Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**СЕМЕНКО Олена Валентинівна**

**УДК** **619:616.993.192.6Бб:636.7**

**УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ЗАЖИТТЄВОЇ ДІАГНОСТИКИ БАБЕЗІОЗУ СОБАК**

**16.00.11** – паразитологія, гельмінтологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

Київ – 2007

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному аграрному університеті Кабінету Міністрів України, м. Київ

**Науковий керівник** – доктор ветеринарних наук, доцент

**Прус Михайло Петрович,**

Національний аграрний університет, доцент

кафедри паразитології та тропічної ветеринарії

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор

**Дахно Іван Степанович**,

Сумський національний аграрний університет, завідувач кафедри паразитології і токсикології

кандидат ветеринарних наук, доцент

**Пономаренко Володимир Якович,**

Харківська державна зооветеринарна академія,

доцент кафедри паразитології

**Провідна установа –** Одеський державний аграрний університет Міністерства аграрної політики України, кафедра епізоотології та паразитології, м. Одеса

Захист відбудеться “ ” 2007 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному аграрному університеті за адресою: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв оборони, 15, навч. корпус № 3, ауд. 65

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного аграрного університету: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв оборони, 13, навч. корпус № 4, кімн. 28.

Автореферат розісланий “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2007 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Бусенко О.Т.

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** На відміну від країн дальнього (Levy M., 1980; Ristic M., 1981; Kumar S., 1997; Krause P., 2003; Callow L., 2004) та ближнього (Степанова Н.І., 1986; Акбаєв М.Ш., Балагула Т.В., 2001; Тимофєєв Б.О., 2004; Георгіу Х., Расстригін О.Є., 2005; Христиановский П.І., 2005) зарубіжжя в Україні проблемі бабезіозів тварин, у тому числі собак, починаючи з кінця 60-х років минулого століття, приділялось недостатньо уваги. Між наукою і практикою за останні роки відбувся значний розрив щодо питань епізоотології, патогенезу, імунітету, діагностики та боротьби з цими протозоозами. І, незважаючи на достатньо велику кількість наукових розробок і рекомендацій щодо цього протозоозу (Степанян М.М., 1991; Мироненко Ю.Г., 1993; Пономаренко В.Я, 1998; Прус М.П., 2000-2006; Фасоля В.П., 2001; Пригодін А.В., 2002; Краснянчук І.В., 2003; Дубова О.А, 2005), захворювання тварин на бабезіози залишається однією з актуальних проблем, що потребує раціонального вирішення.

Останнім часом виявлено багато випадків безсимптомного або атипового перебігу бабезіозів тварин. Через це достовірний діагноз можна встановити лише за використання серологічних методів досліджень. До того ж, бабезіоносійство стало перепоною спортивному та культурному обміну, продажу тварин за кордон, адже в більшості країн світу з 1970 року введені обмеження на ввіз тварин-паразитоносіїв (Заблоцький В.Т., 2003). Оскільки в Україні до теперішнього часу не було технології виготовлення антигену і, відповідно, серологічних методів діагностики бабезіозів тварин, тому впровадження методик серологічної діагностики є надзвичайно актуальним питанням. Отримання і впровадження у виробництво серологічних тест-систем відкриває нові можливості не лише для своєчасної діагностики цих хвороб та виявлення тварин-паразитоносіїв, а й проведення моніторингових досліджень з метою встановлення епізоотичної ситуації в окремих регіонах країни щодо цих протозоозів, зокрема бабезіозу собак. Вивчення динаміки антитілоутворення за допомогою серологічних методів дає змогу проводити оцінку якості проведених профілактичних заходів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Темадисертаційної роботи є складовою частиною одного із напрямів науково-дослідної роботи кафедри паразитології та тропічної ветеринарії Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва Національного аграрного університету “Вивчити епізоотологію, патогенез та імунітет при бабезіозі тварин, розробити серологічні методи діагностики і науково обґрунтовані заходи боротьби” (номер держреєстрації 0102U006198).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи полягала у розробці серологічних методів діагностики бабезіозу собак та вивченні динаміки титрів антитіл при цьому захворюванні.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі **завдання**:

– отримати сировину, придатну для виготовлення антигену із збудника бабезіозу собак;

– отримати антиген для серологічної діагностики бабезіозу собак;

– провести порівняльну оцінку за показниками активності і специфічності отриманого антигену з іншими антигенами, виготовленими за різними методиками;

– вивчити динаміку титру антитіл при експериментальному бабезіозі собак та при застосуванні тваринам гіперімунної протибабезіозної сироватки крові;

– провести моніторинг морфологічних змін крові при бабезіозі собак.

*Об’єкт дослідження* – розробка методів зажиттєвої діагностики бабезіозу собак.

*Предмет дослідження* – експериментально заражені збудником бабезіозу собаки, бабезіозний антиген, гіперімунна протибабезіозна сироватка крові, титри антитіл, серологічні методи діагностики.

*Методи дослідження* – клінічні, гематологічні, морфологічні, серологічні, паразитологічні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше в Україні отриманий, досліджений і запропонований до застосування антиген для серологічної діагностики бабезіозу собак. Проведена порівняльна характеристика отриманого за нашою методикою антигену з антигенами, виготовленими за іншими методиками за показниками активності, специфічності та антикомплементарними властивостями.

Вивчено динаміку антитілоутворення при експериментальному бабезіозі та при застосуванні собакам гіперімунної протибабезіозної сироватки крові. Доведено, що застосування собакам гіперімунної протибабезіозної сироватки крові викликає циркуляцію комплементзв’язуючих антитіл в їх крові протягом трьох тижнів, що підтверджує її лікувально-профілактичні властивості. Наукова новизна підтверджена трьома деклараційними патентами України на винахід.

**Практичне значення одержаних результатів.** Запропонований метод отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак надасть можливість діагностувати даний протозооз у випадках атипового та безсимптомного перебігу, коли діагностика його ускладнена. Отримані результати щодо динаміки антитілоутворення в подальшому можуть бути використані для вивчення механізмів імунітету при бабезіозі тварин. Вивчена динаміка антитілоутворення на введення собакам гіперімунної протибабезіозної сироватки крові, яка підтверджує її профілактично-лікувальну дію.

За результатами досліджень, проведених на замовлення державного Департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України, розроблено і впроваджено у практику “Рекомендації з діагностики бабезіозів свійських тварин та заходи боротьби з ними” (затверджені науково-методичною радою державного Департаменту ветеринарної медицини Мінагрополітики України, протокол № 2 від 23. 12. 2004 р.).

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі на кафедрі паразитології та тропічної ветеринарії Національного аграрного університету при вивченні дисципліни “Паразитологія та інвазійні хвороби тварин”.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно проведено аналіз наукової літератури з напряму проведених досліджень, викладеного у дисертації. Розроблені схеми досліджень. Виконано та узагальнено весь обсяг клініко-експериментальних досліджень. Проведено клінічні, гематологічні, серологічні, статистичні дослідження. Сформульовано висновки та практичні пропозиції виробництву.

