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

**НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

# ГАРКАВЕНКО ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА

 УДК 619:616.98:579.869.1

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЗБУДНИКА,**

**УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ДІАГНОСТИКИ ТА СПЕЦИФІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ЛІСТЕРІОЗУ ТВАРИН**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

## Автореферат

## дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини УААН

|  |  |
| --- | --- |
| Науковий керівник – | доктор ветеринарних наук, професор, членкор УААН, заслужений діяч науки і техніки України**Риженко Василь Петрович**, Інститут ветеринарної медицини, завідувач лабораторії анаеробних інфекцій |
| **Офіційні опоненти:** | доктор ветеринарних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України**Литвин Володимир Петрович,** Національний аграрний університет, професор кафедри епізоотології та інфекційних хвороб  |
|  | доктор ветеринарних наук**Скрипник Валерій Григорович,** Технологічний інститут молока та м′яса, заступник директора з науково-інноваційної роботи |

Захист дисертації відбудеться “15“ жовтня 2008 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному аграрному університеті за адресою: 03041, Київ-41, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус 3, ауд. 65

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного аграрного університету за адресою: 03041, Київ-41 вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімн. 28

 Автореферат розісланий “9“ вересня 2008 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради С.В. Міськевич

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Лістеріоз є зооантропонозною інфекцією з природною стійкою вогнищевістю, що перебігає з ураженням практично всіх систем організму, має суттєвий вплив на нервову, імунну та ендокринну системи. Захворювання спричиняє серйозні соціальні та економічні збитки через загибель тварин, аборти, зниження продуктивності, вибраковування продукції, вилучення з продажу продуктів, контамінованих Listeria monocytogenes, обмеження їх ввезення та вивезення, призупинення виробництва, що оцінюється у сотні мільйонів доларів (Волянский Ю. Л., 1998.; Касянчук В. та ін., 2005).

Майже всі види домашніх тварин чутливі до збудника лістеріозної інфекції, а найбільш сприйнятливими є вівці, свині, велика рогата худоба, птиця.

Розвиткові даного захворювання сприяє порушення санітарно-гігієнічних правил утримання, транспортування та експлуатації тварин, що призводить до змін фізіологічних потреб та адаптаційних можливостей їх організму (Loncarevic S. et al.,1998; Ryser E. T, 1999).

Останнім часом проблема лістеріозу вийшла за межі ветеринарної медицини. Аналіз епідемічної ситуації свідчить про збільшення випадків інфікування людей цим видом бактерій (Тартаковский И. С., Палей О. С., 1994; Подунова Л. Г. та ін., 2000; Котляров B. M., Бакулов И. А., 2001).

Особливості епізоотичного процесу при лістеріозі зумовлюють накопичення лістерій в грунті, що призводить до утворення стаціонарного епізоотичного вогнища. У стаціонарно неблагополучних пунктах захворювання виявляється цілорічно (Бакулов И. А. та ін., 1994; Fenlon D. R., 1999).

Надзвичайно ускладнює діагностику та профілактику хвороби лістеріоносійство. За такого стану імунологічної рівноваги у взаємодії між мікро- та макроорганізмом клінічні прояви захворювання у тварин можуть бути відсутніми (Lorber В., 1996; Григорьев Ю. И., Честнова Т. В., 2002). Саме з цим явищем пов'язані несподівані спалахи хвороби серед нещепленого поголів'я або неадекватні реакції у тварин після введення специфічних біопрепаратів.

Інформація щодо біологічних властивостей збудника Listeria monocytogenes, яка викликає лістеріоз тварин в Україні, недостатня, в результаті чого можливі хибні діагностичні, епізоотологічні й клінічні дані.

Для специфічної профілактики лістеріозу на даний час у країнах СНД використовують: живу вакцину проти лістеріозу сільськогосподарських тварин (бівалентна, суха, жива, що містить лістеріозні штами УСГІ-19, УСГІ-52) та вакцину проти лістеріозу із штаму АУФ, яку рекомендують використовувати способом групової аерогенної вакцинації поросят-сисунів (Макаев Х. Н. та ін., 1989; Бузолева Л. С., Сидоренко М. Л., 2005).

 Специфічна профілактика лістеріозу тварин в Україні на сьогодні не налагоджена з причин відсутності вітчизняної вакцини. У випадках ензоотичних спалахів лістеріозу вакцину завозять з Росії. Отже, розробка вакцини є одним з першочергових завдань наших досліджень.

За останні роки (2002–2007 рр.) в Україні збільшилась кількість спалахів лістеріозу серед тварин, що завдає значних економічних збитків тваринницьким господарствам. Окрім того, тварини, які перехворіли, відстають у рості і розвитку, не реалізують своїх генетичних та продуктивних можливостей і залишаються лістеріоносіями, становлячи небезпеку не тільки для тварин, але й для людей. Таким чином, лістеріоз є не лише ветеринарною, а й медичною проблемою.

