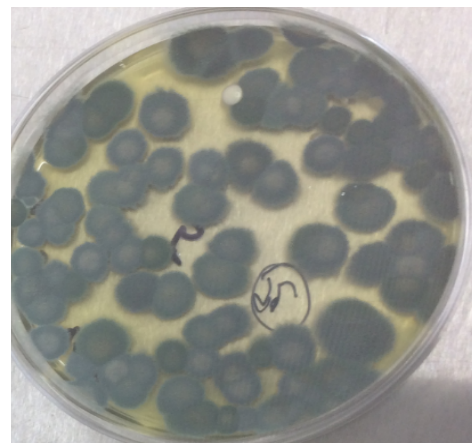
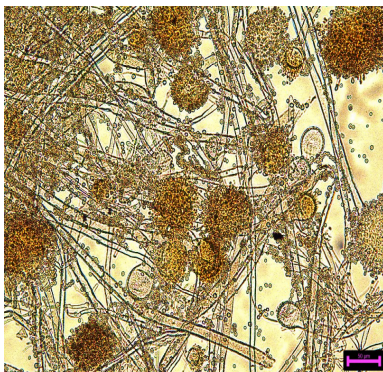


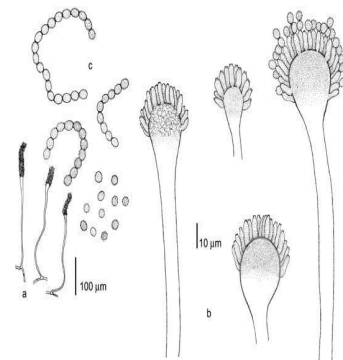
Рис. 2. Результати мікологічного дослідження легень курчат-бройлерів, тридобового віку.



а) *Aspergillus flavus*



б) *Aspergillus fumigatus*



в) *Aspergillus fumigatus*, (Mycobank)

Рис. 3. Мікроскопія колоній гриба *Aspergillus spp.*

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>1</u> (++) (A)	1	Aspergillus fumigatus	<u>2.153</u>	Aspergillus fumigatus	<u>1.963</u>
<u>1a</u> (++) (A)	1a	Aspergillus fumigatus	<u>2.199</u>	Aspergillus fumigatus	<u>2.017</u>

Рис. 4. Результати ідентифікації мікроскопічних грибів.

