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

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

### ЯНЕНКО УЛЯНА МИКОЛАЇВНА

 УДК 619 : 616.98:579.84:636.95(078)

КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ДІАГНОСТИКИ ПАСТЕРЕЛЬОЗУ

 ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ І СВИНЕЙ

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

# АВТОРЕФЕРАТ

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата ветеринарних наук**

Київ – 2009

# Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини Української академії аграрних наук

**Науковий керівник** – доктор ветеринарних наук, старший науковий

 співробітник **Ушкалов Валерій Олександрович**,

#  Державний науково-дослідний контрольний інститут

#  біотехнології і штамів мікроорганізмів, директор

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

 **Володимир Андронович**, Національний університет

біоресурсів і природокористування України, професор кафедри мікробіології, вірусології і біотехнології

 кандидат ветеринарних наук **Руденко Павло**

**Анатолійович,** Луганський національний аграрний

 університет, доцент кафедри хірургії і хвороб

 дрібних тварин

Захист дисертації відбудеться ’’\_\_28\_”\_травня2009 р. о 10\_год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус 3, ауд.28

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, к. 41

Автореферат розісланий\_27 квітня 2009 р.\_

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради С. В. Міськевич

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. **Однією з головних проблем промислового тваринництва є респіраторні хвороби молодняку великої рогатої худоби (ВРХ) та свиней інфекційної етіології, які характеризуються гострим або хронічним перебігом, розвитком катарального запального процесу в дихальних шляхах, різким зниженням продуктивності та значною смертністю. В країнах СНД протягом 1991–2003 рр. захворюваність тварин пневмоніями у господарствах становила 14,7–42,4 %, а смертність від них – 6,7–13,9 % (Андросик Н. Н. та ін., 2003).**

**В останні роки легенева форма пастерельозу набула значного поширення в Україні, Росії, Білорусії, країнах західної Європи, і частіше реєструється як хронічна респіраторна патологія (Carty D. H., Porter D. B. et al., 1986;** **Литвин В. П., Олійник Л. В. та ін., 2000). Пастерельозна інфекція часто перебігає в асоціації з інфекційним ринотрахеїтом ВРХ, класичною чумою свиней, цирковірусною інфекцією другого типу (*PRDC 2*), репродуктивно-респіраторним синдромом свиней (*PRRS*), мікоплазмозами ВРХ і свиней, бордетельозом. Хвороби змішаної етіології зумовлюють непередбачувану загибель сільськогосподарських тварин. Частота виділення пастерел від тварин, які мають клінічні ознаки пневмоній, досягає 75–87 % (Thomson R., 1975; Verma N. D., Saxena C. S., 1987; Pijoan C., Fuentes M., 1987; Абрамов А., Пороло Л., 1996; Міланко О. Я., 1999; Заболотна В. П., 2002).**

**Аналіз вітчизняної літератури вказує на те, що єдиним поширеним методом лабораторної діагностики пастерельозу тварин є бактеріологічний метод. На жаль, усі ці дослідження досить громіздкі та тривалі (Leesley B. A., Cofner A. W., 1985; Москалюк В. І., Волинець Л. К., 1987;** **Foged N. T., 1992).**

**Лабораторна діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарсь-ких тварин і людини поповнюється сучасними методами, такими як імуно-ферментний аналіз (ІФА) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) (Eamens
G. J. et al., 1988), проте ці методи ще не набули широкого застосування в Україні.**

**А тому виникає необхідність у визначенні місця ПЛР у системі діагностики пастерельозної інфекції тварин. Необхідно враховувати, що головним аспектом серед заходів боротьби пастерельозу є своєчасна діагнос-тика та виявлення тварин-пастерелоносіїв.**

 Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами**. Дисер-таційну роботу виконано згідно з Державним планом науково-дослідних робіт Інституту ветеринарної медицини УААН інв. № 02.20 07 ”Розробити засоби діагностики, лікування та профілактики пастерельозу свиней”, державний реєстраційний номер – 0197 U 012745.**

Мета і завдання дослідження. **Визначення місця ПЛР у системі діагностики  пастерельозу;  розробити  ефективну  схему  оздоровчих  захо-дів при пастерельозі ВРХ і свиней та впровадити її у ветеринарну практику.**

**Для досягнення цієї мети були поставленні такі завдання:**

**- провести порівняльний аналіз методів виявлення *P. multocida* у ВРХ і свиней;**

**- підтвердити етіологічне значення *P. multocida* при респіраторних захворюваннях ВРХ і свиней;**

**- вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні та антигенні властивості штамів пастерел, виділених від ВРХ і свиней;**

**- одержати очищену сироватку крові ВРХ з метою використання її при культивуванні пастерел;**

**- дослідити рівень антилізоцимної активності *P. multocida*, як одного з критеріїв персистентності мікроорганізму;**

**- порівняти ефективність бактеріологічних досліджень і ПЛР при виявленні тварин-пастерелоносіїв;**

 **- провести індикацію пастерел у** **кормах тваринного походження, ґрунті, гної, стічних водах боєнь і боєнських відходах з використанням різних методів досліджень;**

**- розробити схеми лікувально-оздоровчих заходів при пастерельозі сільськогосподарських тварин з контролем їх ефективності за допомогою ПЛР.**

***Об’єкт дослідження* – методи діагностики і профілактики пастере-льозної інфекції тварин.**

***Предмет дослідження:* молекулярно-генетична тест-система для прижиттєвого виявлення *P. multocida* від ВРХ і свиней і з біологічного матеріалу.**

***Методи дослідження*. У роботі використовували клініко-епізоото-логічні бактеріологічні, серологічні (РА та ІФА), молекулярно-генетичні (ПЛР) та статистичні методи (підрахунки середніх статистичних показників кількісних експериментальних даних, визначення рівня ймовірності отриманих результатів).**

Наукова новизна одержаних результатів. **Експериментально обґрунтовано і доведено ефективність застосування ПЛР для діагностики пастерельозу ВРХ і свиней. Підтверджена значна перевага ПЛР для індика-ції збудника хвороби порівняно із бактеріологічним методом лабораторної діагностики, вивчені біологічні властивості пастерел та іншої мікрофлори, виділеної з патологічного матеріалу від тварин, які загинули від ураження респіраторного тракту.**

**Визначено сероварну належність пастерел, які беруть участь в епізоотичному процесі легеневих форм пастерельозу ВРХ і свиней. Розроблено спосіб отримання очищеної сироватки крові ВРХ, як спеціаль-ного компонента при культивуванні пастерел.**

**Запропоновано спосіб визначення антилізоцимної активності *Р. mul-tocida* з використанням лісобакту (лізоциму хлориду).**

**Розроблено та відпрацьовано ефективні схеми лікувально-оздоровчих заходів при пастерельозі ВРХ і свиней, ефективність яких контролюється методом ПЛР.**

**Наукова новизна підтверджена деклараційними патентами № 21236 та № 14518/1**

Практичне значення одержаних результатів. **У практику роботи обласних, районних лабораторій державної ветеринарної медицини та в діяльність господарств впроваджені:**