Ряд експериментальних досліджень автором проведено разом з іншими науковцями – доктором ветеринарних наук, професором кафедри паразитології та тропічної ветеринарії М.П. Прусом (розроблений спосіб отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак, спосіб виготовлення гіперімунної протибабезіозної сироватки крові собак і спосіб профілактики бабезіозу у собак, проведені експериментальні дослідження гематологічних змін при застосуванні собакам гіперімунної протибабезіозної сироватки), аспіранткою   
І.В. Краснянчук (проведені дослідження гематологічних змін при експериментальному зараженні собак *Babesia canis*).

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на наукових конференціях професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів НАУ (м. Київ, 2003-2006 рр.), науково-практичній конференції Українського наукового товариства паразитологів, присвяченій 100-річчю з дня народження акад. О.П. Маркевича (м. Севастополь-Ласпі, 2005 р.), Міжнародній науково-практичній конференції паразитологів, присвяченій 100-річчю з дня народження акад. Р.С. Чеботарьова (м. Київ, 2006 р.), Міжнародній науково-практичній конференції “Молоді вчені у вирішенні проблем аграрної науки і практики” (м. Львів, 2006 р.), Міжнародній науково-практичній конференції “Наукові та практичні аспекти ветеринарної медицини в Україні” (м. Біла Церква, 2006 р.), V Міжнародній науково-практичній конференції з проблем дрібних тварин (м. Кам’янець-Подільський, 2006 р.), VI з’їзді паразитоценологів України (м. Харків, 2006 р.).

**Публікації.** Основний зміст дисертації викладений у 15 наукових працях, у тому числі: шістьох наукових статтях, опублікованих у фахових виданнях, перелік яких затверджено ВАК України (чотири з них – одноосібно); методичних рекомендаціях; одному деклараційному патенті України на винахід та двох – на корисну модель, в п’яти тезах доповідей на наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 139 сторінках, складається зі вступу, огляду літератури, власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаної літератури, який включає 316 джерел, з них 196 – іноземних, і містить 7 таблиць, 21 рисунок та 3 додатки.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали і методи досліджень.** Експериментальну частину дисертаційної роботи та апробацію результатів проведених досліджень проводили протягом 2002-2006 рр. на базі наукової лабораторії кафедри паразитології та тропічної ветеринарії Національного аграрного університету.

Об’єктом досліджень були експериментально заражені збудником бабезіозу безпородні цуценята 3-9 місячного віку і дорослі (1-2 річні) тварини, які були використані для отримання сировини при виготовленні антигену. Кров використовували для паразитологічних і морфологічних досліджень. Сироватка крові, отримана від експериментально заражених *Babesia canis* безпородних собак, слугувала для визначення титру антитіл при цьому протозоозі. Сироватка крові, отримана від собак, яким уводили гіперімунну протибабезіозну сироватку крові, слугувала матеріалом для визначення динаміки титру антитіл на її введення.

При виконанні роботи дослідження проводили у шість етапів. Схему досліджень наведено нижче.

Схема досліджень

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| І етап  Отримання сировини, придатної для виготовлення антигену із збудника бабезіозу собак | | | | |
| ІІ етап  Отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак | | | | |
| ІІІ етап  Порівняльна оцінка антигену, виготовленого за нашою методикою, з антигенами, виготовленими за методиками Георгіу Х., Расстригіна О.Є. (2005) та Балагули Т.В.,  Акбаєва М.Ш. (2000) | | | | |
| ІV етап  Встановлення динаміки титру антитіл в сироватках крові, отриманих від хворих на бабезіоз собак, експериментально заражених *B. canis,* в РТЗК за допомогою виготовленого нами антигену | | | | |
| V етап  Встановлення динаміки титру антитіл у сироватках крові собак при застосуванні їм гіперімунної протибабезіозної сироватки крові | | | | |
| Визначення рівня антитілоутворення при застосуванні гіперімунної проти- бабезіозної сироватки здоровим тваринам |  | Визначення рівня анти-тілоутворення при засто-суванні гіперімунної протибабезіозної сироват-ки з наступним експери-ментальним зараженням цуценят збудником бабе-зіозу |  | Визначення рівня анти-тілоутворення при засто-суванні гіперімунної проти-бабезіозної сироватки при попередньому експеримента-льному зараженні собак *Babesia canis* |
| VІ етап  Мікроскопія мазків з метою моніторингу морфологічних змін клітин крові за бабезіозу собак | | | | |

Тварин для досліджень підбирали за принципом аналогів. У кожному досліді їх розподіляли на дослідну і контрольну групи. Дослідних тварин витримували на карантині протягом трьох тижнів, проводили знищення ектопаразитів (бліх та волосоїдів) шляхом дворазового купання в емульсії бутоксу (1 см3 препарату на 1 л води) з інтервалом 10 діб, дегельмінтизацію з використанням антигельмінтиків азипірин чи альбендазол у дозі 1 табл. на   
10 кг маси тіла двічі з інтервалом 7 діб та щеплення проти інфекційних захворювань вакциною Vangard-5. Утримували собак у вольєрах, годували кашами, сухим кормом, хлібом, молоком. Експериментальне зараження цуценят *Babesia canis* проводили шляхом підшкірного введення по 0,3 см3 стабілізованої гепарином крові, отриманої від клінічно хворої собаки при спонтанному бабезіозі з паразитемією 3-5%.

З метою подальшого визначення рівня титру антитіл безпородним цуценятам 3-5 місячного віку підшкірно вводили гіперімунну протибабезіозну сироватку в дозі 1 см3 на кг маси тіла.

Метою **першого етапу** роботи було отримання сировини (крові з максимально високим рівнем паразитемії), придатної для виготовлення антигену із збудника бабезіозу собак. Для цього було проведено три досліди.

У першому досліді використали трьох безпородних собак віком   
1-2 роки, яким через 24 години після спленектомії вводили підшкірно по   
2,5 см3 крові, взятої від спонтанно зараженої збудником бабезіозу собаки з рівнем паразитемії 3%.

У другому досліді п’ятьом цуценятам віком 9-10 місяців, які були носіями збудника бабезіозу, з метою загострення хвороби, була проведена спленектомія та підшкірне введення ураженої бабезіями крові у дозі 1 см3 з паразитемією 3%.

В третьому досліді трьом цуценятам віком 4-6 місяців підшкірно вводили кров у дозі 0,5 см3, отриману від спонтанно хворої на бабезіоз собаки з паразитемією 4%. Спленектомію тваринам не проводили.

За тваринами було встановлене постійне клінічне спостереження. З метою визначення рівня паразитемії у собак дослідних груп щоденно проводили мікроскопічне дослідження мазків крові, яку брали з капілярів кінчика вуха. Мазки виготовляли та фарбували за загальноприйнятими методиками.

Тварин, у яких вдалось отримати максимально високий рівень паразитемії (не нижче 10%), використовували в другому етапі роботи.

На **другому етапі** роботи метою наших досліджень було отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак.

Антиген виготовляли за власною методикою (Деклараційний патент на корисну модель 14392 А61К 39/018 Україна). В якості донорів відбирали цуценят третього досліду першого етапу. З метою встановлення рівня паразитемії, достатнього для отримання антигену, проводили щоденні паразитологічні дослідження мазків крові.