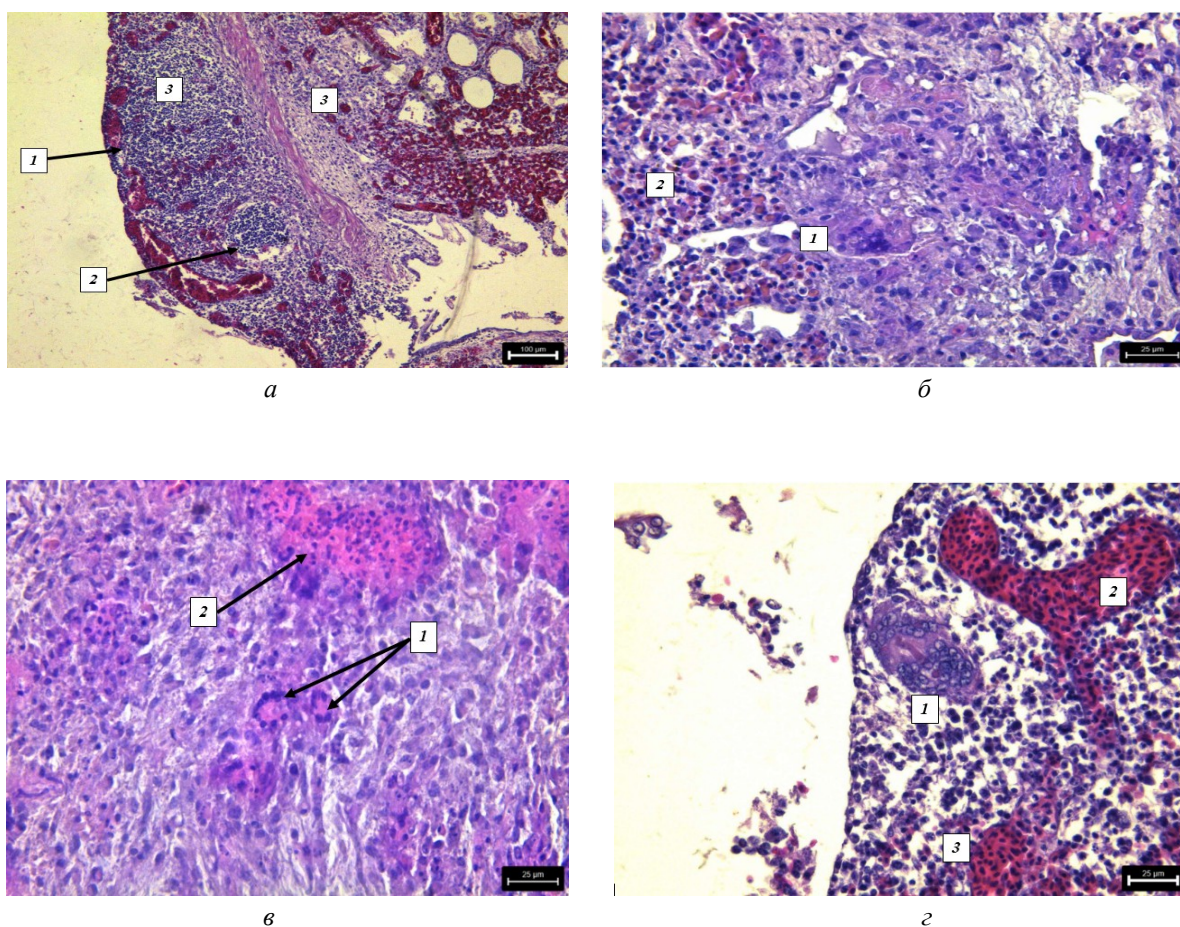


Рис. 5. Легені курчат-бройлерів.

Гематоксилін та еозин:

а – набряк стінки парабронха (1); лімфоїдна гіперплазія (2); клітинна інфільтрація (3);

б – багатоядерні клітини (1); клітинна інфільтрація (2);

в – багатоядерні клітини (1); некроз (2);

г – багатоядерні клітини (1); гіперемія судин (2); крововиливи (3).

Відмічали ознаки розвитку інтерстиційної пневмонії. У паренхімі було виявлено патогномонічну ознаку – утворення гігантських багатоядерних клітин, що є характерною ознакою мікотичних інфекцій у птиці (рис. 5 б, в, г). Злиття локальних легеневи́х макрофагів, – гістіоцитів, у багатоядерні клітини є передумовою утворення гранульом, що є специфічною імунною відповіддю у птиці на проникнення патогену.

У курчат 7–10-добового віку у результаті гістологічного дослідження у паренхімі легень виявлено гіфи та спори грибів (рис. 6).

Формування мікотичних гранульом супроводжувалось утворенням зони коагуляційного некрозу, де виявляють гіфи грибів. По периферії розміщуються гігантські багатоядерні епітеліоїдні клітини, виявлення яких за гістологічного дослідження є підставою підозрювати інфікування птиці мікроскопічними грибами.

Багатоядерні епітеліоїдні клітини є трансформованими макрофагами та вважаються ознакою розвитку хронічного запалення.

У паренхімі легень візуалізуються гіфи грибів та формування гігантських багатоядерних клітин (рис. 6).

Зараження курчат аспергільозом відбувається аерогенно [1, 2, 12], саме тому для встановлення етіології хвороби досліджували наявність спор плісневих грибів у повітрі, змивах із інкубароріїв, у кормах та підстилці пташника, а також інкубаційних яйцях (табл. 1).

Змиви в інкубаторіях відбирали із дверей, столів, стін, підлоги, вентиляційного устаткування, інкубаційної техніки. Найбільшу кількість плісневих грибів виявлено у зразках, отриманих із залу сортування добових курчат та у змивах із лотків для сортування курчат – $3,6 \times 10^4$ та $4,7 \times 10^3$ КУО/см³ відповідно (табл. 1).

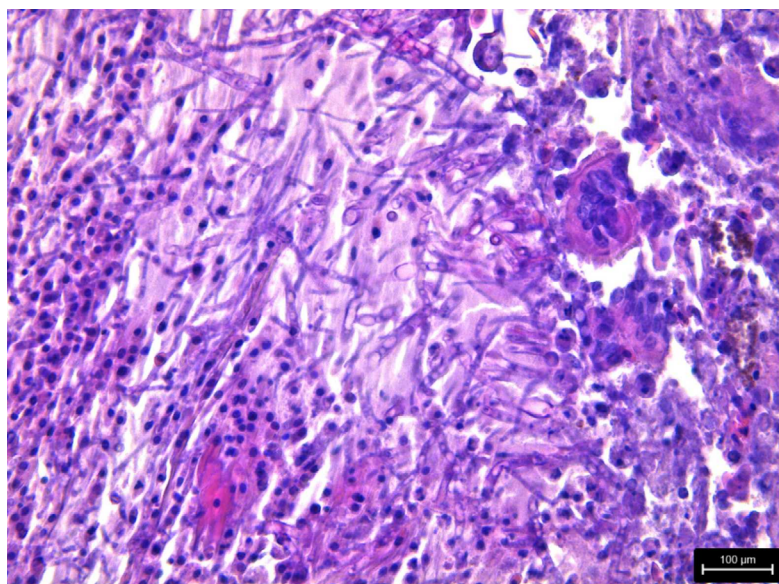


Рис. 6. Легені уражені аспергільозом. Гематоксилін та еозин.