**- методичні рекомендації “Лабораторна діагностика пневмоній свиней” (затверджено науково-методичною радою Державного департаменту ветери-нарної медицини МінАПК України від 17. 12. 1999 р., протокол № 2);**

**- “Рекомендації з профілактики та оздоровлення свинарських госпо-дарств від пастерельозу” (затверджено науково-методичною радою Держав-ного департаменту ветеринарної медицини України від 17 грудня 1999 р., протокол № 17);**

**- “Інструкція щодо контролю пастерельозу тварин” (затверджено науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медици-ни МінАПК України, протокол № 4 від 22–23 грудня 2004 р.);**

**- “Настанова з лабораторної діагностики пастерельозу тварин та птиці” (затверджено науково-методичною радою Державного департаменту ветери-нарної медицини МінАПК України, протокол № 3 від 20. 12. 2006 р.);**

 **- “Спосіб отримання сироватки крові великої рогатої худоби для культивування пастерел” (деклараційний патент на корисну модель, затверд-жений 03. 10. 2006 р., № 21236);**

**- “Спосіб визначення антилізоцимної активності бактерій *P. multocida* із використанням лісобакту (лізоциму хлориду)” (заявка на деклараційний патент корисної моделі, від 14. 10. 2008 р., № u 2008 09429 Вх. № 14518/1).**

Особистий внесок здобувача. **Здобувач особисто розробила напрями й схему експерименту, провела основні дослідження культурально-морфо-логічних, біохімічних і вірулентних властивостей виділених штамів. Розробку праймерів та діагностичні дослідження у ПЛР проводили спільно з науковим  співробітником  лабораторії  молекулярної діагностики і ІФА ДНКІБШМ В. В. Кацимоном, співробітниками лабораторії бактеріології Національного науково-дослідного ветеринарного інституту (National Vete-rinary Research Institute) B. Borkowska-Opaska, I. Rukowska-Jurga (м. Пулави, Польща). Аналіз та узагальнення результатів, отриманих при виконанні експериментальної частини роботи, зроблені особисто. Самостійно здобува-чем сформульовані основні положення та висновки дисертації.**

Апробація результатів дисертації. **Результати досліджень, за темою дисертаційної роботи, були заслухані та обговорені на засіданнях вченої ради та методичної комісії Інституту ветеринарної медицини УААН (1999–2003 рр.), на засіданні науково-методичної ради Державного комітету ветеринарної медицини України (17.12.99), на Міжнародній науково-практичній конференції „Розвиток ветеринарної науки в Україні: здобутки та проблеми” (м. Харків, 24–26 вересня 1997 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених „Проблеми патології тварин та шляхи їх вирішення” (м. Київ, 11 жовтня 2000 р.); Міжнародній науково-практичній конференції „Молоді вчені у вирішенні проблем аграрної науки та практики” (м. Львів, 15–16 червня 2006 р.).**

Публікації. **Основні положення** **дисертації викладено у 15 працях, в тому числі 11 статтях – у фахових виданнях, перелік яких затверджено ВАК України та деклараційних патентах.**

Обсяг та структура дисертації. **Дисертація викладена на 163 сторінках друкованого тексту і складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки, пропозиції виробництву, додатки, список використаних джерел. Роботу ілюстровано 36 рисунками і 22 таблицями. Список використаних джерел включає 239 найменувань, в тому числі 86 зарубіжних авторів.**

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Робота виконувалась протягом 1997–2006 рр. у лабораторії ветери-нарно-санітарної експертизи Інституту ветеринарної медицини УААН, лабораторії бактеріології Центральної державної лабораторії ветеринарної медицини, в лабораторії молекулярної діагностики і ІФА ДНКІБШМ.**

**Епізоотологічні дослідження, клінічні та паталого-анатомічні зміни у ВРХ і свиней, хворих на пастерельоз, у господарствах України проводили за загальноприйнятими методами (Жаров А. В., Налетов Н. А., 1982; Колосов А. А., 1986).**

**Для проведення наукових досліджень були використані референтні та епізоотичні штами пастерел.**

Для діагностики пастерельозу в ПЛР нами були проведені дослідження із розробленими парами праймерів: для *P. multocida* серовару А CAPA-FWD CAPA-REV; для серовару В CAPВ-FWD CAPD -REV; для серовару D CAPD-FWD CAPD-REV, також спільну пару праймерів, що кодує рід *P. multocida* КМТ-1. ПЛР проводили в три основні етапи: виділення ДНК із біопроби, безпосередньо ПЛР (ампліфікації) та реєстрації результатів за допомогою електрофорезу.

**Бактеріологічні дослідження проводили згідно з „Настановою з лабора-торної діагностики пастерельозів тварин та птахів” (Павленко М. С., Манченко В. М., Ображей А. Ф., Завірюха А. І., 1995) і включали в себе мікроскопію мазків та мазків-відбитків із патологічного матеріалу, культуральні (пасажування виділених культур на поживних середовищах (4–5 разів)) та вивчення біохімічних властивостей, трипанофлавінова проба, біопроби та серотипізації на білих мишах (за Картером).**

**Проводили непрямий варіант твердофазного ІФА з використанням набору діагностикумів. Застосовувалась тест-система НДІ епідеміології та мікробіології ім. М. Ф. Гамалеї (Росія), де використовуються імуноглобуліни проти IgG тварин, мічені пероксидазою. Фон, або рівень порога, вище якого сироватку оцінювали як позитивну для *P. multocida*, становив 575 (Каширин В. В., 1989).**

**Реакцію аглютинації (РА) ставили з метою виявлення антитіл до пастерельозного антигену в сироватці крові телят і свиней. Використовували антиген, який виготовляли з референтних музейних штамів *P. multocida*, одержаних із ВДНКІ ветпрепаратів МСГ РФ.**

**Дослідження персистентних властивостей *P. multocida* проводилось визначенням антилізоцимної активності (АЛА) за методикою О. В. Бухаріна (1999 р.).**

**При математичному опрацюванні результатів досліджень використову-вали комп’ютерні програми статистичної обробки Microsoft Excel.**

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Епізоотична ситуація господарств, які обстежувались у процесі виконання дисертаційної роботи. **В структурі інфекційних хвороб пастере-льоз тварин в Україні до 1999 року посідав п’яте місце після колібактеріозу, дизентерії, сальмонельозу, бешихи. У період 2000–2004 рр. пастерельоз часто супроводжує респіраторні хвороби і займає серед інфекційних захворювань третє місце. При виконанні роботи нами були досліджені тваринницькі господарства різних областей України, які вважались благополучними щодо пастерельозної інфекції. Але в них реєструються захворювання органів дихання, як вірусної, так і бактеріальної етіології (парагрип-3, респіраторна форма хвороби Ауескі, інфекційний вірусний ринотрахеїт (ІВР), циркові-русна інфекція, мікоплазмоз, гемофільоз, бордетельоз, інфекційний атрофіч-ний риніт (ІАР), легеневий прояв хламідіозу тощо). Тому мета наших подальших досліджень була спрямована на виявлення *P. multocida* у господарствах, де реєструються інфекційний ринотрахеїт ВРХ, інфекційний атрофічний риніт свиней та інші респіраторні захворювання цих тварин.**