В період максимальної паразитемії у цуценят проводили забір крові. Дану маніпуляцію проводили під загальним наркозом (внутрішньовенно вводили тіопентал натрію з розрахунку 0,5 мг/кг маси тіла). Кров відбирали в стерильні флакони з розчином глюгіциру (співвідношення препарату та крові 1:4).

Відокремлення плазми від формених елементів проводили шляхом центрифугування при 3000 об/хв – 15 хв. Наступним кроком було відмивання еритроцитів у фізіологічному розчині при 6000 об/хв протягом 15 хв 2-3 рази, до просвітлення надосадового шару.

З метою вивільнення паразитів проводили лізис осаду відмитих еритроцитів за допомогою розчину сапоніну.

Лізат еритроцитів відмивали 10-ти кратним об’ємом фізіологічного розчину шляхом трьохразового центрифугування упродовж 30 хв при   
6000 об/хв до просвітлення надосадової рідини.

Верхній шар осаду, який утворювався після центрифугування, переносили у стерильні флакони. З нього за загальноприйнятими методиками виготовляли мазки, фарбували за Романовським і досліджували на наявність бабезій.

Наступним кроком другого етапу роботи було проведення гомогенізації отриманого осаду. Цю маніпуляцію проводили вручну шляхом струшування флакона з скляними бусами протягом однієї години.

Консервували виготовлений антиген розчином азиду натрію з розрахунку 1:10000. Зберігали отриманий антиген у побутовому холодильнику при температурі +2-4ºC.

На **третьому** **етапі** роботи була проведена порівняльна оцінка антигену, виготовленого за нашою методикою, з антигенами, виготовленими за методиками Балагули Т.В., Акбаєва М.Ш. (2000) та Георгіу Х.,   
Расстригіна О.Є. (2005).

З цією метою в якості сировини використовували кров від експериментально заражених п’яти цуценят з паразитемією від 15 до 30%. Від кожної тварини кров розділяли на три рівні частини і проводили обробку за трьома методиками: Балагули Т.В., Расстригіна О.Є. та нашою. Після виготовлення антигенів проводили їх порівняльну характеристику з завідомо позитивними та негативними сироватками за показниками активності, антикомплементарними властивостями та на гемотоксичність (Івченко В.М., 2003). Перевірку на специфічність проводили з сироватками крові, отриманими від собак, хворих на інші паразитарні (дирофіляріоз), інфекційні (лептоспіроз, гемобартонельоз) та з специфічною (від собаки, хворої на бабезіоз). Діагноз на всі ці захворювання був підтверджений лабораторно.

На **четвертому етапі** роботи було проведено дослід з метою встановлення динаміки титру антитіл в сироватках крові, отриманих від хворих на бабезіоз собак, які були експериментально заражені *Babesia canis*. В досліді використали по 7 собак в дослідній та контрольній групах. Термін спостереження становив вісім місяців (211 діб). Для проведення гематологічних досліджень кров у об’ємі 1-1,5 см3 відбирали із *Vena cephalica antebrachii* у шприци, стінки яких були зволожені розчином гепарину.

Підрахунок кількості еритроцитів та лейкоцитів проводили у лічильній камері Горяєва (Кондрахін І.П., 1985). Визначення вмісту гемоглобіну проводили гемоглобінціанідним методом за допомогою тестового набору реактивів фірми “La Chema” (Чехія) на фотоелектроколориметрі (СФ–46) (Бокуняєва Н.І., 1975). Швидкість осідання еритроцитів визначали за методом Панченкова (Муха С.М., 1984). Лейкограму виводили шляхом підрахунку лейкоцитів у фіксованих мазках крові, пофарбованих за методом Романовського (Уиллард М., 2003).

З метою визначення титру антитіл кров об’ємом 5-7 см3 брали у центрифужні пробірки. Після її зсідання пробірки центрифугували при   
1500 об/хв упродовж 5-10 хв. Отриману сироватку крові використовували для подальших серологічних досліджень в реакції тривалого зв’язування комплементу (РТЗК) (Івченко В.М., 2003). При їх проведенні застосовували антиген, виготовлений за нашою методикою.

Метою **п’ятого етапу** роботи було визначення рівня титру антитіл у собак при застосуванні їм гіперімунної протибабезіозної сироватки крові.

З цією метою було проведено три досліди, в кожному з яких було задіяно по три-шість цуценят 3-5 місячного віку.

В першому досліді шістьом клінічно здоровим цуценятам дослідної групи 3-5 міс. віку одноразово підшкірно вводили гіперімунну протибабезіозну сироватку крові в дозі 1 cм3/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин в аналогічній дозі. За собаками було встановлене постійне клінічне спостереження з обов’язковою термометрією. Час спостереження становив 50 діб.

У другому досліді п’ятого етапу вивчали динаміку титру антитіл при застосуванні гіперімунної сироватки з профілактичною метою. З цією метою тваринам дослідної групи підшкірно вводили гіперімунну протибабезіозну сироватку крові по 1 см3/кг маси тіла одноразово. Через три тижні опісля провели експериментальне зараження тварин дослідної і контрольної груп шляхом підшкірного введення по 0,6 см3 стабілізованої гепарином крові, взятої від спонтанно хворої на бабезіоз собаки з рівнем паразитемії 3%. За тваринами було встановлено постійне клінічне спостереження з обов’язковою термометрією, щоденним паразитологічним дослідженням мазків крові. Один раз на тиждень відбирали кров для гематологічних та серологічних досліджень. Термін проведення досліду становив 54 доби.

Собак дослідної групи третього досліду експериментально заражали збудником бабезіозу шляхом підшкірного введення по 0,3 см3 стабілізованої гепарином крові, отриманої від спонтанно хворої собаки з паразитемією 3%. За тваринами було встановлено постійне клінічне спостереження та щоденно проводили паразитологічні дослідження. При появі перших ознак хвороби, підтверджених паразитологічними дослідженнями, вводили гіперімунну протибабезіозну сироватку крові в дозі 1 см3/кг маси тіла. Термін спостереження склав 208 діб.

Дослідження **шостого етапу** були спрямовані на встановлення морфологічних змін клітин крові, які виникають у собак, хворих на бабезіоз (Постников В.С., 1978). Щоденно проводили дослідження мазків капілярної крові. Їх фарбували за методикою Романовського або нефіксовані мазки за методом Паппенгейма (Муха С.М., 1984). В досліджуваних мазках крові визначали ступінь паразитемії. Збудників бабезіозу виявляли на підставі їх морфобіологічних особливостей за допомогою паразитологічних атласів та визначників (Капустін В.Ф., 1955; Крилов М.І., 1996). Визначення характеру морфологічних змін клітин крові проводили за допомогою гематологічних атласів (Нікітін В.Н., 1949; Риган В., 2000).