Таблиця 1 – Плісневі гриби та дріжджі, виявлені у змивах на різних об'єктах інкубаторію

Об'єкт дослідження	Кількість плісневих грибів та дріжджів, КУО/см ³	Ідентифікація
Інкубаційна шафа	$6,2 \times 10^3$	<i>Cladosporium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i>
Вакцинаторська	$1,1 \times 10^3$	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i>
Зал сортування	$3,6 \times 10^4$	<i>Cladosporium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>
Вентиляційна установка	$3,8 \times 10^2$	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>
Інкубаційні яйця після газациї	—	—
Овоскоп	$1,1 \times 10^3$	<i>Aureobasidium spp.</i> , <i>Phoma glomerata</i> , <i>Phoma exigua</i>
Шприц-ін'єктор	$2,2 \times 10^2$	<i>Aureobasidium spp.</i> , <i>Trichosporon faecale</i>

Згідно з результатами дослідження, у змивах переважали *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.* та дріжджові гриби *Aureobasidium spp.*, *Phoma glomerata*, *Phoma exigua* (рис. 7).

Слід відмітити, що *Aspergillus flavus* та *Aspergillus fumigatus* було виділено у змивах із вентиляційної шафи (табл. 1).

Внаслідок аналізу мікологічного забруднення повітря у виробничих залах інкубаторію встановили, що найбільшу кількість плісеньових грибів та дріжджів було виявлено у залі сортування курчат та кімнаті для вакцинавання – 222 і 146 КУО відповідно (табл. 2).

У повітрі залу сортування курчат було виявлено *Aspergillus flavus* у незначній концентрації, однак навіть це може спричинити ураження.

Враховуючи, що ймовірним джерелом зараження курчат можуть бути санітарно-гігієнічні умови їх утримання та годівлі, наступ-

ним етапом роботи було дослідження змивів з пташника та дослідження кормів на наявність плісеньових грибів і дріжджів.

Змиви відбирали із обладнання на етапі приготування кормів: внутрішня стінка бункера, змішувач, труба для подачі кормів, решітка молоткового подрібнення.

За результатами дослідження у змивах переважали гриби родин: *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.* (табл. 3).

Аналізуючи отримані результати дослідження відмічаємо, що найбільшу контамінацію мікроміцетів виявляли у змивах із труб для подачі корму та зі змішувача кормів. Мікроскопічні гриби родини *Aspergillaceae* було виділено у змивах зі змішувача.

За мікологічного дослідження кормів проводили підрахунок мікроміцетів та ідентифікацію виділених плісеньових грибів і дріжджів.

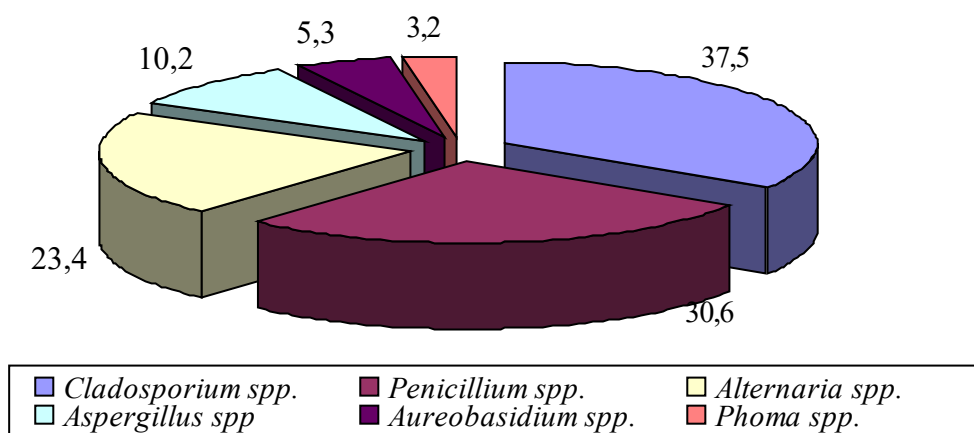


Рис. 7. Мікроміцети у змивах інкубаторію, %.

Таблиця 2 – Мікологічне забруднення повітря у виробничих зонах інкубаторію

Об'єкт дослідження	Кількість плісеньових грибів та дріжджів, КУО	Виділені та ідентифіковані мікроміцети
Інкубаційна шафа	21	<i>Cladosporium spp.</i>
Зал сортування	146	<i>Cladosporium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus flavus</i> .
Вакцинаторська	222	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i>

Таблиця 3 – Плісеньові гриби у змивах із обладнання на етапі приготування кормів

Об'єкт дослідження	Кількість плісеньових грибів та дріжджів, КУО	Виділені та ідентифіковані мікроміцети
Внутрішня стінка бункера	$3,5 \times 10^4$	<i>Cladosporium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i> , <i>Aureobasidium spp.</i> , <i>Phoma glomerata</i> , <i>Phoma exigua</i>
Решітка молоткового подрібнення	$1,8 \times 10^4$	<i>Cladosporium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i>
Змішувач	$4,7 \times 10^4$	<i>Cladosporium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>
Труба для подачі кормів	$5,2 \times 10^4$	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Aureobasidium spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i>
Змиви із поїлок і годівниць	$4,0 \times 10^4$	<i>Aureobasidium spp.</i> , <i>Phoma glomerata</i> , <i>Cladosporium spp.</i>

Для годівлі курчат використовували комбікорм власного виробництва, загальна кількість плісневих грибів та дріжджів у зразках відібраних із годівниць становила $3,8 \times 10^4$, у пробі відібраній з бункера – $2,4 \times 10^3$ КУО/см³, що вказує на додаткову контамінацію корму мікроміцетами у пташнику.