Враховуючи наведене вище, вважаємо, що вивчення біологічних властивостей збудника, удосконалення діагностики та специфічної профілактики лістеріозу тварин, сприятиме встановленню ефективного контролю над цією небезпечною зооантропонозною інфекцією.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є складовою частиною досліджень, передбачених тематичними планами Інституту ветеринарної медицини Української академії аграрних наук (ІВМ УААН), за державним завданням на 2001–2005 рр. 04.05. (номер державної реєстрації – 0101 U 002312) та державним завданням 37.01-011 (37.01/017) на 2006–2010 рр. (номер державної реєстрації – 0106 U 000386).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – вивчити біологічні властивості збудника, удосконалити методи діагностики та засоби специфічної профілактики лістеріозу тварин.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

* вивчити поширення захворювання тварин в Україні;
* провести індикацію та ідентифікацію лістерій, виділених з патологічного матеріалу;
* визначити основні морфологічні, культуральні, біохімічні, біологічні властивості одержаних ізолятів лістерій;
* розробити методичні рекомендації з лабораторної діагностики лістеріозу тварин;
* сконструювати інактивовану вакцину проти лістеріозу тварин;
* вивчити імунологічну перебудову в організмі тварин, щеплених дослідними зразками вакцини проти лістеріозу;
* розробити настанову по застосуванню вакцини.

*Об'єкт дослідження* **–** лістеріоз тварин, особливості збудника, удосконалення методів діагностики та специфічної профілактики.

*Предмет дослідження:* тварини сільськогосподарські (вівці) і лабораторні (білі миші, мурчаки, кролі), патматеріал від хворих і підозрілих у захворюванні тварин, їх кров для бактеріологічних, серологічних та імунологічних досліджень.

*Методи дослідження:* епізоотологічний аналіз (дослідження спалахів хвороби серед різних видів тварин в Україні), біологічний експеримент (визначення вірулентності ізолятів лістерій на лабораторних тваринах), бактеріологічні (дослідження основних культурально-морфологічних, біохімічних властивостей штамів бактерій), імунологічні (дослідження факторів неспецифічного та специфічного гуморального і клітинного імунітету), статистичні (підрахунки середніх статистичних показників числових експериментальних даних, визначення рівня ймовірності отриманих результатів).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Результати комплексних досліджень доповнюють наукові дані: про роль Listeria monocytogenes в інфекційній патології тварин в Україні; епізоотичну ситуацію щодо лістеріозу тварин у країні; основні морфологічні, культуральні, біохімічні, біологічні властивості штамів лістерій, циркулюючих в Україні.

Вперше в Україні задепоновані в Національному центрі мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) як національні референс-культури, штами Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii, Listeria innocua, що ввійшли до складу „Набору еталонних культур для ідентифікації лістерій”, НТД на який затверджена в чинному порядку у 2007 році. Реєстраційний номер ТУ У 24.4 – 00699715-001:2007. Удосконалено методи діагностики та запропоновано методичні рекомендації „Лабораторна діагностика лістеріозу тварин”, що затверджені Науково-методичною радою Державного Департаменту ветеринарної медицини Мінагрополітики України 20.12.2006р. (протокол № 3); виготовлено інактивовану вакцину проти лістеріозу тварин „Лістерисан” (Патент України на корисну модель № 21798, А61К 39/08. Вакцина „Лістерисан” концентрована інактивована проти лістеріозу тварин).

**Практичне значення одержаних результатів.** Виробництву запропоновані методичні рекомендації „Лабораторна діагностика лістеріозу тварин”, що впроваджені у практику ветеринарної медицини України.

Важливим внеском у діагностичну роботу стало створення банку референс-культур Listeria monocytogenes, на основі яких створено “Набір еталонних культур для ідентифікації лістерій”, що застосовується згідно з “Настановою по застосуванню еталонних культур для ідентифікації лістерій” у ДНДІЛДВСЕ, ДНКІБШМ, ІВМ УААН, обласних та районних державних лабораторіях ветеринарної медицини України для перевірки ростових властивостей живильних середовищ, які використовуються для культивування лістерій та для постановки КАМП-тесту з метою видової ідентифікації лістерій.

 Для поліпшення епізоотичної ситуації в Україні з лістеріозу свиней та дрібної рогатої худоби сконструйовано вакцину “Лістерисан” концентровану інактивовану проти лістеріозу тварин. Вакцина успішно застосовується в господарствах згідно з „Тимчасовою настановою по застосуванню концентрованої інактивованої вакцини проти лістеріозу тварин”, затвердженою Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України 24.05.2005 року. Створення вітчизняної вакцини проти лістеріозу тварин ліквідувало залежність держави від імпорту її з Росії та інших країн.

Одержані результати можуть бути використані у навчальному процесі вищих навчальних закладів ветеринарної медицини.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувач самостійно обґрунтував науковий напрям, визначив програму досліджень, провів аналіз літературних даних за темою роботи, провів науково-виробничі досліди, лабораторні експерименти, статистичну обробку матеріалів, аналіз отриманих результатів, їх інтерпретацію та сформульовав висновки.

Дослідження з вивчення біологічних властивостей польових ізолятів Listeria monocytogenes, селекція вакцинних штамів та виготовлення концентрованої інактивованої вакцини “Лістерисан” виконані під керівництвом професора В. П. Риженка спільно з науковими співробітниками лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ УААН С. А. Дементьєвою і В. О. Андріящук.