Таким чином, для проведення експериментальних досліджень було використано 56 собак різного (переважно 4-6-ти місячного) віку. Виготовлено і проаналізовано 2500 мазків крові з метою виявлення збудників бабезіозу та характеристики морфологічних змін клітин крові за даного протозоозу, проведено по 408 гематологічних та серологічних дослідження. Проаналізовано близько 4 тисяч результатів експериментальних досліджень.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ**

**Дослідження основних чинників, які впливають на отримання сировини для виготовлення антигену**

У собак 1-2 річного та 9-10 місячного віку після проведення спленектомії рівень паразитемії не перевищував у середньому 0,3 та 0,5% відповідно. Велике значення має стан індивідуальної резистентності організму собаки (з трьох цуценят 4-6 місячного віку з одного виводку лише у одного паразитемія становила 30%). Відмічений зв'язок між піком паразитемії та піком температурної реакції у дослідних тварин.

Встановлено, що проведення спленектомії собакам (в тому числі цуценятам) не впливає на рівень паразитемії. Основним фактором, який впливає на її рівень, є вік тварини. Максимально висока паразитемія (у середньому 17%) була отримана у цуценят 4-6 місячного віку на 8-му добу досліду.

**Розробка способу отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак**

При виготовленні антигену для серологічної діагностики краще використовувати в якості антикоагулянта та консерванта крові розчин глюгіциру з розрахунку 1:4, що дозволяє подовжити термін обробки крові на 1-2 доби. Кращими режимами центрифугування крові для отримання антигену виявились: при відокремленні плазми – 3000 об/хв 15 хв; відмиванні еритроцитів – 6000 об/хв упродовж 15 хв; при відмиванні лізату еритроцитів – 6000 об/хв 30 хв. Вони дозволяють при мінімальних режимах отримати максимальне очищення матеріалу. Використання сапоніну 1:10000 для лізису еритроцитів значно скорочує термін обробки матеріалу, що запобігає втратам сировини. Застосування в якості консерванту азиду натрію в розведенні 1:10000 не впливає на активність отриманого антигену.

Виготовлений антиген перевіряли на активність, відсутність антикомплементарних властивостей, гемотоксичність, визначали робочий титр в РТЗК в об’ємі 0,2 см3 із завідомо позитивними сироватками високого (не нижче 1:80) та низького (не менше 1:5) титрів, отриманих від хворих тварин, а також із завідомо негативними сироватками (в титрі 1:5). На специфічність антиген перевіряли з сироватками крові собак, що перехворіли на захворювання не протозойної природи (дирофіляріоз, лептоспіроз, гемобартонельоз) в титрі 1:5.

Антиген розводили в титрах 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100. Позитивні та негативні сироватки крові розводили як зазначено вище та інактивували 30 хв при температурі 58-59°С. Позитивні сироватки розводили до їх граничних титрів. Комплемент і гемолізин використовували у їх робочих титрах.

Облік реакції проводили за процентним співвідношенням гемолізованих еритроцитів у хрестах. Для контролю антигену використовували ряд пробірок з фізіологічним розчином замість сироваток, в які додавали ті ж самі компоненти. Проводили контроль гемолітичної системи (фізіологічний розчин з гемолітичною системою).

Встановлено, що виготовлений за запропонованою нами методикою антиген є специфічним, не гемотоксичним, не володіє антикомплементарними властивостями. Він може використовуватись для серологічної діагностики бабезіозу собак, викликаному *Babesia canis*, в титрах від 1:25 до 1:100.

**Порівняльна характеристика антигенів, виготовлених за різними методиками**

На даному етапі досліджень була проведена порівняльна оцінка за показниками гемотоксичності, специфічності, антикомплементарними властивостями і активністю антигенів, виготовлених за методиками   
Балагули Т.В., Акбаєва М.Ш. (І), Расстригіна О.Є., Георгіу Х. (ІІ) та нашою (ІІІ). Проведеними дослідженнями встановлено, що жоден з досліджуваних антигенів не мав гемотоксичних властивостей і не був антикомплементарним. Всі антигени виявилися високоспецифічними. З сироватками крові, яку отримували від хворих на бабезіоз тварин, антигени давали повну затримку гемолізу. Це свідчить про наявність в дослідних сироватках крові антитіл, специфічних до використаних антигенів.

З сироватками крові тварин, хворих на захворювання не протозойної етіології, в титрах 1:5 ці ж антигени викликали повний гемоліз еритроцитів барана в гемолітичній системі. Це вказує на те, що в сироватках відсутні антитіла до використаних в досліді антигенів.

Наступним етапом було проведення порівняльної оцінки активності цих антигенів. З цією метою розведенні антигени (від 1:5 до 1:100) перевіряли з заздалегідь відомими позитивними і негативними сироватками крові в розведенні 1:5. Для контролю використовували ряд пробірок з фізіологічним розчином замість сироваток крові. Дослідження проводили в РТЗК.

Найнижча активність була у антигена, отриманого за методикою Балагули Т.В. та Акбаєва М.Ш. (від 1:5 до 1:25). У антигенів, виготовлених за методиками Расстригіна О.Є., Георгіу Х. (ІІ) та нашою (ІІІ) титри становили відповідно 1:50-1:75 та 1:50-1:100, що свідчить про їх більш високу активність.

Таким чином, всі три досліджуваних антигени не володіють антикомплементарними властивостями, не гемотоксичні та високоспецифічні до сироваток крові, отриманих від хворих на бабезіоз собак. За результатами активності кращими методиками для отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак виявились наша та Расстригіна О.Є., Георгіу Х.

**Вивчення динаміки антитілоутворення при експериментальному зараженні цуценят збудником бабезіозу**

Комплементзв’язуючі антитіла в крові хворих на бабезіоз собак починають з’являтись на десяту добу після експериментального зараження тварин (рис. 1).



Рис. 1 Динаміка антитілоутворення при експериментальному   
зараженні собак *Babesia canis* (n=7)

Титри антитіл зростали від 1:6±0,25, досягаючи максимуму – 1:47±3,4 (Р≤0,001) на соту добу від початку експерименту. Після чого почали знижуватися і становили на 131 добу – 1:26±2,8, а на 190 добу – 1:17±2,1 (Р≤0,001). З метою моделювання повторного зараження собак збудником бабезіозу в ензоотичних осередках при нападі на тварин кліщів-переносників, через 7 місяців (на 190 добу) було проведене повторне зараження собак *Babesia canis*. При цьому в дослідних тварин спостерігали через тиждень різке підвищення титрів антитіл в сироватці крові до 1:151±3,6 (Р≤0,001). З другого тижня після повторного зараження собак (204 доба від початку досліду) титр антитіл поступово починав знижуватись і становив 1:116±11,3 (Р≤0,001).

Таким чином, комплементзв’язуючі антитіла починають з’являтись у крові вже через десять діб після зараження, поступово їх рівень зростає (в нашому досліді досягав максимальних титрів через три місяці) і потім поступово знижується.

При повторному зараженні тварин різке збільшення рівня антитіл спостерігали вже через тиждень, що значно швидше, ніж при першому зараженні.