**При визначенні специфічності застосованої ПЛР, нами були проведені дослідження із розробленими праймерами для *P. multocida* сероварів А, В і D та родовим праймером КМТ–1, із додатковим залученням референтних штамів мікроорганізмів: *E. coli, S. tiphymurium, S. dublin, S. choleraesuis* та
*B. bronchiseptica*. У цьому разі позитивний результат було отримано тільки при виявленні ДНК пастерели, що свідчить про специфічність праймерів для діагностики даного збудника.**

Виявлення *P. multocida* у ВРХ, хворої на інфекційний ринотрахеїт (ІРТ). **Дослідженнями проб крові (n = 20) від бугайців на відгодівлі за допомогою ІФА, виявлено антитіла до вірусу інфекційного ринотрахеїту в 90,0 % випадках.**

**Паралельно проби крові досліджувались бактеріологічно і в ПЛР з метою виявлення *P. multocida*.**

**Так, за результатами ПЛР ДНК пастерел виявили у 20 (100,0 %) пробах крові від бугайців, тоді як при бактеріологічному дослідженні виявлено всього 17 (85,0 %) (рис. 1).**

**Рис. 1. Ефективність різних методів індикації *P. multocida***

 **від бугайців, хворих на інфекційний ринотрахеїт.**

**Крім *P. multocida* (40,0 %) у дослідних зразках крові було вивлено *B.bron- chiseptica* (25,0 %); *S. typhimurium* (15,0 %); *M. bovis* (10,0 %); *S. pyogenes* (10,0 %).**

**Для проведення внутрішньовидової диференціації застосували ПЛР.
*P. multocida* серовару А визначалась у 7 випадках (35,0 %), серовару D – у 13 випадках (65,0 %).**

Виявлення *P. multocida* у свиней з ознаками інфекційного атрофічного риніту. **З метою** **індикації *P. multocida* з трьох господарств**  **було відібрано зразки слизу носової порожнини та проби з мигдаликів (заглоткових) від загиблих та вимушено забитих свиней, хворих на ін-фекційний атрофічний риніт (ІАР) (по 30 проб кожного дослідженого мате-ріалу). Дослідження проводили за допомогою ПЛР.**

**Рис. 2. Співвідношення кількості виділених *P. multocida* з мигдаликів від загиблих тварин і слизу носової порожнини від хворих на ІАР свиней**

**(1 – КСГАП «Новогригорівка»; 2 – ТОВ «Союз»; 3 – ТОВ «Рута»).**

**У результаті проведених досліджень було встановлено, що індикація
*P. multocida* з мигдаликів та зі слизової оболонки носової порожнини майже однакова (рис. 2). У КСГАП „Новогригорівка” пастерелу виділяли з мигда-ликів у 38,0 % випадків, із слизу носової порожнини –37,0 % випадків; у ТОВ “Союз” пастерелу виділено з мигдаликів і слизу носової порожнини у 35,0 % випадків; у СВК “Рута” відповідно у 27,0 % і 28,0 % випадків.**

**Отримані результати свідчать, що колонізація *P. multocida* у мигдаликах і слизу носової порожнини знаходиться на аналогічному рівні. З метою постановки прижиттєвого діагнозу рекомендуємо досліджувати проби слизу носової порожнини, що, в свою чергу, полегшує організацію профілактичних заходів у господарствах.**

**Дослідження крові свиней (n = 31), хворих на ІАР, виявили в ПЛР присутність ДНК *P. multocida* таких сероварів: А – 5,7 ± 0,6 (90,12 %) випадків та D 6 ± 0,6 (92,6 %) випадків.**

 **За допомогою ІФА** **антитіла виявлені у 18 випадках (60,0 %), титри проб крові в ІФА були до 1 : 460. Отже, у дослідних зразках концентрація антитіл була низькою відносно порогу патогенності, що підтверджує циркуляцію збудника серед сприйнятливих тварин.**

 Порівняння методів індикації P. multocida в патологічному матеріалі ВРХ і свиней. **Протягом 2001–2004 рр. провели 248 бактеріологічних досліджень патологічного матеріалу від загиблих і вимушено забитих тварин (ВРХ – 104 і свиней – 140 проб) із попереднім діагнозом – ураження органів дихання. У цьому разі виділено 177 культур мікроорганізмів. З них до *P. multocida* віднесено 62 культури (35,5 %).**

 **При виконанні цих досліджень нами експериментально доведено можливість застосування очищеної сироватки крові ВРХ для культивування пастерел, ці результати стали підставою для оформлення деклараційного патенту на корисну модель “Спосіб отримання сироватки крові великої рогатої худоби для культивування пастерел”, № 21236.**

**Найбільший відсоток пастерел при бактеріологічному дослідженні виділявся з легень (94,7 %) та лімфатичних вузлів (38,8 %) (підщелепових, заглоткових, бронхіальних, середостінних), рідше – з серця і печінки (22,3 – 23,0 %).**

 **Рис. 3. Спектр і частота виділення збудників у зразках патологічного матеріалу від загиблих та вимушено забитих сільськогосподарських тварин з ознаками пневмонії.**

**Поряд з пастерелами із патологічного матеріалу було виділено ізоляти таких бактерій: *E. coli* – 9 (5,3 %), *D. lanceolatus* – 14 (7,7 %), *S. dublin* – 3
(2,5 %), *S. tуphіmurium* – 6 (3,2 %), *S. choleraesuis* – 14 (4,1 %), *S. aureus* – 2 (1,2 %), *B. bronchiseptica* – 37 (21,0 %), *H. parasuis* – 12 (6, 77 %), у свиней – *M. hyorhinis* – 12 (5,5 %), у ВРХ – *M. bovis* – в тих же відсотках,
*P. haemolytica* – 4 (2,5 %) (рис. 3).**

**Результати дослідження вказують на суттєву етіологічну роль збудника пастерельозу при респіраторних захворюваннях і підтверджують їх поліетіо-логічність у ВРХ і свиней.**

**При дослідженні патологічного матеріалу від ВРХ (n = 50) позитивний результат індикації *P. multocida* за допомогою ПЛР одержали у 49,3 випадках (98,6 %), а від свиней (n = 50) – у 49,7 випадках (99,4 %); в той час за допомогою бактеріологічних досліджень *P. multocida* виділялась відповідно у 41 (82,0 %) та 44 (89,4 %) випадках. У процесі проведення серотипізації виділених штамів пастерел на білих мишах одержали результати, що збігаються з даними ПЛР-аналізу. Було встановлено, що до *P. multocida* серовару А належить 38 (61,3 %) культур, а до *P. multocida* серовару D – 24 (38,7 %). Таким чином, обидва методи серотипізації виявились ефективними, але результати за допомогою ПЛР одержали за 5 годин, тоді як для проведення серотипізації на білих мишах треба до трьох діб.**