Імунологічні дослідження проводились на кафедрі лабораторної діагностики інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини (м. Біла Церква) під керівництвом доктора ветеринарних наук, професора В. М. Івченка.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень з теми дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на щорічних засіданнях вченої ради Інституту ветеринарної медицини УААН (2003–2007 рр.), на Всеукраїнському семінарі лікарів ветеринарної медицини–бактеріологів “Експрес-методи мікробіологічного аналізу харчової продукції на сальмонельоз, лістеріоз” (м. Херсон, 2005 р.), Всеукраїнському семінарі лікарів ветеринарної медицини–бактеріологів “Підготовка лабораторій ветеринарної медицини (мікробіологічних підрозділів) до акредитації по системі якості згідно з вимогами ISO 17025” (м. Біла Церква, 2006 р.), Міжнародній науково-практичній конференції з проблем свинарства (Інститут ветеринарної медицини УААН, м. Київ, 2006 р.); науково-практичній конференції Всеукраїнського товариства патологів з міжнародною участю “Сучасні проблеми здоров΄я і патології тварин”, Львівська національна академія ветеринарної медицини імені С. З. Ґжицького (м. Львів, 2006 р.), засіданні науково-методичної ради Державного Департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України (20.12.2006 р.), науково-практичній конференції „Перспективи розвитку ветеринарної медицини України” (Луганський національний аграрний університет, м. Луганськ, 2007 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових робіт, з них 6 у фахових виданнях, 1 патент на корисну модель, Технічні умови України на набір тест-культур, методичні рекомендації „Лабораторна діагностика лістеріозу тварин”, „Тимчасова настанова по застосуванню концентрованої інактивованої вакцини проти лістеріозу тварин”.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертація викладена на 160 сторінках комп′ютерного тексту і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, додатків та списку літератури (234 джерела, у тому числі – 108 зарубіжних авторів). Робота ілюстрована 28 таблицями і 24 рисунками.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ**

Дослідження проводили в період з 2003 по 2008 рр. у лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ УААН, тваринницькому господарстві ДГ „Асканія Нова” Херсонської області, бактеріологічному відділі ДНДІЛДВСЕ, лабораторії кафедри лабораторної діагностики інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин БДАУ.

 У дослідах було використано 660 білих мишей, 20 кролів, 40 мурчаків, 2 барани-донори еритроцитів та 6057 голів овець.

 У роботі використовували 40 культур лістерій, з них Listeria monocytogenes становило – 15 польових ізолятів, L. ivanovii – 2, L. innocua – 10, L. seeligeri – 2, L. welshimeri – 2, L. grayi – 8 відповідно. Культури виділені з з патологічного матеріалу від хворих тварин та трупів хутрових звірів, дрібної рогатої худоби, свиней, великої рогатої худоби, а також із харчових продуктів та сировини тваринного походження (м′ясо птиці, шкіра та гузок гусячий) з тваринницьких господарств Херсонської, Кіровоградської, Чернівецької, Луганської, Вінницької, Черкаської та Івано-Франківської областей України, а також референс-штами Listeria monocytogenes № 1, одержані з колекції музею ДНКІБШМ. Для виготовлення концентрованої інактивованої вакцини проти лістеріозу тварин “Лістерисан”, “Набору еталонних тест-культур для ідентифікації лістерій” ТУ У 24.4 – 00699715-001:2007, а також для контролю активності вакцини “Лістерисан” використовували штами лістерій: Listeria monocytogenes № М-04 (виробничий, типовий, містить О-антигени типів І, ІІ); Listeria monocytogenes № АТСС 19112; Listeria ivanovii № 402; Listeria innocua № АТСС 33090. Крім того, для роботи використано штами E.coli, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, одержані з колекції музею ДНКІБШМ та Micrococcus lysodekticus (“Биохимреактив”, Олайне).

Дослідження штамів проводили за морфологічними, культуральними, біохімічними, біологічними властивостями згідно з ДСТУ ISO 11290-1:2003, ДСТУ ISO 11290-2:2003, “Лабораторной диагностики листериоза животных и людей, меры борьбы и профилактики”, методичними вказівками „Организація контролю і методи виявлення бактерій Listeria monocytogenes у харчових продуктах та продовольчій сировині” і Міжнародним класифікатором бактерій Берджі.

Чутливість виділених культур до антибактеріальних препаратів визначали методом дифузії в агар згідно з прийнятими методиками із застосуванням паперових дисків, що містять антибіотики (Лабинская А. С., 1972, Антонов Б. Н. та ін., 1986).

Кількість лейкоцитів підраховували в камері Горяєва (Коротченко Н. В., Смиян Ю. П., 1987).

Лейкограму визначали трипольним методом (Краснов И. П., Митюшин В. В., 1988.)

Для вивчення показників Т- і В-лімфоцитів використовували комплекс методів: для Т-лімфоцитів – тест спонтанного розеткоутворення (Е-РУК); для визначення субпопуляцій Т-супресорів, Т-хелперів та Т-кілерів – реакцію теофілінчутливості, а В-лімфоцитів – комплементарне розеткоутворення (ЕАС-РУК) за методикою Д. К. Новикова та ін. (1976) та В. М. Івченка та ін. (2003).

Показники ОФР вивчали за методикою И. М. Карпутя із співавторами (1993), Ю. Н. Федорова та ін. (1983; 1999.), завершеність фагоцитозу – за З. Е. Матусісом (1955; 2003).

Лізоцимну активність сироватки крові (ЛАСК) визначали фотонефело-метричним методом за А. С. Козлюком (1987) на ФЕК при λ = 540 з використанням мікробної маси Micrococcus lysodekticus (“Биохимреактив”, Олайне).

Для визначення бактерицидної активності сироватки крові (БАСК) користувались методикою В. Ю. Чумаченка (1992) із застосуванням добової культури Listeria monocytogenes і подальшою нефелометрією на ФЕК (λ = 540).