При аналізі рівня паразитемії та динаміки антитілоутворення паразитів у крові виявляли починаючи з 7-ї доби після експериментального зараження. Максимальна паразитемія спостерігалася на другу-третю добу після виявлення паразитів в мазках крові і сягала 5-10%. Титри антитіл в сироватці крові почали з’являтись на десяту добу після експериментального зараження і були низькими (1:6±0,25), досягаючи максимуму (1:47±3,4) лише через три місяці після експериментального зараження, коли рівень паразитемії був вже надзвичайно низьким і становив 0,01-0,001%.

Також простежується тенденція зростання титрів антитіл при зменшенні рівня паразитемії. Титри антитіл тривалий час утримувалися на високому рівні, а при повторному зараженні спостерігали швидке їх зростання. Рівень паразитемії на початку хвороби був високим. На другий день після піку паразитемії спостерігали різке зниження її рівня. В подальшому відмічали лише незначне зростання паразитемії. Тобто, простежується обернена залежність між рівнем паразитемії та титром антитіл.

Отже, РТЗК не варто використовувати для ранньої діагностики бабезіозу у собак. Проте вона є надзвичайно корисною для виявлення тварин-паразитоносіїв або хронічно хворих тварин, у яких спостерігали надзвичайно низький рівень паразитемії або взагалі не виявляли в мазках крові збудників хвороби на фоні високих титрів антитіл. Комплементзв’язуючі антитіла циркулювали у крові хворих на бабезіоз цуценят протягом всього часу спостереження, що становило вісім місяців. До того ж, ймовірне повторне зараження тварин у природі при нападі кліщів восени або навесні підвищує шанси виявлення тварин-бабезіоносіїв при серологічній діагностиці.

**Динаміка титру антитіл та гематологічних показників у здорових собак після застосування гіперімунної протибабезіозної сироватки крові**

Дослідження динаміки титру антитіл наведено на рис. 2. У тварин дослідної групи після застосування гіперімунної протибабезіозної сироватки крові антитіла в крові виявлялися протягом трьох тижнів на досить високому рівні: 1:62±0,002 – через тиждень після введення (Р≤0,001), через два тижні – 1:48±0,001 (Р≤0,005) та через три тижні титр антитіл становив 1:46±0,005 (Р≤0,005).



Рис. 2 Динаміка титру антитіл при застосуванні гіперімунної протибабезіозної сироватки здоровим собакам (n=6)

Починаючи з четвертого тижня після введення гіперімунної протибабезіозної сироватки крові рівень титрів антитіл почав різко знижуватися. Він становив відповідно на 28-му добу 1:6±0,03, на 36-ту добу – 1:3±0,004, 1:2±0,001 – на 43-тю та 1:1±0,02 на 50-ту добу досліду з високим ступенем достовірності (Р≤0,01).

При клінічному спостереженні у одного цуценяти дослідної групи після введення сироватки на місці ін’єкції відмічали незначне підвищення місцевої температури тіла. У інших тварин жодних видимих клінічних ознак на введення сироватки не спостерігали. На другу добу після введення гіперімунної протибабезіозної сироватки крові у тварин дослідної групи відмічали незначне (у межах фізіологічних коливань) підвищення температури тіла, порівняно з тваринами контрольної групи.

Гематологічними дослідженнями встановлено, що до початку досліду всі показники крові тварин дослідної і контрольної груп не відрізнялися. На 7-му добу після введення сироватки у цуценят дослідної групи встановили достовірне збільшення кількості моноцитів у лейкограмі на 50% (Р≤0,05). Це свідчить про активацію клітинного імунітету. За іншими гематологічними показниками зміни були незначними та недостовірними. Через два тижні у крові тварин дослідної групи спостерігали збільшення кількості еритроцитів на 7,2% (Р≤0,05), вмісту гемоглобіну на 4,4% (Р≤0,05), кількості лейкоцитів на 40,2% (Р≤0,005). Це свідчило про те, що гіперімунна протибабезіозна сироватка крові при її одноразовому застосуванні здоровим собакам викликає стимуляцію гемопоезу.

У крові тварин збільшилася у три рази (Р≤0,05) кількість еозинофілів та на 39,7% (Р≤0,05) – кількість моноцитів, порівняно з контрольною групою. Збільшення кількості еозинофілів через тиждень після введення сироватки, на нашу думку, пов’язане з сенсибілізацією організму тварин. Ця тенденція зберігалася і на 21-шу добу досліду. Через 28-м діб від початку досліду у тварин дослідної групи спостерігали достовірне збільшення кількості еритроцитів на 11,3% (Р≤0,05), вмісту гемоглобіну на 7,1%, кількості лейкоцитів на 34,7%, прискорення швидкості осідання еритроцитів на 46,8% (Р≤0,005). Кількість еозинофілів та моноцитів наближалися до показників контрольної групи. На тридцять шосту добу досліду підвищувалась кількість еритроцитів на 10,1% (Р≤0,05) та вміст гемоглобіну на 9,9%. За іншими морфологічними показниками крові різниця між дослідною і контрольною групою була незначна.

Таким чином, на підставі проведених досліджень встановлено, що введення гіперімунної протибабезіозної сироватки крові собакам посилює гемопоез – збільшується кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну; зростає кількість еозинофілів та моноцитів, прискорюється швидкість осідання еритроцитів.

**Профілактична ефективність гіперімунної протибабезіозної сироватки крові**

При клінічному спостереженні, починаючи з 5-ї доби після

експериментального зараження, у цуценят контрольної групи виявляли пригнічення, млявість, залежування, зниження, а потім відсутність апетиту. Ці ознаки прогресували. Спочатку виявляли анемічність, а згодом іктерічність слизових оболонок. На 14-ту добу після експериментального зараження загинуло двоє цуценят із контрольної групи, а на 17-ту добу – третє. Цуценята дослідної групи протягом всього періоду досліду були активними, грайливими, добре приймали корм.

Після експериментального зараження збудником бабезіозу у цуценят обох груп щоденно виготовляли мазки крові і аналізували рівень паразитемії.

У тварин контрольної групи бабезій в мазках крові виявляли на 8-му добу після зараження, рівень паразитемії зростав і становив, у середньому,   
25% перед їх загибеллю. У цуценят дослідної групи бабезій в мазках крові починали виявляти на 4-ту добу і максимальний рівень не перевищував 1-2% з 6-ї по 10-ту добу після їх експериментального зараження. В наступні дні виявляли лише поодинокі уражені бабезіями еритроцити. В мазках крові знаходили велику кількість фагоцитованих моноцитами та лімфоцитами бабезій та уражених *Babesia canis* еритроцитів.

Через тиждень після експериментального зараження *Babesia canis* в крові цуценят дослідної групи кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну зменшилися в 1,4 рази, порівняно з відповідними показниками до їх зараження. У цуценят контрольної групи ці показники зменшилися незначно. Через два тижні від експериментального зараження вміст гемоглобіну і кількість еритроцитів у крові цуценят дослідної групи, відносно показників до зараження, знижувалися у 1,8 рази. При аналізі лейкограми відмічали збільшення процентного співвідношення лімфоцитів, появу плазматичних клітин. В наступні два тижні спостережень вміст гемоглобіну і кількість еритроцитів в крові тварин дослідної групи зростали, але не досягали відповідних показників до моменту їх зараження.