Застосування ПЛР для прижиттєвого виявлення збудника пастере-льозу від великої рогатої худоби. **З метою виявлення присутності збудника пастерельозної інфекції проводили дослідження проб крові від 125 голів телят з 5 господарств чотирьох областей України (Київської, Миколаївської, Чернігівської та Херсонської). Усі тварини мали ознаки респіраторних захворювань різного ступеня тяжкості, тоді як обстежені господарства офіційно були благополучними щодо пастерельозу. Результати ПЛР-аналізу свідчать, що із 125 проб слизу носової порожнини були виявлені у 97 (77,6 %) випадках пастерели, більшість з яких належали до серовару А – 52 (53,6 %) та до серовару D – 39 (40,2 %) випадків (р ≥ 0,005).**

**З метою порівняння чотирьох методів діагностики пастерельозу було відібрано 20 проб крові від телят з СТОВ “Промінь” Арбузинського району Миколаївської області. Цей матеріал досліджено у ПЛР, бактеріологічним методом, ІФА та РА. В результаті отримали такі дані: в 19 (95,0 %) випадках виявлено ДНК-фрагмент *P. multocida* за допомогою ПЛР; при бактеріо-логічному методі – 14 випадках (70,0 %), виявлення антитіл до *P. multocida* в ІФА – 13 (65,0 %) випадках , а в РА – 10 випадках (50,0 %) (рис. 4).**

****

Рис. 4.Порівняльна ефективність методів індикації *P. multocida* в пробах крові телят, хворих на бронхопневмонію.

**Дослідженнями крові телят (n = 20), хворих на бронхопневмонію, виявили в ПЛР-тесті присутність *P. multocida* таких сероварів: А – 8 (40,0 %) випадків та D – 12 (60,0 %) випадків.**

**За методом Картера, у хворих телят було визначено *P. multocida* серовару А – у 4 випадках (20,0 %), а серовару D – у 8 випадках (40,0 %), що свідчить про нижчу чутливість проведеної діагностики, ніж ПЛР. Таким чином, прове-дення внутрішньовидової диференціації сероварів *P. multocida* за допомогою ПЛР досить швидке і ефективне.**

**Застосування методу ПЛР для прижиттєвого виявлення збудника пастерельозу від свиней, хворих на бронхопневмонію.** З метою виявлення присутності збудника пастерельозної інфекції в організмі тварин було досліджено 125 голів свиней української великої білої породи (ремонтний молодняк та відлучених поросят) з 5 господарств чотирьох областей України (Київської, Луганської, Миколаївської та Херсонської). Всі тварини мали ознаки респіраторних захворювань різного ступеня важкості.

Одержані результати в ПЛР при дослідженні проб носового слизу від свиней з ознаками респіраторних захворювань свідчать, що із 125 проб слизу носової порожнини в 101 (80,7 %) пробі виявлено пастерели, переважно серовару А – 61 (60,39%) випадків.

Для порівняння ефективності чотирьох методів діагностики пастерельозу, було відібрано 20 проб крові від поросят на відгодівлі з КСП „Трубіж” Баришівського району Київської області, хворих на бронхопневмонію (рис.5).

Отримані результати свідчать, що застосування ПЛР для виявлення ДНК збудника пастерел при респіраторних захворюваннях у свиней становить 100,0 %, індикація бактерій бактеріологічним методом досліджень стано-
вить – 80,0 %, виявлення антитіл в ІФА – 53,3 % (титри від 1 : 128 до 1 : 412) і РА – 46,7 %

Рис. 5. Порівняльна ефективність методів індикації *P. multocida* в пробах

крові свиней, хворих на бронхопневмонію.

**При проведенні за допомогою ПЛР внутрішньовидової диференціації пастерел, виділених при бронхопневмонії свиней, отримали таку картину: до серовару А віднесено 11 (55,0 %) штамів, серовару D –9 (45,0 %) із загальної кількості 20 штамів.**

 Виявлення тварин-пастерелоносіїв. **З метою визначення носійства пастерел у господарствах** **СТОВ “Промінь”, ТОВ „Нива” та КСП „Колос”, неблагополучних щодо респіраторних хвороб ВРХ і свиней, нами були проведені дослідження змивів із носової порожнини клінічно здорових 50-ти телят (1 міс.) і 86-ти поросят (2 – 4 міс.), які були придбані для поповнення поголів’я. Дослідження проводили ПЛР і бактеріологічними методами.**

 **У цьому разі встановлено, що за допомогою ПЛР виявлено наявність ДНК бактерій *P. multocida* у всіх досліджених зразках, у той же час ефективність бактеріологічних досліджень була дещо нижчою, в середньому на 16,5 % (табл. 1).**

***Таблиця 1* –** Виявлення тварин-пастерелоносіїв ПЛР і бактеріальним методом

|  |  |
| --- | --- |
| **Вид****тварин****n (голів)** | Виділення пастерел при застосуванні різних тест-систем |
| **бактеріологічний** | **ПЛР** |
| **ВРХ****n = 50** | **38****(76,0 %)** | **50****(100,0 %)** |
| **Поросята****n = 86** | **77****(89,5 %)** | **85****(98,8 %)** |

**У пробах крові дослідних тварин у ІФА та РА визначали наявність антитіл до пастерельозного антигену. Одержали такі результати: позитивно прореагувало до *P. multocida* в РА 18 (36,0 %) проб крові ВРХ і 37 (43,0 %) – від поросят. ІФА виявив антитіла в 21 (42,0 %) пробі крові від ВРХ та 45 (52,3 %) від поросят.**

**Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що ПЛР доцільно використовувати для експресного виявлення тварин-пастерелоно-сіїв, що, в свою чергу, запобігає утворенню стаціонарних осередків захворю-вання і контамінації збудником предметів довкілля.**

Дослідження антилізоцимної активності P. multocida сероварів А, В і D, як одного із аспектів персистенції бактерій. **Здатність бактерій специфічно інактивувати лізоцим господаря визначена як антилізоцимна активність (Бухарін О. В., Усвяцов Ю. В., 1982) і віднесена до ознак персистенції мікроорганізмів. Суть проведеного досліду полягає у визна-ченні здатності штамів культур бактерій *P. multocida* сероварів А, В, та D рости на середовищі з різною концентрацією лізоциму, тоді як тест-культура *M. luteus* не здатна до росту на середовищі з лізоцимом. Рівень анти-лізоцимної активності (АЛА) визначали за зоною затримки росту тест-культури.**

У виділених пастерел від тварин-пастерелоносіїв дослідили АЛА і порівняли її з АЛА референтних штамів (табл. 2). За одержаними резуль-татами постановки АЛА найбільший рівень антилізоцимної активності епізоотичних штамів спостерігався в умовно-патогенних сероварах *P. mul-tocida* А і D і становила 7,5 мкг/см3 та 5,9 мкг/см3 відповідно. Це обумовлює досить стійку їх персистентність у навколишньому середовищі. Висо-копатогенний серовар *P. multocida* В має АЛА 2,9 мкг/см3 Це пов’язано із стійкістю збудника у довкіллі, не зважаючи на його патогенність для тварини.