За результатами мікологічного дослідження зразків води із пташників було виявлено від 5 до 28 КУО/100 см³ води. У воді переважали: *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium expansum*, *Aureobasidium pullulans*.

Плісневих грибів родини *Aspergillaceae* у підстилці не виявлено.

Обговорення. Клінічними ознаками раннього аспергільозу було часте та утруднене дихання; хворі курчата часто вдихають повітря, витягаючи шию або відкриваючи дзьоб. Рівень анорексії у інфікованої птиці коливався від легкої до важкої. Ці результати узгоджуються з дослідженнями [13, 17, 18], в яких повідомляється, що клінічні симптоми гострого аспергільозу проявляються у період від кількох діб до 2 тижнів.

Утруднене дихання птиці зумовлюють гіфи грибів, що ростуть у легенях, це призводить до некрозу й запалення повітроносних мішків і легень [20]. Некротизовані клітини дихальних шляхів спричиняють гіпоксію, і курчата компенсують потребу тканин у кисні через збільшення частоти дихання. Накопичення ексудату і запалення легень зумовлює порушення циркуляції повітря [21].

Макроскопічні зміни у легенях інфікованих курчат віком від 3 до 5 діб характеризувались незначними ураженнями: набряком та гіперемією легень, наявністю казеозного ексудату на повітроносних мішках. У курчат 7–10-добового віку спостерігали сильне потовщення повітроносних мішків, легені з множинними сферичними гранулематозними вузликами діаметром до 2 мм.

Результати цього дослідження підтверджують публікацію Cheng et al. [15], згідно з якою на ранніх стадіях легеневі ураження характеризуються набряком легень, а в подальшому виявляють ущільнення та утворення гранульом.

Діагноз на аспергільоз у птиці 3–5-добового віку поставили лише за результатами мікологічного дослідження, а підтвердження отримали за результатами гістологічних досліджень, адже клінічний прояв захворювання не був характерним. Наявність гранульом у легенях теж не є патогномонічною ознакою аспергільозу, оскільки бактеріальні інфекції перебігають із утворенням бактеріальних гранульом.

Аспергільоз виникає внаслідок потрапляння значної кількості дрібних гідрофобних спор грибів (конідій) у дихальні шляхи [5, 6, 8, 20]. Спори грибів проникають через дихальні шляхи та осідають на слизовій оболонці трахеї, в бронхах, легенях, зумовлюючи запальний процес [21].

Аналізуючи протоколи бактеріологічного дослідження патологічного матеріалу досліджуваних курчат, можна стверджувати, що бактеріальні агенти не були причиною загибелі, а саме *A. fumigatus* була основною причиною смертності курчат.

Вдихання конідій або спор з повітря, контамінованих кормів, підстилки спричинювало запальний процес, що характеризується місцевою клітинною інфільтрацією, ексудативними явищами, утворенням гігантських багатоядерних клітин та у подальшому – гранульом. Макроскопічно, гранульоми мають вигляд білих вузликів, які можуть розміщуватись у товщі легеневої тканини або на її поверхні. У центрі вузлика можна виявити гіфи грибів, оточені некротичними масами [21, 22].

Сприйнятливості курчат до аспергільозу можна пояснити анатомо-фізіологічними особливостями дихальної системи птахів. Маленькі легені, що не розширюються, і наявність повітряних мішків становлять основний осередок інфекції, оскільки повітря (або конідії) у процесі дихання курчат не надходить безпосередньо до легенів, спочатку воно надходить до каудальних повітряних мішків, звідки потрапляє до легенів, а під час другого вдиху переходить до черевних повітряних мішків. Саме подвійне дихання і сприяє потрапленню конідій у легені та повітряні мішки [20]. Більш висока температура тіла також забезпечує швидкий ріст грибків.

Інкубатор може стати джерелом поширення захворювання, якщо повітря та поверхні обладнання контаміновані спорами грибів *Aspergillus spp.* Тепле та вологе повітря сприяють розвитку гриба, що є аеробних організмом. Циркуляція інфекції на птахокомплексах зумовлена постійним переміщенням поголів'я і утримуванням значної кількості курчат на обмеженій території. Концентрація *Aspergillus spp.* у повітрі зростає, якщо змінюється склад мікрофлори підстилки або корму. Діагностують аспергільоз під час патолого-анатомічних досліджень і за результатами гістологічних та мікологічних досліджень [22].

Щоб попередити захворювання, необхідно контролювати санітарно-гігієнічний стан інкубаторів та пташників, показники безпечності кормів і води, стежити за станом кормосховищ і системою водопостачання.