Після введення гіперімунної сироватки антитіла в сироватці крові через тиждень виявляли у титрах 1:60±1,5 (Р≤0,001). Згодом титри антитіл поступово знижувалися (рис. 3).



Рис. 3 Динаміка титру антитіл при застосуванні гіперімунної протибабезіозної сироватки крові з профілактичною метою, (n=3)

На 22-гу добу досліду проводили експериментальне зараження цуценят збудником бабезіозу. Титр антитіл на цей момент становив 1:44±2,4. На 30-ту добу досліду встановлено, що титри антитіл в крові тварин дослідної групи різко збільшилися і досягали свого максимального рівня – 1:84±3,4. Вони майже у два рази перевищували рівень антитіл на час проведення експериментального зараження та у півтора рази були вищими за максимальний їх рівень після застосування лише гіперімунної сироватки крові.

Згодом титри антитіл поступово знижувалися, але залишалися на досить високому рівні. Мінімальний їх титр спостерігали на 54-ту добу досліду (час спостереження) – 1:34±1,6 (Р≤0,001).

Отже, на нашу думку, гіперімунна протибабезіозна сироватка крові собак, при її введенні з профілактичною метою, попереджує розвиток гострого перебігу бабезіозу. Інокуляція збудника в організм тварин на фоні застосування гіперімунної сироватки посилює антитілоутворення. Це явище може бути використано у проведенні імунізації тварин проти збудника цього протозоозу.

**Динаміка титру антитіл після застосування гіперімунної протибабезіозної сироватки крові з лікувальною метою**

З метою встановлення лікувальних властивостей гіперімунної протибабезіозної сироватки крові, після появи перших клінічних ознак бабезіозу та підтвердження діагнозу мікроскопічним дослідженням мазків крові, собакам дослідної групи підшкірно вводили зазначену сироватку у дозі 1 см3/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин.

Клінічний прояв бабезіозу у тварин відмічали на 4-5-ту добу після зараження. Температура тіла у собак обох груп підвищувалася до 39,6°С.

При клінічному спостереженні у цуценят дослідної групи значних відхилень загального стану після введення гіперімунної сироватки не спостерігали. Вони були активними, жвавими і грайливими, хоча видимі слизові оболонки мали блідий колір. В мазках крові виявляли *Babesia canis*.

У тварин контрольної групи відмічали підвищення температури тіла до 40°С, виражену анемічність видимих слизових оболонок, які через дві-три доби ставали жовтяничними, тварини були в’ялими, апатичними, погано приймали корм, переважно лежали. Двоє цуценят загинуло.

При аналізі рівня паразитемії встановили, що її пік у тварин обох груп припадав на 6-8-му добу після експериментального зараження, що, за нашими спостереженнями, співпадало з завершенням інкубаційного періоду та початком гострого перебігу бабезіозу. Після цього паразитемія у цуценят обох груп різко знижувалася і знаходилася на такому рівні до кінця спостережень. Періоди незначного підвищення паразитемії (але не вище за 0,5%) співпадали з періодами підвищення температури тіла. З 8 по 18 добу у тварин дослідної групи, яким вводили гіперімунну сироватку крові, рівень паразитемії був достовірно нижчим, ніж у тварин контрольної групи. Проте, починаючи з 19-ї доби досліду ця різниця була незначна і суттєво не відрізнялася від рівня паразитемії у тварин контрольної групи. Це можна пов’язати з переходом захворювання у хронічну форму.

Таким чином, у тварин дослідної групи також відмічали ознаки бабезіозу, але вони були менш яскраво виражені і не тривалі, порівняно з собаками контрольної групи. Рівень паразитемії у них не перевищував 1-2%, тоді як у цуценят контрольної групи він сягав 4,5%.

При дослідженні сироваток крові, отриманих від тварин дослідної групи (рис. 4), було встановлено, що титри антитіл, починаючи з 7-ї доби досліду, становили 1:30±0,002 і поступово збільшувалися: на 14-ту добу – 1:36±0,001, на 21-шу добу – 1:49±0,003, на 28-му– 1:51±0,002 та досягали максимуму на 48-му добу від початку досліду – 1:60±0,001 (Р≤0,01), після чого поступово починали знижуватися.

На 63-тю добу досліду титр антитіл знижувався до 1:19±0,012, на   
76-ту добу – 1:15±0,01, на 90-ту – 1:12±0,002, досягаючи низьких показників приблизно на 187-му добу від початку досліду – 1:3±0,01.

У тварин контрольної групи титри антитіл зростали з 1:4±0,015 на   
7-му добу після експериментального зараження, досягаючи максимуму (1:48±3,4) на 90-ту добу від початку експерименту, після чого почали знижуватися. Так, на 187-му добу після експериментального зараження титр антитіл сягав 1:16±2,8, а на 208-му добу – 1:3±1,5.



Рис. 4 Динаміка титру антитіл при застосуванні гіперімунної протибабезіозної сироватки собакам, хворим на бабезіоз, (n=6)

Отже, введення гіперімунної сироватки при гострому перебігу бабезіозу сприяло швидкій активізації клітинно-гуморального імунітету і нормалізації гематологічних показників. Тварини легше переносили хворобу і швидше одужували.

**Морфологічні зміни клітин крові за бабезіозу собак**

Патологія клітин крові залежить від перебігу хвороби. В гострий період бабезіоз собак характеризується вираженим анізоцитозом, пойкілоцитозом з переважанням витягнутих, веретеноподібних, каплеподібних форм, появою гіпохромних еритроцитів, поліхроматофілів, сфероцитів, клітин-тіней, тороцитів.

Встановлена залежність між активним фагоцитозом уражених бабезіями еритроцитів моноцитами і лімфоцитами та рівнем паразитемії, що свідчить про участь цих клітин в імунній відповіді організму на дію збудника і є своєрідним індикатором перебігу хвороби. Це явище доцільно використовувати при прогнозуванні перебігу цього протозоозу з метою подальшої корекції лікувальних заходів.

Дослідження морфологічних змін крові має допоміжне значення при встановленні діагнозу. Особливо у випадках атипового перебігу бабезіозу, з низьким рівнем паразитемії, коли мікроскопією мазків крові не виявили збудників захворювання.

**ВИСНОВКИ**

1. У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукових завдань, які стосуються удосконалення зажиттєвої діагностики бабезіозу собак. Виявлено основні чинники, які впливають на рівень паразитемії. Запропоновано спосіб виготовлення антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак. Проведена порівняльна характеристика антигенів, виготовлених за різними методиками. Доведено, що активність антигену істотно залежить від ступеня паразитемії взятої сировини та режиму її обробки. Вивчено динаміку антитілоутворення при експериментальному зараженні собак *Babesia canis* та при застосуванні гіперімунної протибабезіозної сироватки крові. Вивчено характер морфофункціональних змін крові при бабезіозі собак.

2. Проведення спленектомії суттєво не впливає на рівень паразитемії *Babesia canis* у собак. З метою одержання крові (як сировини для виготовлення антигену) з максимальною кількістю збудників бабезіозу краще використовувати цуценят 4-5 міс. віку.