 *Таблиця 2* – **Рівень АЛА референтних і епізоотичних штамів *P.multocida*, виділених від тварин-пастерелоносіїв (Р ≥ 0,01)**

|  |  |
| --- | --- |
| Серовари *P.multocida*(n=15) | Концентрація лізоциму, мкг/см3 (АЛА) |
| епізоотичні | референтні |
| А | 5,01 ± 0,16 | 7,5 ± 0,2 |
| В | 2,9 ±0,15 | 3,2 ± 0,2 |
| D | 5,9 ±0,22 | 6,1 ± 0,22 |

Для порівняння: найвищий рівень АЛА у інших досліджених референтних штамів: *E. coli* 08 становить 9 мкг/см3 (епізоотичних – 6 мкг/см3), а
*S. typhimurium* – 5 мкг/см3 епізоотичних – 4 мкг/см3).

Одержані результати показали, що пастерели, як і інші умовно-патогенні бактерії, схильні до персистенції та їм притаманна АЛА. Це спонукало нас до проведення досліджень з метою модернізації відомого способу визначення АЛА, де замість загальноприйнятого лізоциму було застосовано – лісобакт (лізоциму хлорид), чим було знижено собівартість проведених досліджень. На запропонований спосіб було оформлено заявку і отриманий деклара-ційний патент “Спосіб визначення антилізоцимної активності бактерій
*P. multocida* із використанням лісобакту (лізоциму хлориду)” заявка від 14. 10. 2008 р., № u 2008 09429 Вх. №14518/1.

Об’єкти довкілля (ґрунт, гній, корми, продукти боєнських відходів, стічні води боєнь), як фактори передачі пастерельозної інфекції**. Нами проведено бактеріологічні дослідження та постановка ПЛР для індикації
*P. multocida* з відвійок, гною, ґрунту, стічних вод і боєнських відходів у господарствах, неблагополучних щодо респіраторних захворювань, що дало можливість їх порівняти (табл. 3).**

**Як видно з табл. 3, за допомогою ПЛР можливо виявити більше позитивних зразків порівняно з бактеріологічними дослідженнями.**

**Із загальної кількості позитивних зразків за допомогою ПЛР виявлено 89,2 % проби, а при бактеріологічних дослідженнях 60,0 % випадків. Необхідно визначити, що від 36 зразків дослідного матеріалу не вдалося виділити пастерели бактеріологічними методами, що свідчить про ефективність ПЛР-тесту при даних дослідженнях.**

***Таблиця 3* –** Індикація пастерел з предметів довкілля за допомогою

 бактеріологічного дослідження (Бак. д.) та ПЛР

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Метод дослідження** | **Об’єкт дослідження, n** | Разом |
| **відвійки, 70** | **гній,****20** | **грунт,****20** | **стічні води,****10** | **продукти боєнських відходів,****10** |
| **ПЛР** | **68 (97,1%)** | **17** **(85,0 %)** | **11**  **(55,0 %)** | **10** **(100,0 %)** | **10** **(100,0 %)** | **116** **(89,2 %)** |
| **Бак. д.** | **57 (81,42%)** | **10** **(50,0 %)** | **3** **(15,0 %)** | **3 (30,0%)** | **5 (50,0 %)** | **78 (60,0 %)** |

Ефективність лікувально-оздоровчих заходів при пастерельозі сви-ней і ВРХ за результатами ПЛР. **У КСГАП „Новогригорівка” Генічеського району Херсонської області протягом останніх років серед свиней великої білої породи реєстрували спалахи респіраторних захворювань та інфекційного атрофічного риніту. При проведенні оздоровчих заходів застосовували антибіотик тетрациклінового ряду пролонгованої дії “Окситетрациклін 200” виробництва фірми “ITLV” (Барселона, Іспанія) в дозі 1 см3 (200 000 ОД) на 10 кг живої маси. Після проведення антибіотико-терапії щепили свиней полівалентною формолвакциною проти сальмонельо-зу, пастерельозу та диплококової пневмонії (ППД) Вітебської біофабрики 1 раз на рік.**

Однак уже через 2–3 місяці після припинення лікувально-профілактичних заходів у тварин спостерігались респіраторні захворювання, зокрема бронхо-пневмонії та ІАР.

**Для проведення аналізу ефективності зазначених лікувально-профілак-тичних заходів ми використали ПЛР, яку було проведено через 60 діб після застосування полівалентної вакцини ППД. Для дослідження брали проби крові від відлучених поросят (35 голів) і ремонтних свинок (15 голів) української великої білої породи.**

Встановлено, що у 60,0 % тварин виявлено ДНК пастерел. А саме *P. multocida* серовару А ідентифікувалась у 29 тварин (58,0 %), а серовару D – в 23 (46,0 %). Отже, застосована схема оздоровлення свинопоголів’я не досконала і не дає бажаних результатів.

За результатами проведеної антибіотикограми на чутливість виділеної у господарстві мікрофлори підібрали антибіотик пролонгованої дії „Флорон” (виробництва “KRKA”,Словенія), який раніше не застосовували та запро-понували вакцину проти пастерельозу, сальмонельозу та колібактеріозу свиней „Пасако”, у якій поєднано три серовари пастерели (А, В та D), два штами сальмонел та один – шиготоксинпродукуючої ешерихії. Після чого, через 60 діб після останньої ін’єкції вакцини нами було застосовано ПЛР, як діагностичний тест ефективності антибіотикотерапії та специфічної профі-лактики, проведених у даному господарстві. Від відлучених поросят і ремонтних свинок відібрали проби крові (n = 45) для виявлення *P. multocida*, сероварів А, В та D.

**У дослідних матеріалах після проведеної терапії ДНК пастерел в ампліфікатах не виявлено. Це свідчить про перевагу проведеної антибіо-тикотерапії антибіотиком широкого спектра** „**Флороном**” **та ефективність застосованої вакцини „Пасако”.**

Наступний експеримент було проведено у СТОВ “Промінь” Арбузинсь-кого району Миколаївської області, де респіраторні захворювання ВРХ, в основному, реєструються на відгодівлі та у телят 1–2-місячного віку. У цьо-му разі застосовуються антибіотики тетрациклінового ряду пролонгованої дії “Tetravet L. A.” (в дозі 1 см3 на 10 кг живої маси) та вакцинація напіврідкою гідроокисалюмінієвою вакциною проти пастерельозу ВРХ (виробник – Вітебська біофабрика), до складу якої входять інактивовані штами пастерел № 796, 5264.

Ефективність проведення зазначених заходів у СТОВ “Промінь” оцінювали, застосовуючи ПЛР.

Досліджуваний матеріал (кров від 45 голів телят на відгодівлі віком 4–7 місяців) відібрали через 60 діб після останнього щеплення.

При проведенні ПЛР-тесту на виявлення ДНК *P. multocida* одержали негативний результат по всіх трьох сероварах, а це свідчить, що застосована схема оздоровчих заходів досить ефективна і запобігає розвитку пастерельозу в даному господарстві.

Результати ПЛР-тесту свідчать про високу ефективність запропонованої нами схеми проведених лікувально-оздоровчих заходів проти факторного пастерельозу, які викликаються сероварами А та D *P. multocida* та їх асоціаціями.