Титри специфічних антитіл визначали за реакцією аглютинації, яку проводили класичним (або об′ємним) методом до антигену Listeria monocytogenes (виробництва ІЕКВМ (м. Харків)) (Івченко В. М., Павленко М. С., 2003).

Напруженість імунітету (рівень титру специфічних антитіл) після щеплення тварин вакциною проти лістеріозу визначали за методикою Г. А. Красникова (1989).

Одержані результати досліджень обробляли методом варіаційної статистики на програмованому калькуляторі “Електроніка МК-61” та за допомогою персонального комп′ютера. При цьому визначали середнє арифметичне (М), статистичну помилку середнього арифметичного (m), вірогідність різниці між середніми арифметичними двох варіаційних рядів за критерієм вірогідності (р), користувалися таблицею Стьюдента. Середній титр антитіл у серологічних реакціях визначали шляхом обрахунків середнього значення десяткового логарифма. Різницю вважали вірогідною, коли значення р дорівнювало або було меншим 0,05; 0,01; 0,001 (Никитин Н. М., Шайхаманов М. Х., 1996).

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ АНАЛІЗ

## Вивчення епізоотичної ситуації з лістеріозу в Україні

За даними ветеринарної статистичної звітності в Україні за 2001–2007 рр. державними лабораторіями ветеринарної медицини проведено 21498 бактеріологічних досліджень патологічного матеріалу та біоматеріалу від тварин різних видів на лістеріоз. Діагноз підтверджено лише у 34 випадках (0,16 %): у 2001 році спостерігалось 5 випадків спалаху лістеріозу серед тварин (по 1 – у свиней та у ВРХ і 3 – серед ДРХ), у 2002 р.– 4 (1 – у свиней , 2– у ВРХ та 1 – при дослідженні інших видів патматеріалу), у 2003 р. – 14 (11 – у ДРХ, 2 – у свиней та 1 – у ВРХ), у 2004 р. – 1 (при дослідженні патматеріалу від хутрових звірів), у 2005 р. – 2 (у ДРХ), у 2006 р. – 6 (1 – у ВРХ та 5 – у свиней), у 2007 р. – 2 (1 – у ВРХ та 1 – при дослідженні патматеріалу від інших видів тварин).

У цей же період під час досліджень сироватки крові від різних видів тварин на лістеріоз виявлено специфічні антитіла лише у 34 випадках (0,01 %): у 2001 – 22 (19 – у ДРХ, 3 – у свиней), у 2004 р. – 5 у ДРХ, у 2006 р. – 1 у свиней, у 2007 р. – 6 у ДРХ.

Аналізуючи результати досліджень з виявлення лістерій у різних об′єктах довкілля, бачимо, що з води централізованого водопостачання лістерії виділялися лише у 2 випадках з 394 (0,5 %), що пояснюється їх високою чутливістю до хлорвмістимих засобів, які використовуються для знезараження на системах водопостачання. Одним із факторів передачі інфекційного агента при лістеріозі є міські каналізації (29,9 %), стічні води тваринницьких комплексів (30,9 %), стічні води м′ясокомбінатів та інших харчопереробних об′єктів (30,6 %).

У ґрунті різних географічних зон України (переважно проби відкритого ґрунту для вирощування овочів) лістерії виявлені у 18,7 % .

У зв′язку з погіршенням епідемічної ситуації щодо лістеріозу в багатьох країнах світу та в Україні гостро постало питання безпеки продуктів харчування та кормів щодо контамінації їх лістеріями.

За останні чотири роки здійснено 89777 мікробіологічних досліджень харчових продуктів, сировини тваринного походження та кормів на наявність Listeria monocytogenes , але виявлено її лише у 6 зразках (0,01 %): у 2005 р. – виділено з 1 зразка м′яса, у 2006 р. – з 2 зразків (м′яса та субпродуктів птиці), у 2007 р. – з 3 зразків (шкіра та гузок гусячий, м′ясо).

Низький рівень виявлення хворих на лістеріоз тварин та продукції, контамінованої цим збудником, не відображає реальної ситуації щодо цього захворювання в Україні. У більшості випадків це пов′язано з низькою якістю діагностикумів та відсутністю ефективної системи нагляду за поширенням захворювання.

Складною проблемою є виявлення збудника із різних видів матеріалу у зв′язку із значною контамінацією їх супутньою мікрофлорою. На загальному мікробному фоні досліджуваного субстрату кількість лістерій, як правило, незначна, тому їх індикація утруднена.

**Бактеріологічні дослідження**

**Визначення залежності індикації лістерій від способів підготовки патматеріалу та біоматеріалу і його висіву.** Для даного досліду використовували проби патматеріалу, відібраного від 12 кролів, експериментально заражених лістеріями. Тварини гинули на 4–5 добу після зараження. На розтині трупів відмічали множинні некротичні вогнища в головному мозку, печінці, селезінці та нирках. Для визначення оптимальних умов індикації збудника посіви проводили різними способами: методом відбитків; пастерівською піпеткою; посів гомогенату, розтертого на стерильному фізіологічному розчині з піском та без нього; посів відбитком та гомогенатів проб, які витримували в термостаті за температури +37°С протягом 6 годин; посів відбитком та гомогенатів проб після 10-денного їх витримування в холодильнику за температури +4°С.

Найбільша кількість випадків виявлення лістерій одержана при підготовці 84 проб шляхом їх гомогенізації в ступці з піском (100 % проб) та без піску (57,1 %). В цих випадках лістерії виділені через 48 год, крім проби нирок (гомогенізація без піску), де лістерії виділені через 10 діб.