Висновки. 1. Діагноз на аспергільоз встановлено у 123 курчат (15,1 %), від 3- до 5-добового та у 54 (6,6 %) – 7–10-добового віку за результатами патолого-анатомічного, мікологічного та гістологічного дослідження.

2. Із патологічного матеріалу виділяли *Aspergillus flavus* у 47,0 % випадків, *Aspergillus fumigatus* – у 34,5, *Aspergillus niger* – у 10,0 % досліджених зразків. Одночасне виявлення *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* та *Aspergillus niger* – 1,6 %.

3. За патолого-анатомічного дослідження у курчат 3–5-добового віку діагностували гостру пневмонію, гранульом на легенях, серозних оболонках виявлено не було, що може свідчити про гостру форму перебігу патологічного процесу. У птиці 7–10-добового віку спостерігали сильне потовщення повітроносних мішків, легені з множинними сферичними гранульомами діаметром до 2 мм.

4. Гістологічно у паренхімі легень птиці 3–5-добового віку виявлено утворення гігантських багатоядерних клітин, що є характерною ознакою мікотичних інфекцій у птиці, злиття локальних легеневих макрофагів, гістіоцитів, у багатоядерні клітини є передумовою утворення гранульом, у птиці 7–10-добового віку виявляли мікотичні гранульоми, що супроводжувалось утворенням зони коагуляційного некрозу, де виявляли гіфи грибів.

5. У змивах із вентиляційної шафи інкубаторію було виділено *Aspergillus flavus* та *Aspergillus fumigatus*, у повітрі залу сортування курчат – *Aspergillus flavus*, у змивах зі змішувача під час приготування корму – мікроскопічні гриби родини *Aspergillus spp.*, що може бути причиною зараження.

Відомості про дотримання біоетичних норм. Експериментальні дослідження проводили із дотриманням вимог Закону України № 3447 – IV від 21.02.06 р. “Про захист тварин від жорстокого поводження” та відповідно до основних принципів “Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей” (Страбсбург, 1986), декларації “Про гуманне ставлення до тварин” (Гельсінкі, 2000) і Національного конгресу з біоетики “Загальні етичні принципи експериментів на тваринах” (Київ, 2001).

Відомості про конфлікт інтересів. Авторі заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kousha M., Tadi R., Soubani A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur. Respir. Rev. 2011. Vol. 20. P. 156–174. Doi:10.1183/09059180.00001011

2. Зон Г.А., Сорокова В.В., Ложкіна О.В. Порівняльна патоморфологічна оцінка прояву аспергільозу, спричиненого *Aspergillus flavus*, у різних видів птиці. Ветеринарна біотехнологія. 2016. № 28. С. 84–93. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbth_2016_28_11

3. Інфекційні хвороби птиці/ Л.Є. Корнієнко та ін. За ред. Л.Є. Корнієнка. Херсон: Гринь ДС., 2012. 528 с. URL: <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNANU/1347>

4. Ben-Ami R., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. British Journal of Haematology. 2010. No. 150. P. 406–417. Doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08283.x

5. Beernaert L.A., Pasmans F., Van Waeyenberghe L., Haesebrouck F. Aspergillus infections in birds: A review. Avian Pathol. 2010. No. 39 (5). P. 325–331. Doi:10.1080/03079457.2010.506210.

6. Outbreak of avian aspergillosis in colonial-bred chicks (Isa Brown) in southern Rio Grande do Sul – case report/ R. Zamboni et al. Veterinary Medicine Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2020. No. 72 (4). P. 1363–1368. Doi:10.1590/1678-4162-11878

7. A Review on Aspergillosis in Poultry Journal of Veterinary Science Technology/ G. Girma et al. 2016. (7). P. 382–387. Doi:10.4172/2157-7579.1000382.

8. Aspergillosis, a natural infection in poultry: mycological and molecular characterization and determination of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus* isolates/ V.M. Oca et al. Avian Dis. 2017. Vol. 61. P. 77–82. Doi:10.1637/11496-092016-Reg

9. *Aspergillus fumigatus* in poultry/ P. Arné et al. Int. J. Microbiol., special. 2011. P. 1–14. Doi:10.1155/2011/746356

10. ДСТУ 7954:2006. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови з підрахунку дріжджів і мікроскопічних грибів. Техніка підрахунку колоній, культивованих за температури 25°C. [Чинний від 2007-10-01]. Вид. офіц. Київ: Держспоживстандарт України, 2007. 10 с.

11. ДСТУ ISO 21528-1:2014. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення і підрахунку ентеробактерій (*Enterobacteriaceae*). Частина 1. Виявлення та підрахунок за методикою НІЧ з попереднім збагаченням (ISO 21528-1:2004, IDT). [Чинний від 2015-07-01]. Київ: Держспоживстандарт України, 2014. 15 с.

12. ISO 17604:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 2003. 13 p.

13. Саттон Д., Фотергил А., Ринальди М. Определи-тель патогенных и условно патогенных грибов. Москва: Мир, 2001. 467 с. ISBN 5-03-003308-4.