 **ВИСНОВКИ**

**У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, що виявляється в ефективності застосування ПЛР для діагностики пастерельозу великої рогатої худоби та свиней. Експери-ментально обґрунтована домінуюча роль *P. multocida* в асоціаціях інфекцій-них агентів, які викликають респіраторні захворювання сільськогос-подарських тварин і визначено їх сероварний склад. Вдосконалено методику прижиттєвої діагностики пастерельозу. Запропоновано неспецифічні і специфічні засоби профілактики хвороби.**

**1. Експериментально доведено ефективність застосування ПЛР з метою виявлення пастерел у патологічному матеріалі від загиблих і вимушено забитих тварин. Так, за допомогою ПЛР генетичний матеріал *P. multocida* виявляється від ВРХ (n = 50) у 49 випадках (98,6 %), від свиней (n = 50) – у 49 (99,4 %), тоді як за допомогою бактеріологічного методу – у 41 (82,0 %) та у 44 (89,4 %) відповідно. Доведено досконалість внутрішньовидової диференціації *P. multocida* за допомогою ПЛР. При дослідженні патологічного матеріалу сероварний склад був такий: серовар А – 61,3 %, серовар D – 38,7 %.**

 2. Ефективність ПЛР при індикації пастерел у пробах крові та слизу носової порожнини від хворих на бронхопневмонію телят становить 100,0 %, тоді як бактеріологічного методу – 87,5 % (р ≥ 0,1). Ефективність застосу-вання ПЛР при виявлені *P. multocida* із проб клінічного матеріалу від відлучених поросят з ознаками респіраторних захворювань становить
100,0 %, в той час як бактеріологічні дослідження були позитивними у 80,0 % випадків (р ≥ 0,1). Отримані дані дають підстави рекомендувати слиз носової порожнини тварин, як об`єкт прижиттєвої діагностики пастерельозу .

 **3. Основним бактеріальним агентом, який виявлявся при респіраторних захворюваннях у сільськогосподарських тварин, є *P. multocida*. Диферен-ціація сероварів пастерел за допомогою праймерів ПЛР досить швидка (протягом 5 год.) та ефективна, тоді як серотипування на білих мишах тривале (до 5 діб) і трудомістке. При бронхопневмоніях телят переважають *P. multocida* серовари А (40,0 %) і D (60,0 %); у свиней – А (55,0 %) та D (45,0 %) відповідно. *P. multocida*серовар В у дослідних зразках не виявлений.**

 **4. Встановлено, що ІРТ ВРХ супроводжується бактеріальними асоціаціями такого складу: *P. multocida (*40,0 %),при внутрішньовидовій серотипізації значна частка належить серовару D (65,0 %); *B. bronchiseptica* (25,0 %); *S. typhimurium* (15,0 %); *M. bovis* (10,0 %); *S. pyogenes* (10,0 %). Від свиней з ознаками ІАР виділяється бактеріальна асоціація: *P. multocida*(57,0 %); *B. bronchiseptica* (35,0 %). При дослідженні 31 проби крові свиней ПЛР у 83,87 % випадків виділено ДНК пастерел серовару А та у 90,32 % – серовару D.**

 5. Встановлено, що пастерелам притаманна антилізоцимна активність, що свідчить про потенційну можливість персистенції мікроорганізму. Найвищий рівень антилізоцимної активності (АЛА) *P. multocida* має серовар А – 6 мкг/см3 референтного і 5 мкг/см3 епізоотичного штаму. АЛА *P. mul-tocida* серовару D становить 6 мкг/см3 як референтного, так і епізоотичного штаму, серовару В – 3 мкг/см3.

6. При виявленні тварин-пастеролоносіїв доцільно використовувати ПЛР, оскільки за допомогою цього методу було виявлено 100,0 % прихованих тварин-носіїв, у той час як за допомогою серологічних реакцій виявлено менше 50 % випадків. Пастерелоносійство у 45,5 % випадків зумовлюють
*P. multocida* сероварів А та D, які виявляються у клінічно здорових тварин.

1. Застосування ПЛР дозволяє виявити на 27,0 % більше контамі-нованих предметів довкілля (відвійок, ґрунту, гною, продуктів боєнських відходів, стічних вод боєнь), ніж бактеріологічними дослідженнями, що дає підстави використовувати ПЛР з метою виявлення можливих факторів передачі збудника.
2. **Експериментально доведена можливість контролю впроваджених лікувально-оздоровчих заходів при пастерельозі ВРХ і свиней за допомогою ПЛР. З цією метою індикацію збудника в біологічному матеріалі контро-льованих тварин проводять через 60 днів після впроваджених лікувально-оздоровчих заходів.**

 ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

**На підставі проведених досліджень у виробничих і лабораторних умовах для практичного застосування пропонуються:**

**- методичні рекомендації “Лабораторна діагностика пневмоній свиней” (затверджені науково-методичною радою Державного департаменту ветери-нарної медицини МінАПК України від 17.12.1999 р., протокол № 2);**

**- “Рекомендації з профілактики та оздоровлення свинарських господ-дарств від пастерельозу” (затверджені науково-методичною радою Держав-ного департаменту ветеринарної медицини України від 17 грудня 1999 р., протокол № 17) для лікарів-фахівців і викладачів;**

**-** “**Інструкція щодо контролю пастерельозу тварин” (затверджена науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медици-ни МінАПК України від 22–23 грудня 2004 р., протокол № 4);**

**- “Настанова з лабораторної діагностики пастерельозу тварин і птиці” (затверджена науково-методичною радою Державного департаменту ветери-нарної медицини МінАПК України від 20.12.2006 р., протокол № 3);**

**- “Спосіб отримання сироватки крові великої рогатої худоби для культивування пастерел” (деклараційний патент на корисну модель затверджений 3.10.2006 р., № 24780/1);**

**- “Спосіб визначення антилізоцимної активності бактерій P. multocida із використанням лізобакту (лізоциму хлориду)” (заявка на деклараційний патент корисної моделі, від 14. 10. 2008 р., № u 2008 09429 Вх. №14518/1).**

СПИСОК ОСНОВНИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив факторів зовнішнього середовища на виживання збудника пастерельозу / Т. І. Тарасюк, Л. К. Волинець, В. І. Москалюк, В. М. Яненко, У. М. Яненко // Вісник Сумського державного аграрного ун-ту.– 1999. – Вип.4. – С. 181–183. *(Здобувач брала участь в експериментальних дослідженнях, аналіз одержаних результатів*).

2. Характеристика властивостей епізоотичних штамів пастерел, виділених від свиней / Л.К. Волинець, Т.В. Мазур, Т.І. Тарасюк, У.М. Янен-ко // Аграрний вісник Причорномор’я. –1999. – Вип. 2 (7). – С. 45–47. (*Здобувач брала участь у виділенні штамів пастерел і визначенні ступеня їх патогенності для білих мишей)*.

3. Яненко У.М. Виявлення свиней-пастерелоносіїв за допомогою РНГА / У. М. Яненко // Науковий вісник Національного аграрного ун-ту. – 2000. – Вип. 28. – С. 228–230.