Попереднє витримування в термостаті чи в холодильнику не призводило до збільшення кількості випадків виявлення лістерій.

Найнижчі показники виявлення лістерій одержані при посіві відбитками тканин або пастерівською піпеткою.

**Культивування лістерій.** Для проведення порівняльної оцінки ефективності росту культур Listeria monocytogenes на різних живильних середовищах нами було виготовлено такі варіанти: м’ясо-пептонний бульйон (МПБ), МПБ з додаванням 6,5 % натрію хлористого, МПБ з додаванням 1,0 % глюкози, МПБ з додаванням 1,0 % глюкози та 2,0 % гліцерину, МПБ з додаванням 15,0 % жовткової емульсії та 0,5 % активованого вугілля, триптиказо-соєвий бульйон з дріжджовим екстрактом та бульйон Фрейзера з селективними компонентами (налідиксова кислота, літію хлорид, акрифлавін, ескулін, цитрат амонію заліза).

У результаті проведених досліджень встановлено, що накопичення бактеріальної маси L. monocytogenes відбулося в усіх запропонованих варіантах живильних середовищ і становило в середньому 3,5106 м. к. в 1 см3 середовища через 24 год культивування, 4,9106 м. к. в 1 см3 – через 48 та 72 год культивування та 4,6106 м. к.в 1 см3 – через 6 діб культивування.

Максимальне вірогідне накопичення лістерій зареєстровано в бульйоні Фрейзера (в середньому 5,1108 м. к. в 1 см3 середовища, р<0,001 по відношенню до традиційних живильних середовищ), триптиказо-соєвому бульйоні з дріжджовим екстрактом (4,0107 м. к. в 1 см3 середовища, р<0,001 – 0,05 по відношенню до традиційних живильних середовищ) та в МПБ з додаванням 15,0% жовткової емульсії й 0,5 % активованого вугілля (8,7106 м. к. в 1 см3 середовища, р<0,001 по відношенню до традиційних живильних середовищ). У контрольних традиційних живильних середовищах, які використовуються для культивування лістерій, ці показники були нижчими.

Для отримання чистих культур лістерій використовували тверді елективні середовища (середовище з калієм телуритом, ПАЛКАМ – та Оксфордський агари), що містять спеціальних селективні добавки, такі як літію хлорид, акрифлавін, ескулін, налідиксова кислота, цефтазидим, поліміксин В.

**Вплив низьких температур на накопичення лістерій.** Нами проведені досліди, суть яких полягала в тому, що культуру L. monocytogenes засівали на середовище Фрейзера, культивували в термостаті за температури +37°С протягом 48 год і визначали кількість мікробних клітин в 1см3 середовища. Потім бульйонну культуру лістерій ставили в холодильник за температури +4°С та через кожні 10 діб визначали в ній кількість мікробних клітин у 1см3.

Витримування культури в холодильнику сприяло накопиченню лістерій. Вже через 10 діб кількість мікроорганізмів збільшилась у 2,3 раза, через місяць – у 3,8 раза, а через 2 місяці у 9,4 раза порівняно з вихідними даними.

**Ідентифікація лістерій.** З метою підтвердження належності культур до роду Listeria проводили морфологічні дослідження, тести на каталазу та рухливість. Для диференціації лістерій від коринебактерій користувались методом Д. А. Васільєва (1994) з використанням 10-водного розчину ТТХ, а від збудника бешихи свиней – культивуванням на індикаторних середовищах з барвниками та в РА з позитивною лістеріозною сироваткою.

Лістерії являли собою поліморфні грампозитивні палички, розміщені під кутом у вигляді римської п′ятірки або так званого „штакетника”. Добові культури бактерії, вирощеної при кімнатній температурі, були рухомими, знебарвлювали індикаторні середовища та давали позитивну реакцію з полівалентними лістеріозними сироватками.

Одним із важливих факторів вірулентності L. monocytogenes є лецитиназа. Цей фермент необхідний збуднику для виживання та розмноження лістерій в організмі інфікованих тварин. Але у разі культивування на середовищах, які містять лецитин, лецитиназна активність не проявлялася чи виявлялася дуже слабо внаслідок накопичення в середовищі екстраклітинного продукту, який синтезується збудником у процесі росту культури. Цей продукт, що виконує функції аутоcупресора, може бути нейтралізований гідрофобним сорбентом, наприклад активованим вугіллям. При цьому активізуються гени патогенності і відповідно зростає дія фактора патогенності в середовищі, в тому числі і лецитинази. Отже, цей феномен було використано для розробки методу диференціації L. monocytogenes як від непатогенних лістерій, так і від бактерій інших родів, які морфологічно нагадують лістерії. В результаті проведених досліджень виявлено, що Escherichia coli та Enterococcus faecalis не проявляли лецитиназної активності, тоді як Staphylococcus aureus та Staphylococcus epidermidis, навпаки, проявляли її як на середовищі без активованого вугілля, так і в його присутності.

Згідно з результатами досліджень оптимальною для спостереження за змінами продукування лецитинази лістеріями на жовтковому агарі є концентрація активованого вугілля 0,5 %.