3. Застосування при виготовленні антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак в якості антикоагулянта та консерванта крові розчину глюгіциру з розрахунку 1:4 дозволяє подовжити час її обробки на 1-2 доби. Запропоновані режими центрифугування крові дозволяють при мінімальних режимах отримати максимальне очищення матеріалу. Використання сапоніну (1:10000) для лізису еритроцитів значно скорочує термін обробки матеріалу та запобігає втратам сировини. Застосування в якості консерванта азиду натрію в розведенні 1:10000 не впливає на активність антигену.

4. Отриманий за запропонованою нами методикою антиген є специфічним, не гемотоксичним, немає антикомплементарних властивостей і може використовуватись для серологічної діагностики бабезіозу собак. За показниками активності, специфічності, гемотоксичності та антикомплементарними властивостями він не поступається антигену, виготовленому за методикою Расстригіна О.Є., Георгіу Х. (2005) і за показниками активності перевищує антиген, виготовлений за методикою   
Балагули Т.В., Акаєва М.Ш. (2000).

5. В сироватці крові собак, експериментально заражених *Babesia canis,* комплементзв’язуючі антитіла з’являються в низьких титрах (1:6±0,25) на 10-ту добу і досягають максимальних показників (1:47±3,4,) на 100-ту добу (Р<0,01), після чого поступово знижуються. При повторному зараженні собак збудником бабезіозу вже через тиждень спостерігається різке підвищення титрів антитіл в сироватці крові (до 1:151±3,6).

6. Введення гіперімунної протибабезіозної сироватки крові забезпечує циркулювання комплементзв’язуючих антитіл в крові собак протягом трьох тижнів у титрах 1:62±0,002–1:46±0,005, що попереджає розвиток гострого перебігу бабезіозу. Підшкірне введення крові із збудником бабезіозу на фоні застосування гіперімунної протибабезіозної сироватки значно подовжує час їх циркуляції (8 місяців – час спостереження) та підвищує рівень титрів комплементзв’язуючих антитіл в крові. Це явище може бути використане для розробки вакцини проти бабезіозу.

7. В гострий період бабезіозу собак патологія клітин крові характеризується вираженим анізоцитозом, пойкілоцитозом з переважанням зірчастих, витягнутих, веретеноподібних, каплеподібних, сфероїдних форм, появою гіпохромних еритроцитів, поліхроматофілів, що опосередковано свідчить про розвиток гемолітичної анемії. Дослідження морфологічних змін крові має допоміжне значення при встановленні діагнозу на бабезіоз.

8. Встановлена пряма залежність між ступенем активного фагоцитозу уражених бабезіями еритроцитів моноцитами і лімфоцитами та рівнем паразитемії, що свідчить про сприятливий перебіг захворювання.

**ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Для діагностики бабезіозів тварин запропоновано:

1. «Рекомендації з діагностики бабезіозів свійський тварин та заходи боротьби з ними», затверджені науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України (протокол № 2 від 23 грудня 2004 р.);

2. «Спосіб отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак», деклараційний патент на корисну модель 14392 Україна, А61К 39/018. Бюл. № 5 від 15.05.2006 р.

**СПИСОК ОСНОВНИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

**Статті, опубліковані у збірниках наукових праць і наукових журналах**

1. **Семенко О. В.** Отримання сировини для виготовлення антигену з метою діагностики бабезіозу собак // Науковий вісник НАУ. – К. – 2005. – Вип.86. – С. 195-198.
2. **Семенко О.В.** Морфологічні зміни клітин крові за бабезіозу собак // Вестник зоологии – К. – 2005. – Вып.19. – Ч.2. – С. 289-290.
3. **Семенко О.В.** Динаміка антитілоутворення при експериментальному зараженні собак збудником Babesia canis // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім.   
   С.З. Гжицького. – Львів. – 2006. – Т.8. – №2 (29). – Ч.1. – С. 162-166.
4. **Семенко О.В.** Динаміка титру антитіл у собак при застосуванні протибабезіозної гіперімунної сироватки крові // Збірник наукових праць. Ветеринарні науки (Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини). – Харків. – 2006. – №13 (38). – Ч.3. –С. 350-354.
5. **Семенко О.В.**, Прус М.П., Галат В.Ф. Отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак // Науковий вісник НАУ. – 2006. –   
   №98. – С. 168-172. *(Здобувачем запропонована методика отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак, проведені дослідження щодо показників активності і специфічності антигену)*
6. **Семенко О.В.**, Прус М.П. Зміни клітин крові за бабезіозу у собак // Електронний журнал: Наукові доповіді НАУ. – 2006. – №4. – [www.nd.nauu.kiev.ua](http://www.nd.nauu.kiev.ua). *(Здобувач описала зміни клітин крові, що спостерігаються при цьому протозоозі).*

**Методичні рекомендації**

1. Рекомендації з діагностики бабезіозів свійських тварин та заходи боротьби з ними / Прус М.П., Березовський А.В., Галат В.Ф.,   
   Краснянчук І.В., **Семенко О.В.** – К.: Ветінформ, 2005. – 18 с. *(Здобувач описала серологічну діагностику бабезіозу собак).*

**Патенти**

1. Деклараційний патент України на корисну модель 14078 Україна, А61К 39/395. Спосіб профілактики бабезіозу собак / Прус М.П., Галат В.Ф. **Семенко О.В.**; заяв. 01.07.2004, опубл. 15.05.2006, бюл. №5 *(Здобувачем проведено патентний пошук і взята участь у застосуванні гіперімунної протибабезіозної сироватки крові, з метою профілактики бабезіозу, обґрунтовано її ефективність).*
2. Деклараційний патент України на корисну модель 14392 Україна, А61К 39/018. Спосіб отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак / **Семенко О.В.**, Прус М.П., Галат В.Ф.; заяв. 15.11.2005, опубл. 15.05.2006, бюл. №5 *(Здобувачем проведено патентний пошук і запропоновано спосіб отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак, обґрунтовано його ефективність).*
3. Патент на винахід 75249 Україна, А61К 39/395. Спосіб виготовлення гіперімунної протибабезіозної сироватки крові собак /   
   Прус М.П., Галат В.Ф. **Семенко О.В.**; заяв. 01.07.2004, опубл. 15.03.2006, бюл. №3 *(Здобувачем проведено патентний пошук і взята участь у виготовленні гіперімунної протибабезіозної сироватки крові).*

**Тези доповідей на наукових конференціях**

1. Епізоотична ситуація щодо бабезіозу собак у деяких містах України / Прус М.П., Галат В.Ф., Козачок В.С.. Дідаш К.В., Краснянчук І.В., **Семенко О.В.** / Тези доп. 2-ї конф. проф.-викл. складу і аспірантів ННІВМЯБПАПК – К., 2003. – С. 58. *(Здобувач узагальнила результати досліджень).*
2. Прус М.П., **Семенко О.В.** Експериментальні дослідження впливу гіперімунної протибабезіозної сироватки крові собак на імунокомпетентні клітини крові // Тези доп. конф. проф.-викл. складу і аспірантів ННІВМЯБПАПК. – К., 2004. – С. 82. *(Здобувач брала участь у проведенні експериментальних досліджень та виступила з доповіддю).*
3. Прус М.П., **Семенко О.В.** Експериментальні дослідження по вивченню впливу гіперімунної протибабезіозної сироватки крові собак на імунокомпетентні клітини крові та з’ясування можливості використання її для профілактики бабезіозу собак // Матеріали ІХ міжн. наук.-практ. конф. “Проблеми вет. обслуговування дрібн. дом. тварин” – К., 2004. – С. 21-26. *(Здобувач брала участь у проведенні експериментальних досліджень).*
4. Прус М.П., **Семенко Е.В.** Применение гипериммунной противобабезиозной сыворотки для профилактики бабезиоза собак // Матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції з проблем дрібних тварин. – Одеса, 2006. – С. 24-27. *(Здобувач узагальнила результати досліджень).*
5. **Семенко О.В.** Динаміка титру антитіл при експериментальному бабезіозі собак // Тези доп. конф. проф.-викл. складу, наук. співроб. і аспірантів ННІВМЯБПТ – К., 2006. – С. 94.