14. Тишківська Н.В., Тишківська А.М. Використання MALDI-TOF мас-спектрометрії у ветеринарній мікології. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2019. № 2. С. 20–28. Doi:10.33244/2310-4902-2019-152-2-20-28

15. Pathogenicity and immune responses of *Aspergillus fumigatus* infection in chicken/Z. Cheng et al. Front. in Veterinary Science. 2020. No. 7. P. 143–154. Doi:10.3389/fvets.2020.00143

16. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р. Масс-спектрометрия – новое слово в клинической микробиологии.

Клиническая лабораторная диагностика, 2016. № 61(12). С. 842–848. Doi:10.18821/0869-2084-2016-61-842-848

17. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфологічних методів дослідження у нормі та при патології: навчальний посібник. Житомир: Полісся, 2005. 288 с. URL: <http://ir.znau.edu.ua/handle/123456789/3788>

18. Lobna M.A., Salem A.A. Epidemiological study of *Aspergillus* in chicken and human contacts in chicken farms at Kalyoubia Governorate. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS). 2014. No. 7. P. 20–24. Doi:10.9790/2380-07742024

19. Fungal mycotic diseases of poultry. Diagnosis, Treatment and Control, Areview/ K. Dhama et al. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2013. P. 1–15. Doi:10.3923/pjbs.2013.1626.1640

20. *Aspergillus fumigatus* in Poultry/ P. Arne et al. International Journal of Microbiology. 2011. Vol. 2011. P. 1–14. Doi:10.1155/2011/746356

21. Spanemberg A., Machado G., Casagrande R. Assis., Sales G. Miller. *Aspergillus fumigatus* from normal and condemned carcasses with air Sacculitis in commercial poultry, Pesqu. Vet. Bras. 2013. No. 33(9). P. 1071–1075. Doi:10.1590/S0100-736X2013000900004

22. McCormick A., Loeffler J., Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. Cellular Microbiology. 2010. No. 12. P. 1535–1543. Doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01517.

REFERENCES

1. Kousha, M., Tadi, R., Soubani, A.O. (2011). Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur. Respir. Rev. Vol. 20, pp. 156–174. Doi:10.1183/09059180.00001011

2. Zon, H.A., Sorokova, V.V., Lozhkina, O.V. (2016). Porivnialna patomorfologichna otsinka proiavu asperhilozu, sprychynenoho *Aspergillus flavus*, u riznykh vydiv ptytsi [Comparative pathomorphological evaluation of the manifestation of aspergillosis caused by *Aspergillus flavus* in different species of birds]. Veterinary biotechnology. no. 28, pp. 84–93. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbtb_2016_28_11

3. Kornienko, L.I., Nalyvaiko, L.I., Nedosiekov, V.V. (2012). Infektsiini khvoroby ptytsi; Za red. L.I. Kornienka [Infectious diseases of birds / ed. L.Ye. Kornienko]. Kherson: Green DS., 528 p. Available at: <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/1347>

4. Ben-Ami R., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P. (2010). Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. British Journal of Haematology. no. 150, pp. 406–417. Doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08283.x

5. Beernaert, L.A., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F. (2010). *Aspergillus* infections in birds: A review. Avian Pathol. no. 39 (5), pp. 325–331. Doi:10.1080/03079457.2010.506210.

6. Zamboni, R., Alberti, T.S., Scheid, H.V. (2020). Outbreak of avian aspergillosis in colonial-bred chicks (Isa Brown) in southern Rio Grande do Sul – case report. Veterinary Medicine Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. no. 72 (4), pp. 1363–1368. Doi:10.1590/1678-4162-11878

7. Girma, G., Abebaw, M., Zemene, M. (2016). A Review on Aspergillosis in Poultry Journal of Veterenary

Science Technology. no. 7, pp. 382–387. Doi: 10.4172/2157-7579.1000382.

8. Oca, V.M., Valdés, S.E., Segundo, C. (2017). Aspergillosis, a natural infection in poultry: mycological and molecular characterization and determination of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus* isolates. Avian Dis. Vol. 61, pp. 77–82. Doi:10.1637/11496-092016-Reg

9. Arné, P., Thierry, S., Wang, D. (2011). *Aspergillus fumigatus* in poultry. Int. J. Microbiol., special. pp. 1–14. Doi:10.1155/2011/746356

10. DSTU 7954:2006. Mikrobiologhiia kharchovykh produktiv i kormiv dlia tvaryn. Zahalni nastanovy z pidrakhunku drizhdzhiv i mikroskopichnykh hrybiv. Tekhnika pidrakhuvannia kolonii, kultyvovanykh za temperatury 25°C. [Chynnyi vid 2007-10-01] [Microbiology of food and animal feed. General guidelines for counting yeast and microscopic fungi. The technique of counting colonies cultured at a temperature of 25 ° C. [Effective from 2007-10-01]]. Kind. ofits. Kyiv: Derzhspozhyvstandart of Ukraine, 2007. 10 p.