У літературі є повідомлення, що можна диференціювати патогенні види лістерій від непатогенних за лецитиназною активностю (Ripio M. T. et al., 1996). Для уточнення цього питання нами було проведено дослідження з різними видами лістерій на наявність у них лецитиназної активності на поживному агарі з курячим жовтком за відсутності та в присутності активованого вугілля (0,5 %). Доведено, що індукція лецитиназної активності на жовтковому середовищі із сорбентом (активованим вугіллям) притаманна лише для L. monocytogenes.

Наступним етапом було визначення ферментативних властивостей лістерій: чисті бульйонні культури лістерій пересівали на середовища з вуглеводами, які витримували при +37°С протягом 10 діб. Лістерії розщеплювали з утворенням кислоти (без газу) глюкозу, мальтозу, трегалозу, саліцин та не розщеплювали дульцит, інулін, рафінозу, маніт. Проведені біохімічні дослідження на полосках набору системи „API – лістерія”, результати яких можна було отримати вже через 24 год. За цими тестами можна зробити висновок, що спільним для усіх видів лістерій було розщеплення ескуліну та D-арабітолу, а глюкозу-1-фосфат та D-тагатозу вони не зброджували. L. monocytogenes відрізнялася від інших лістерій за негативними результатами DIM–тесту.

Вивчаючи гемолітичні властивості лістерій, виявили, що L. seeligeri давала незначний гемоліз, L. monocytogenes – вузьку чітку зону ß-гемолізу, а L. іvanovii – широку, інші ж види лістерій не володіли гемолітичною активністю.

З результатів КАМП-тесту видно, що L. monocytogenes давала незначну зону розширеного гемолізу біля штриха Staph. aureus, а L. іvanovii – широку зону розширеного гемолізу біля штриха R. еqui, інші види лістерій не володіли гемолітичними властивостями.

**Біологічна проба при лістеріозі.** Патогенність 40 культур лістерій різних видів (L. monocytogenes – 16 ізолятів, L. ivanovii – 2, L. innocua – 10, L. seeligeri – 2, L. welshimeri – 2, L. grayi – 8 відповідно) вивчали на білих мишах, по 10 голів тварин заражали внутрішньочеревно змивом кожної однодобової агарової культури в дозі 0,5 см3.

У разі позитивної біопроби тварини гинули на 4–5 добу після зараження. На розтині трупів піддослідних мишей відмічали множинні некротичні вогнища в

печінці, селезінці та нирках.

З шести видів досліджуваних лістерій лише 16 культур L. monocytogenes та 2 культури L. ivanovii виявились патогенними для лабораторних тварин.

Надалі специфічні властивості 16 культур L. monocytogenes та 2 культур L. ivanovii перевіряли кон’юнктивальною пробою на мурчаках або дермонекротичною пробою на мурчаках та кролях на двох групах дослідних тварин по 10 голів у кожній. Тварин першої групи щеплювали експериментальним зразком вакцини проти лістеріозу „Лістерисан”, яку вводили підшкірно у дозі 1 см3 –для мурчаків та5 см3 – для кролів.

Специфічні властивості цих видів лістерій спричиняли запальні процеси на кон′юнктиві та шкірі піддослідних тварин. У щеплених вакциною проти лістеріозу тварин такі зміни не відбувались.

**Визначення чутливості лістерій до антибіотиків.** КультуриL. monocytogenes були резистентними до багатьох антибіотиків, на що вказує вузька зона затримки росту навколо 11 (39 %) дисків антибіотиків з використаних у тесті двадцяти п′яти, до 10 (38 %) антибіотиків лістерії виявили високий рівень чутливості, у 5 (19 %) випадках їх чутливість була середньою. Всі ж 16 досліджених культур L. monocytogenes були високочутливими та чутливими до карбенциліну, цефазоліну, левофлоксацину, гентаміцину, амоксіциліну.

##### *Засоби специфічної профілактики лістеріозу тварин*

Слід відмітити, що вітчизняна біологічна промисловість не випускає протилістеріозної вакцини.

**Визначення промислово-технологічного регламенту з виготовлення лістеріозного антигену.** Створення бактерійної вакцини ми починали з підготовки живильних середовищ для культивування штамів, щоб вони сприяли збереженню характерної морфології мікроорганізму, містили в необхідній кількості набір амінокислот, який потрібен цьому мікроорганізму при його рості, мали оптимальну для його росту величину рН.

Для культивування виробничого штаму L. monocytogenes № М-04 нами було виготовлено та вивчено п’ять варіантів живильних середовищ. З метою пошуку оптимальних режимів культивування лістерій їх інкубацію здійснювали у двох температурних режимах на кожному із запропонованих середовищ (при +28°С2°С та при +36°С1°С). Через кожні дві–три години вирощування культуру перемішували протягом 2–3 хв.

Протягом періоду вирощування через кожні 24 год відбирали проби культури для мікроскопії, визначення величини pН та кількості мікробних клітин.

При порівнянні кінетичних характеристик було з′ясовано, що показники росту лістерій на різних середовищах відрізняються за інтенсивністю накопичення бактерійної маси, тривалістю лаг- та експоненціальної фази росту, кінцевої концентрації культур при вирощуванні у визначених умовах.

Вірогідний інтенсивний ріст лістерій (р<0,001 відносно вихідних та попередніх даних) спостерігали, як правило, на третю добу на середовищах, збагачених жовтковою емульсією та глюкозою при +36˚С1˚С або з 13 % гліцерину при +28˚С2˚С в порівнянні із традиційними середовищами.