4. Прокоп’юк О.Г. Пастерельозна пневмонія свиней / О.Г. Прокоп’юк,
У.М. Яненко, Т.В. Мазур // Вісник Білоцерківського державного аграрного ун-ту.– Біла Церква, 2000. – Вип. 11.– С. 97–100. (*Здобувач провела роботу з гіперімунізації кролів для отримання типоспецифічних сироваток і виготовлення капсульних антигенів для постановки РНГА).*

5. Ефективність щеплення свиней вакциною „Пасако” / Л. К. Волинець, Т. В. Мазур, Т. І. Тарасюк, О. І. Москаленко, Л. В. Зоценко, У. М. Яненко та ін. // Науковий вісник Національного аграрного ун-ту.– 2001. – Вип.
36. – С. 111–114. (*Здобувач* б*рала участь у визначенні антигенної активності вакцинних штамів пастерел*).

6. Виробниче застосування „Набору типоспецифічних сироваток для серологічного ідентифікування штамів P. multocida”/ В. І. Москалюк,
Т. В. Мазур, Л. К. Волинець У. М. Яненко // Ветеринарна біотехнологія. – Київ : Аграрна наука, 2004. – Бюл. № 4. – С. 135–138. (*Здобувач брала участь в експериментальних дослідженнях, аналізі одержаних результатів, підго-товці матеріалів до публікації*).

7. Яненко У. М. Імунобіологічні показники відповіді організму поросят, імунізованих вакциною „Пасако” // Ветеринарна біотехнологія.– Київ : Аграрна наука, 2004. – Бюл. № 5. – С. 179–183.

 8. Яненко У., Ефективність гідрокисалюмінієвої вакцини „Пасако” проти пастерельозу, сальмонельозу та колібактеріозу свиней / У. Яненко,
Л. Волинець, Т. Мазур // Ветеринарна медицина України. – 2005. – № 7. –
С. 41–42. (*Здобувач брала участь в експериментальних дослідженнях, аналізі одержаних результатів, підготовці матеріалів до публікації).*

9. Яненко У. М. Епізоотична ситуація по пастерельозу свиней у гос-подарствах України за 2001–2004 рр. таетіологічна структура захворюван-
ня // Ветеринарна біотехнологія.– Київ : Аграрна наука, 2005. – Бюл. № 6. – С. 229–237.

10. Волинець Л. К. Вакцина проти пастерельозу, сальмонельозу та колібактеріозу свиней „Пасако” при респіраторних захворюваннях свиней, які ускладнюються інфекційним атрофічним ринітом/ Л. К. Волинець,
У. М. Яненко, В. І. Москалюк // Науковий вісник Львівської Національної академії вет. мед. ім. С. З. Гжицького, Львів, 2006. – Т. 8, № 2 (29). –– С. 23–27. (*Здобувач* *провела дослідження з вивчення етіології збудників атрофічного інфекційного риніту свиней)*.

11. Сравнительная оценка эффективности вакцин против пастереллеза свиней / Л. К. Волынец, Т. В. Мазур, О. Г Прокопьюк, У. М. Яненко // Материалы Междунар. науч.-практ. конф.: Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве. – Минск, 1998. – С.82–83.

**12**. **Методичні рекомендації “Лабораторна діагностика пневмоній свиней” / О. Я. Міланко, О. Г. Міланко, Н. О. Авраменко, Л. К. Волинець,
Т. І. Тарасюк , В. М. Яненко, У. М. Яненко – Суми: Вид-во СДАУ. – 1999. – 23 с. (*Здобувач брала участь у вивченні етіології респіраторних хвороб свиней, визначенні домінанти пастерел при респіраторних асоціаціях*).**

13. Рекомендації з профілактики та оздоровлення свинарських госпо-дарств від пастерельозу / О. Я.Міланко, О. Г. Міланко, Н. О. Авраменко,
 Л. К. Волинець, Т. В. Мазур, О Г. Прокоп’юк, Т. І. Тарасюк, В. М. Яненко, У. М.Яненко – Суми: Вид-во СДАУ. – 2000. – 10 с.(*Здобувач провела дослідження по виявленню збудника пастерельозу в продуктах тваринного походження, стічних водах та в ґрунті*).

14. Інструкція щодо контролю пастерельозу тварин / В. О. Ушкалов,
 Б. Т.Стегній, Т. Ю. Трускова, А. Ф. Бабкін, Є. П. Петренчук, О. В. Обу-хівська, І. І. Головащук, П. П. Цімох, В. І. Сікачина, В. М. Плис, А. М. Го-ловко, В. Г.Скрипник, А. В. Абрамов, Л. К. Волинець, Т. В. Мазур,
У. М. Яненко, О. І. Сосницький , В. П. Заболотна. – Київ, 2004. – 25 с. (*Здобувач брала участь в дослідженні культурально-морфологічних властивостей P. multocida сероварів А, В, D та F*).

15. Настанова з лабораторної діагностики пастерельозу тварин та птиці/ О. І. Сосницький, В. П. Заболотна , А. А. Руденко, А. Ф. Руденко, Б. Т. Сте-гній , А. Ф. Бабкін, В. О. Ушкалов, А. М. Головко, В. Г. Скрипник, Л. М. Да-видовська, П. П. Сімох, В. І. Сікачина, А. В. Абрамов, Г. М. Данисюк, Л. К. Волинець, У. М. Яненко, В. Ю. Кассіч, Г. О. Міланко, Н. О. Авраменко. – Харків, 2007. – 12 с. (*Здобувач брала участь в експериментальних дослідженнях, ізоляції та визначенні діагностично-необхідних властивостей культур P. multocida*).

16. Пат. А Україна, А 61К39/00. „Спосіб отримання сироватки крові великої рогатої худоби для культивування пастерел” МПК (2006), Яненко
У. М., Компанієць К. С., Волинець Л. К; Інститут ветеринарної медицини Української академії ігрірних наук. – № 21236; Заявл. 10.07.06; Опубл. 15.03.07, Бюл. № 3. – 4 с. (*Здобувач брала участь в експериментальних дослідженнях, аналізі одержаних результатів, підготовці матеріалів до публікації*).

17. Заявка на деклараційний патент корисної моделі “Спосіб визначення антилізоцимної активності бактерій P. multocida з використанням лісобакту (лізоциму хлориду)” / У. М. Яненко від 18.07.2008 р., № u 2008 09429.

Яненко У.М. Клініко-експериментальне обгрунтуваннядіагностики пастерельозу великої рогатої худоби і свиней. **– Рукопис.**

**Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2009.**

Дисертація присвячена вивченню застосування та науково-експери-ментальному обґрунтуванню методу полімеразної ланцюгової реакції для діагностики пастерельозу сільськогосподарських тварин і визначенню діагностичної цінності даного методу. Вивчено етіологічні структури респі-раторних захворювань великої рогатої худоби і свиней, а також домінуючу роль пастерел, як другорядного чинника при інфекційному ринотрахеїті ВРХ та інфекційному атрофічному риніті свиней. Показано вагому роль
*P. multocida*, сероварів А та D у цих захворюваннях.

Розроблено **“**Настанову з лабораторної діагностики пастерельозу тварин та птиці”, затверджену науково-методичною радою державного Депар-таменту ветеринарної медицини МінАПК України, протокол № 3 від 20.12. 2006 р.