11. DSTU ISO 21528-1:2014. Mikrobiologhiia kharchovykh produktiv i kormiv dlia tvaryn. Horyzontalniy metod vyavleniia i pidrakhuvannia enterobakterii (Enterobacteriaceae). Chastyna 1. Vyavleniia ta pidrakhuvannia za metodykoiu NICH z poperednim zbahachenniam (ISO 21528-1:2004, IDT) [Chynnyi vid 2015-07-01] [DSTU ISO 21528-1: 2014. Microbiology of food and animal feed. Horizontal method for detecting and counting enterobacteria (Enterobacteriaceae). Part 1. Detection and calculation by the NIC method with pre-enrichment (ISO 21528-1: 2004, IDT). [Effective from 2015-07-01]]. Kyiv: Derzhspozhyvstandart of Ukraine, 2014. 15 p.

12. ISO 17604:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 2003. 13 p.

13. Satton, D., Foterhyl, A., Rynaldy, M. (2001). Opredelitel' patogennykh i uslovno patogennykh gribov [Keys to pathogenic and opportunistic fungi]. Moscow: Mir, 467 p. ISBN 5-03-003308-4.

14. Tyshkivska, N.V., Tyshkivska, A.M. (2019). Vykorystannia MALDI-TOF mas-spektrometrii u veterynarii mikolohii [Vikorystannia MALDI-TOF mass spectrometry in veterinary medicine]. Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny [Scientific Bulletin of Veterinary Medicine]. no. 2, pp. 20–28. Doi:10.332445/2310-4902-2019-152-2-20-28

15. Cheng Z., Li M., Wang Y., Chai T., Cai Y., Li N. (2020). Pathogenicity and immune responses of *Aspergillus fumigatus* infection in chicken. Front. In Veterinary Science. no. 7, pp. 143–154.

16. Pryputnevych, T.V., Melkumian, A.R. (2016). Mass-spektrometriia – novoe slovo v klynicheskoi mykrobiolohii [Mass spectrometry is a new word in clinical microbiology]. Klynicheskaiia laboratornaia dyahnostyka [Clinical laboratory diagnostics]. no. 61(12), pp. 842–848. Doi:10.18821/0869-2084-2016-61-842-848

17. Horalskyi, L.P., Khomych, V.T., Kononskyi, O.I. (2005). Osnovy histolohichnoi tekhniki i morfofunktsionalni metody doslidzhennia u normi ta pry patolohii: navch. posib [Fundamentals of histological technology and morpho-functional methods of preschooling the norm in case of pathology: a master book]. Zhytomyr: Polisia, 288 p. Available at: <http://ir.znau.edu.ua/handle/123456789/3788>

18. Lobna, M.A., Salem, A.A. (2014). Epidemiological study of Aspergillosis in chicken and human contacts in chicken farms at Kalyoubia Governorate. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS). no. 7, pp. 20–24. Doi:10.9790/2380-07742024

19. Dhama, K., Chakraborty, S., Verma, A.K. (2013). Fungal mycotic diseases of poultry. Diagnosis, Treatment and Control, A review. Pakistan Journal of Biological Sciences. pp. 1–15. Doi:10.3923/pjbs.2013.1626.1640

20. Arne, P., Thierry, S., Wang, D. (2011). *Aspergillus fumigatus* in Poultry. International Journal of Microbiology. pp. 1–14. Doi:10.1155/2011/746356

21. Spanemberg, A., Machado, G., Casagrande, R. Assis., Sales, G. Miller. (2013). *Aspergillus fumigatus* from normal and condemned carcasses with air Sacculitis in commercial poultry, Pesqu. Vet. Bras. no. 33(9), pp. 1071–1075. Doi:10.1590/S0100-736X2013000900004

22. McCormick, A., Loeffler, J., Ebel, F. (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. Cellular Microbiology. no. 12, pp. 1535–1543. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01517.

Проведение комплексного микологического исследования для предупреждения возникновения аспергиллеза у цыплят

Тышківська Н.В., Лясота В.П., Тышківська А.М., Тышківський М.Я., Черныш И.А.

Заболевания птицы аспергиллезом регистрируют во многих птицеводческих хозяйствах, причинами возникновения заболевания является нарушение санитарно-гигиенических условий инкубаториев и птичников (неблагоприятный микроклимат, пораженные корма и подстилка микроскопическими грибами). Чтобы предотвратить развитие инфекции, необходимо контролировать загрязнение воздуха и оборудования в инкубаториях; определять показатели безопасности кормов и воды (уровень их микологической обсемененности) в птичниках; следить за состоянием кормопроизводства хранилищ и системы водоснабжения.

По результатам микологического исследования патологического материала, в 15,1 % погибших цыплят в возрасте от 3 до 5 суток и 6,6 % – в возрасте 7–10 суток, был установлен диагноз аспергиллез.