**Порівняльна характеристика умов інактивації та депонування лістеріозного антигену.** Основною метою інактивування антигенів є збереження протективних антигенів у більш природньому стані. Тому прикладні дослідження з конструювання інактивованих вакцин спрямовані перш за все на постійний пошук “ідеального” способу інактивації. Вони передбачають підбір засобів та методів інактивації, які руйнували б нуклеїнові кислоти збудника, структури, відповідальні за розмноження, але залишали б інтактними антигенні структури білково-поліцукрових молекул, відповідальних за імуногенність.

Нами перевірено кілька схем інактивації лістерій спиртовим розчином діамантового зеленого (табл. 1) та розчином формальдегіду (табл. 2).

*Таблиця 1*

**Режими інактивації лістерій спиртовим розчином діамантового зеленого**

 n= 5, Р<0,01

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Робоча концентрація спиртового розчину діамантового зеленого, % | Режим інактивації бульйонної культури лістерій при +37оС |
| час інактивації бактерійної маси,год | нешкідливість для білих мишей,а/в |
| 1 | 0,4 | 72 | 10/10 |
| 2 | 0,6 | 72 | 10/10 |
| 3 | 0,8 | 96 | 10/8 |
| 4 | 1,0 | 96 | 10/0 |
| 5 | 1,2 | 72 | 10/0 |
| 6 | 1,4 | 72 | 10/0 |

Примітка. а/в – відношення заражених лабораторних тварин до загиблих.

Оптимальною робочою концентрацією діамантового зеленого для інактивації культур лістерій є 1 %, а формальдегіду – 0,25–0,3 %. Нижчі значення вмісту інактиванту в культурі повністю її не знешкоджують.

Значне підсилення імунізуючої дії інактивованих вакцин досягається додаванням до їх антигенного матеріалу ад'ювантів, які здатні утримувати (або, навіть, накопичувати) антиген у тому місці, де він експонується лімфоцитами (ефект „депо”), і здатні викликати синтез цитокінів, регулюючих лімфоцитарні функції.

Як ад′ювант нами було використано алюмінію гідрооксид, тому що він має максимальну вибіркову здатність сорбувати антиген, стабільно й тривало утримувати антиген у сорбованому стані, зберігати стандартність і не впливати шкідливо при його введенні в організм. Стерильну суспензію алюмогідрогелю 4 % у фосфатнобуферному розчині з рН (7,5±0,1) додавали в кількості 10 % до інактивованої культури. Депонування тривало 7 діб. З метою концентрації антигену було проведено декантацію верхнього шару анакультури.

*Таблиця 2*

**Режими інактивації лістерій формаліном**

n= 5, Р<0,01

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Робоча концентрація формальдегіду, % | Режим інактивації бульйонної культури лістерій при + 37оС |
| час інактивації бактерійної маси,год  | нешкідливість для білих мишей, а/в |
| 1 | 0,1 | 48 | 10/10 |
| 2 | 0,2 | 36 | 10/8 |
| 3 | 0,25 | 24 | 10/0 |
| 4 | 0,3 | 24 | 10/0 |
| 5 | 0,4 | 20 | 10/0 |

Примітка. а/в – відношення заражених лабораторних тварин до загиблих

 Ад′ювантами нового покоління також є імуномодулюючі комплекси, які заключенний в них антиген доставляють до антигенпрезентуючих клітин. У вакцину „Лістерисан” було введено імуномодулюючий і стабілізуючий антитоксичний засіб на основі екстрактів лікарських рослин та компонентів природного походження, що дало змогу щеплювати хворих на лістеріоз тварин.

**Конструювання вакцини проти лістеріозу.** У результаті експериментів визначено, що найбільш прийнятне для технології поєднання антигенних та інших компонентів має відповідати концентраціям (співвідношення, %): джгутикові та корпускулярні антигени відселекціонованого інактивованого епізоотичного штаму L. monocytogenes – 80–85, формальдегід залишковий – 0,025–0,03, діамантовий зелений – 0,02–0,04, ад′ювант (алюмінію гідроксид) – 10–12, імуномодулюючий і стабілізуючий антитоксичний засіб на основі екстрактів лікарських рослин та компонентів природного походження – решта.

**Контроль якості вакцини „Лістерисан” проти лістеріозу тварин.** Вакцина являла собою прозору рідину зеленого кольору з осадом, що становив близько 25 % загального вмісту флакона, який легко розбивався при збовтуванні, утворюючи відносно стійку рівномірну суспензію без сторонніх домішок, плісняви. Тріщин флаконів, порушення щільності закупорки не виявлено, етикетки наявні. Вакцина була стерильною, залишкова кількость інактиванту – формальдегіду становила 0,025 %, значення рН було в межах 7,2±0,2, нешкідливою для лабораторних тварин, а її протективна активність становила 82 %.

**Визначення імунобіологічного статусу організму тварин після щеплення вакциною „Лістерисан”**

Імунологічну ефективність вакцини „Лістерисан” серії № 1 випробовували на 6 вівцях, яких утримували у ізоляторі віварію. Напередодні щеплення у тварин визначили відповідність основних клінічних параметрів фізіологічним нормам. Проведені щеплення досліджених тварин ускладнень не викликали.

Зразки крові відбирали від тварин вранці перед годівлею до щеплення, через 1, 2 тижні після щеплення та через 10 діб, один та шість місяців після ревакцинації.

Оцінку реакцій організму на введення антигену та розрахунок напруги імунітету у піддослідних тварин проводили непрямим методом за допомогою серологічних досліджень. У дослідній групі були визначені титри сироваток крові у реакції аглютинації класичним (об′ємним) методом до антигену L. monocytogenes.