**Семенко О.В. Удосконалення методів зажиттєвої діагностики   
бабезіозу собак. –** Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.11 – паразитологія, гельмінтологія. – Національний аграрний університет, Київ, 2007.

Дисертацію присвячено розробці та отриманню антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак, вивченню динаміки титру антитіл при експериментальному зараженні тварин збудником бабезіозу та при застосуванні протибабезіозної гіперімунної сироватки крові з профілактичною та лікувальною метою. Досліджено морфологічні зміни крові при бабезіозі собак з метою їх можливого використання в діагностиці та при прогнозуванні даного протозоозу.

За результатами виконаних досліджень вперше в Україні був отриманий, досліджений і запропонований антиген для серологічної діагностики бабезіозу собак.

Вперше проведена порівняльна характеристика за показниками активності, специфічності та актикомплементарними властивостями виготовленого нами антигену з антигенами, виготовленими за іншими методиками.

За допомогою отриманого антигену вивчено динаміку антитілоутворення при експериментальному бабезіозі та при застосуванні собакам виготовленої гіперімунної протибабезіозної сироватки. Доведено, що застосування гіперімунної протибабезіозної сироватки крові викликає циркуляцію комплементзв’язуючих антитіл в крові протягом трьох тижнів, що підтверджує її лікувально-профілактичні властивості.

**Ключові слова:** антиген, бабезіоз, реакція тривалого зв’язування комплементу, серологічна діагностика, титр антитіл.

**Семенко Е.В. Усовершенствование методов прижизненной диагностики бабезиоза собак.** – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.11 – паразитология, гельминтология. – Национальный аграрный университет, Киев, 2007.

Целью исследований было разработать серологические методы диагностики бабезиоза (пироплазмоза) собак и изучить динамику титров антител при этом заболевании.

Для достижения цели были поставлены следующие задания:

– получить сырье для изготовления антигена для серологической диагностики бабезиоза собак;

– получить антиген для серологической диагностики бабезиоза собак;

– провести сравнительную оценку за показателями активности, чувствительности и специфичности полученного антигена с антигенами, полученными за другими методиками;

– отработать существующие серологические методы диагностики и провести поиск новых для диагностики бабезиоза у собак;

– изучить динамику титров антител при экспериментальном бабезиозе у собак и при введении животным гипериммунной противобабезиозной сыворотки крови;

– провести мониторинг морфофункциональных изменений клеток крови при бабезиозе у собак.

Впервые в Украине получен и апробирован антиген для серологической диагностики бабезиоза собак. Было установлено, что при изготовлении антигена для серологической диагностики лучше использовать в качестве антикоагулянта и консерванта крови раствор глюгицира с расчета 1:4, что позволяет продолжить время обработки крови на 1-2 дня. Рекомендуемые режимы центрифугирования крови при получении антигена (при отделении плазмы – 3000 об/мин 15 мин; отмывания эритроцитов –   
6000 об/мин на протяжении 15 мин; при отмывании лизата эритроцитов –6000 об/мин 30 мин) позволяют при минимальных режимах обработки получить максимальное очищение материала. Использование сапонина 1:10000 для лизиса осадка эритроцитов значительно уменьшает время обработки материала и уменьшает потери сырья. Использование в качестве консерванта азида натрия в разведении 1:10000 не влияет на активность полученного антигена. Который показал высокую специфичность, не обладал антикомплементарными и гемотоксическими свойствами и может быть рекомендован для использования при диагностике бабезиоза собак в РДСК.

Результатами исследований сравнительной характеристики активности, специфичности и актикомплементарных свойств полученного нами антигена с другими антигенами, установлено, что он не уступает по этим показателям исследованным антигенам.

С помощью полученного антигена изучена динамика антителообразования при экспериментальном бабезиозе и при введении собакам гипериммунной противобабезиозной сыворотки крови. Доказано, что введение гипериммунной противобабезиозной сыворотки крови вызывает циркуляцию комплемент-связывающих антител в крови на протяжении трёх недель.

На основании проведенного мониторинга морфофункциональных изменений клеток крови при разных формах течения бабезиоза у собак установлена зависимость между активным фагоцитозом пораженных бабезиями эритроцитов моноцитами и лимфоцитами и уровнем паразитемии. Это можно использовать при прогнозировании данного протозооза. Выявление активного фагоцитоза моноцитами и лимфоцитами пораженных бабезиями эритроцитов и самих возбудителей свидетельствует о благоприятном исходе заболевания.

Исследования морфологических изменений клеток крови имеет дополнительное значение при постановке диагноза на данный протозооз.

**Ключевые слова:** антиген, бабезиоз (пироплазмоз), реакция длительного связывания комплемента, серологическая диагностика, титр антител.

**Semenko Е. Improvement methods in one's lifetime-diagnostic of dog’s babesiosis.** – Manuscript.

The dissertation for the receipt of scientific degree of the Candidate of Veterinary Sciences in specialty: 16.00.11 – Parasitology, Helminthology. – National Agricultural University, Kyiv, 2007.

The dissertation is devoted to development and reception of an antigene for serological diagnostic of dog babesiosis, to studying of antibodies credit dynamic at experimental infection of animals with the babesiosis infection agent and at using the antibabesiosic hyperimmune whey of blood with the preventive and medical purpose. Morphological changes of blood at dog babesiosis are investigated with the purpose of their possible use in diagnostics and at forecasting this protozoosis.

By results of the lead researches for the first time in Ukraine the antigene for serological diagnostic of dog babesiosis has been received, investigated and offered for use. For the first time the comparative characteristic of parameters of activity, specificity and anticomplementaric properties of the antigene which was produced by us with antigenes which were produced with other techniques is lead.

By means of the received antigene the dynamic of antibody formation is investigated at experimental babesiosis and at using to dogs the produced hyperimmune antibabesiosic whey of blood. It is proved, that using the hyperimmune antibabesiosic whey of blood causes circulation complement connecting antibodies in blood within three weeks that confirms its medical and preventive maintenance properties.

**Key words:** antigen, babesiosis, Prolonged Complement Fixation Test, serological diagnostic, titers of antibody.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>