**При культивуванні пастерел успішно використали очищену сироватку крові великої рогатої худоби замість дефіцитної сироватки крові коня. Цей компонент звільнений від імуноглобулінів, токсинів, інгібіторів, мікоплазм, та стимулює ріст пастерел ( ТУ 24.4-32489181–713–2004).**

**Подано заявку на патент “Спосіб визначення антилізоцимної активності бактерій *P. multocida* з використанням лісобакту (лізоциму хлориду)” від 18.07.2008 р., № u 2008 09429.**

Ключові слова: **пастерельоз, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз, бактеріологічні дослідження, етіологічна структура, профілактика, серовари, штам.**

Яненко У. Н. Клинико-экспериментальное обоснование диагнос-тики пастереллеза крупного рогатого скота и свиней. **– Рукопись.**

**Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. – Национальный университет биоресурсов и природо-
пользования Украины, Киев, 2009.**

**В диссертации изложены результаты исследований по применению и научно-экспериментальному обоснованию метода полимеразной цепной реакции для диагностики пастереллеза сельскохозяйственных животных и доказана его ценность. Проанализированы преимущества того или иного способа диагностики пастереллеза (бактериологические исследования, РА, ИФА, ПЦР) животных, в том числе среди носителей возбудителя пастереллеза и его индикации в продуктах животного происхождения и окружающей среды. При типовом разнообразии пастереллеза возникает вопрос создания более совершенного метода специфической профилактики.**

**Проведена работа по изучению этиологической структуры пастереллеза, регистрируемого в Украине.**

**При исследовании хозяйств, где регистрируются заболевания дыха-тельной системы (риниты, пневмонии, бронхопневмонии) у КРС и свиней, было выделено *P. multocida* сероваров А и D. Выделяли возбудителя пастереллезной инфекции из слизи носовой полости животных и проб крови. При этом применяли разные методы индикации возбудителя: ПЦР, бактериологические, серологические (РА и ИФА), что дало возможность определить их преимущества и недостатки. При диагностике с помощью ПЦР получили положительный результат в 19 пробах, т.е. 95,0 %. Бакте-риологическим исследованием обнаружено *P. multocida* в 14 случаях
(70,0 %), ИФА – в 13 случаях (65,0 %), РА – в 10 случаях (50,0 %).**

**При исследовании проб клинического материала от свиней, больных респираторными заболеваниями разной тяжести, также сопоставили эффек-тивность методов диагностики *P. multocida* и оказалось, что при применении ПЦР пастерелла выделялась в 100,0 %, при бактериологическом исследо-вании – в 80,0 % случаев.**

**При исследовании факта пастереллоносительства среди свиней благопо-лучного хозяйства отмечено, что бактериологическими исследованиями обнаружено 87,0 % , ПЦР –100,0 % животных-носителей пастереллеза.**

**Как изучение фактора передачи пастереллезной инфекции, в данной работе продемонстрированы исследования продуктов животного происхож-дения (обрат, продукты отходов бойни), почвы и сточных вод. Наибольший процент *P. multocida* при исследовании данного материала отнесено к серовару В: обрат – 61,4 % (патогенных – 100,0 %); почва – 15,0 % (патогенных – 100,0 %); сточные воды – 60,0 % (патогенных – 83,3 %) и отходы с бойни – 70,0 % (патогенных – 100,0 %). Патогенность *P.multocida* серовара В изучали под-кожным введением суточной агаровой культуры этого штамма белым мышам. Доза 0,3 мл вызывала их гибель через 48–72 часа. LD50 для белых мышей составляет 2,2 × 107 – 4,5× 107 микробных клеток. В дальнейшей экспериментальной работе из этих объектов выделялась *P.multocida* серовара А, и совсем не выделялся серовар D, что может объяснять его слабая патогенность.**

**При сопоставлении разных методов диагностики (бактериологическая диагностика, полимеразная цепная реакция) при индикации пастерелл из разных объектов исследования (обрат, почва, навоз, продукты бойни, сточные воды), получили такие результаты: при помощи ПЦР выделено
87,0 %, бактериологической диагностикой – 60,0 %, возбудителя пастерел-лезной инфекции.**

 Одним из проявлений пастереллезной инфекции являеться инфек-ционный атрофический ринит свиней. Штаммы *P.multocida* сероваров А и D играют основную этиологическою роль в возникновении этого заболевания в ассоциации с *Bordetella bronchiseptica*. Именно эти штаммы пастерел продуцируют дерматотоксины. Эпизоотологические исследования дока-зывают, что атрофия носовых раковин ведет к пневмонии поросят. При исследовании в ПЦР 31 пробы слизи носовых истечений свиней выделено 83,87 % серовара А и 90,32 % – серовара D.

Анализ полученных данных в ходе экспериментальной роботы о существовании бактериальных паразитоценозов указал на необходимость применения комплексной вакцины с участием штаммов *P. multocida*, серо-варов А, В и D, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *E. coli* 0157 H 7; *E. coli* 09 K 99 и *E. coli* 0157 K 88. Поэтому для профилактики пастереллеза свиней, а также инфекционного атрофического ринита была применена вакцина против пастереллеза, сальмонеллеза и колибактериоза свиней «Пасако», в состав которой входят вышеперечисленные штаммы возбудителей. Эффек-тивность ее применения анализировали в сопоставлении с применением другой вакцины – концентрированной формол-вакцины против сальмо-неллеза, пастереллеза и диплококковой инфекции поросят (ППД). В неблагополучных хозяйствах применение вакцины «Пасако» имело 96,2 % эффективности по сравнению с коммерческой вакциной ППД.

**Ключевые слова**: пастереллез, диагностика, полимеразно-цепная реакция, бактериологические исследования, иммуноферментный анализ, этиологическая структура, профилактика, серовар, штамм.

Yanenko U.M. The optimization of diagnostics of cattle and swine pasteurellosis on base of the clinical and experimental substantiation. – Manuscript

Dissertation for obtaining science degree of philosophy doctor in veterinary medicine on specialty 16.00.03 – veterinary microbiology and virology. – *National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,* Kyiv, 2009.

 Dissertation dedicated for investigation of using and experimental basing of the method polymerase chain reaction for pasteurellosis diagnostics in agricultural animals and determination of value of the method. It was investigated the etiological structure of respiratory diseases of cattle and pigs and determinated the leading role of pasteurella as a secondary etiological factor of infectious rhinotraheitis of cattle and infectious atrophic rhinitis of pigs. It was shown the importance of Pasteurella multocida strains A and D in this diseases.

It was developed “The Instruction for laboratory diagnostics of pasteurellosis animals and birds”, it was asserted with science-methodical council of department veterinary medicine MinAPK of Ukraine, protocol 3 from 20.12.2006.

In the laboratory of veterinary expertise was adopted the patent for using immunoglobulin- free purified bovine serum, what was also free from inhibitors, toxins, mycoplasma and have high stimulated properties for pasteurella.

 It was stated the patent “The mode of determination of antilysozyme activity of P. multocida with using purified bovine serum” from 12.11.2007, № u 2007 12479, ent № 357907.

**Key words :** pasteurellosis, diagnostics, polymerase chain reaction, immu-noferment analysis, bacteriological tests, etiological structure, prophylaxis, sero-type, strain.

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