С легких погибших цыплят выделяли *Aspergillus flavus* (47 %), *Aspergillus fumigatus* (34,5 %), *Aspergillus niger* (10 %). Макроскопически выявляли отек и гиперемии легких у цыплят 3–5-суточного возраста. Образование гранул в легких и серозных оболочках выявлено не было, что может свидетельствовать об острой форме течения патологического процесса. У цыплят 7–10-суточного возраста наблюдали сильное утолщение воздухоносных мешков, легкие с множественными сферическими гранулемами диаметром до 2 мм. Споры грибов, попадая в легкие, вызывают местную воспалительную реакцию – острую пневмонию.

Гистологически у цыплят 3–5-суточного возраста выявлено утолщение стенки парабронхов за счет гиперплазии локальных лимфоидных образований (обеспечивающие местный иммунитет), признаки развития интерстициальной пневмонии. В паренхиме обнаружено патогномоничные признаки – образование гигантских многоядерных клеток, что является характерным призна-

ком микотических инфекций у птицы. Слияние локальных легочных макрофагов, гистиоцитов, в многоядерные клетки является предпосылкой образования гранул, это специфический иммунный ответ у птиц на проникновение патогена. По развитию инфекционного процесса, микроскопически в легких можно выявлять казеозные гранулемы и гифы грибов.

По результатам гистологического исследования у цыплят 7–10-суточного возраста в паренхиме легких обнаружено формирование микотических гранул, что сопровождается образованием зоны коагуляционного некроза, в которых оказываются гифы грибов. По периферии размещаются гигантские многоядерные эпителиоидные клетки, выявление которых за гистологического исследования является основанием подозревать инфицирование птицы микроскопическими грибами.

Микроскопические грибы *Aspergillus flavus* и *Aspergillus fumigatus* было обнаружено в смывах с вентиляционного шкафа инкубаториев, в воздухе из зала сортировки цыплят и в смывах из смесителя кормов – *Aspergillus flavus*.

Ключевые слова: аспергиллез, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, микромицет, плесневые грибы, гистиоциты, гранулемы, филаиды, колонидии, гифы.

Conducting a comprehensive mycological study to prevent the occurrence of aspergillosis in chickens

Tyshkivska N., Lyasota V., Tyshkivska A., Tyshkivsky M., Chernysh I.

Diseases of poultry aspergillosis are recorded in many poultry farms, the causes of the disease are the violation of the sanitary and hygienic conditions of hatcheries and poultry houses (unfavorable microclimate, affected feed and litter by microscopic fungi). To prevent the development of infection, it is necessary to control air pollution and equipment in hatcheries; determine the safety indicators of feed and water (the level of their mycological contamination) in poultry houses; monitor the status of feed storage facilities and water supply systems.

According to the results of our research, in 15.1% of dead chickens at the age of 3 to 5 days and 6.6% at the age of 7-10 days, according to the results of mycological examination of pathological material, the diagnosis of aspergillosis was established. *Aspergillus flavus* (47%) *Aspergillus fumigatus* (34.5%), *Aspergillus niger* (10%) were isolated from the lungs of dead chickens. Macroscopically revealed edema and hyperemia of the lungs in chickens of 3-5 days of age. The formation of granulomas in the lungs and serous membranes was not detected, which may indicate an acute form of the pathological process. Chickens 7-10 days old showed a strong thickening of the air sacs, lungs with multiple spherical granulomas up to 2 mm in diameter. Spores of fungi entering the lungs cause a local inflammatory reaction - acute pneumonia.

Histologically, in chickens of 3-5 days of age, a thickening of the parabronchial wall due to hyperplasia of local lymphoid formations (providing local immunity), signs of the development of interstitial pneumonia were revealed. Pathognomonic signs were found in the parenchyma - the formation of giant multinucleated cells, which is a characteristic sign of mycotic infections in poultry. The

fusion of local pulmonary macrophages, histiocytes, into multinucleated cells is a prerequisite for the formation of granulomas, being a specific immune response in birds to the penetration of a pathogen.

According to the development of the infectious process, caseous granulomas and fungal hyphae can be detected microscopically in the lungs. According to the results of histological examination, the formation of mycotic granulomas was found in the lung parenchyma in 7-10 days old chickens, which was accompanied by the formation of a zone of coagulation necrosis, in which the fungal hyphae were

found. On the periphery, giant multinucleated epithelioid cells are located, the detection of which by histological examination is the basis for suspecting bird infection with microscopic fungi.

Microscopic fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* have been found in washes from hatchery ventilation cabinets, and *Aspergillus flavus* was found in the air from the chick sorting room and in washes from the feed mixer.

Key words: aspergillosis, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, micromycete, mold fungi, histiocytes, granulomas, phylalids, conidia, hyphae.



Copyright: Тишківська Н.В. 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:

Тишківська Н.В.	https://orcid.org/0000-0001-9249-0921
Лясота В.П.	https://orcid.org/0000-0002-2442-2174
Тишківська А.М.	https://orcid.org/0000-0003-4419-2174
Тишківський М.Я.	https://orcid.org/0000-0003-0826-5276
Черниш І.О.	https://orcid.org/0000-0002-7757-8172