Аглютинуюча активність сироватки крові дослідних баранів (lg, Mm) до щеплення становила 1,30±0,06, через тиждень після щеплення – 2,4±0,06, а через 2 тижні – знизилась до 2,15±0,10. Середньогеометричний титр антитіл після ревакцинації через 10 діб підвищився до 2,75±0,07, місяць потому тримався на рівні 2,70 ± 0,06, а через півроку цей показник становив 2,55±0,05 (р<0,001 відносно попередніх даних).

Контроль активності вакцини перевіряли на лабораторних тваринах, визначивши залежність між активністю препарату для баранів та білих мишей, а саме – між титрами захисних антитіл у баранів та відсотком протективного захисту білих мишей. Результати досліджень свідчать, що титр протилістеріозних антитіл щеплених тварин після вакцинації забезпечив протективний захист в середньому у 45 % білих мишей, а після ревакцинації – 90 %, після чого цей показник утримувався на рівні 80 %, що свідчить про достатній рівень захисту. Через півроку він знизився до 40 %.

Отже, визначено прийнятну схему застосування вакцини проти лістеріозу “Лістерисан”, яка передбачає дворазове щеплення тварин з інтервалом в 10–14 діб з наступною ревакцинацією через 6 місяців.

1. Про зміну природної резистентності організму тварин можна робити висновок за морфологічним складом крові та станом кровотворних органів, їх активізацією чи пригніченням, а також за активністю захисних реакцій організму.

До кінця тривалості напруженого імунітету після щеплення тварин кількість лейкоцитів збільшилась за рахунок сегментоядерних нейтрофілів та лімфоцитів. Тому після застосування вакцини “Лістерисан” зміни морфологічних показників вкладаються в рамки фізіологічної норми, а зміни в кількості лейкоцитів свідчать про помірну стимулюючу дію введеного тваринам вакцинного антигену.

Всі імунологічні реакції організму на прониклий в нього антиген відбуваються у специфічно сенсибілізованих клітинах імуннологічного ряду. Результати бласттрансформації лімфоцитів у Т- та В-лімфоцити крові баранів, щеплених вакциною “Лістерисан”, наведено в табл. 3.

Виявлені позитивні зміни кількості розеткоутворюючих Т- та В- лімфоцитів у крові баранів – їх кількість збільшилась відповідно в 1,3 та 2,8 раза, що свідчить про розвиток адаптаційно-компенсаторних механізмів за умов введення чужорідного антигену.

 *Таблиця 3*

**Динаміка кількості Т- та В-лімфоцитів у периферичній крові баранів, щеплених вакциною “Лістерисан”**

(М±m), n = 6

|  |  |
| --- | --- |
| Показники | Термін дослідження |
| вихідні дані, ( до щеплення) | через 7 діб після щеплення | через14 діб післящеплення,ревакцинація | через 10 діб після ревакцинації | через 1 міс після ревакцинації  | через 6 міс післяревакцинації |
| Лейкоцити, Г/л  | 7,00±0,20 | 8,30±0,70 | 7,10±0,30 | 7,10 ± 0,10 | 8,85±0,35 | 8,74±0,18 |
| Лімфоцити, Г/л  | 4,73±0,17 | 6,19±0,27 | 4,52±0,23\*\*ººº | 4,33±0,21ºººº | 5,25±0,24 | 5,18±0,12 |
| Т-лімфоцити, Г/л  | 0,52±0,04 | 1,20±0,05 | 0,91±0,06 | 0,87±0,04\*\* | 0,65±0, 08▫▫▫ | 0,79±0,02▫▫▫ |
| Т-хелпери, Г/л  | 2,83±0,30 | 14,50±0,76 | 24,00±0,82 | 27,00±0,89 | 22,00±0,73 | 24,15±0,08 |
| Т-супресори+кілери, Г/л  | 1,50±0,34 | 11,17±0,48 | 12,50±0,50 | 13,50±0,74▫▫ | 5,50±0,43\*\* | 5,18±0,19▫▫▫ |
| В-лімфоцити, Г/л  | 0,34±0,03 | 0,53±0,07 | 0,39±0,06 | 0,56±0,03 | 0,96±0,33 | 1,07±0,45 |

Примітки:

р – відносно попередніх даних \*\* – 0,001

р – відносно даних після ревакцинації ▫▫ – 0,05; ▫▫▫ – 0,001

р – відносно вихідних даних ººº – 0,05

 ºººº – 0,001

Роль фагоцитозу, особливо його бактерицидної фази, у процесі розвитку імунного захисту організму овець під дією вакцини „Лістерисан” досліджувався нами в комплексі з іншими показниками клітинного імунітету. Висновки узагальнені в табл. 4.

*Таблиця 4*

**Динаміка ОФР крові овець, щеплених вакциною „Лістерисан”**

(M±m), n = 6

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Термін дослідження | ФА,% | ФІ, мікробних клітин | Коефіцієнт бактерицидності |
| До щепленняПісля щеплення, через:7 діб14 дібПісля ревакцинації, через:10 діб1 місяць6 місяців | 3,67±0,4911,50±0,43 º12,83±0,7028,83±0,54 \*\*\*25,83±0,60 \*\*24,76±0,25 | 6,1±0,139,3±1,7\*11,6±1,2\*8,2±0,087,5±0,42▫7,1±0,42▫ | 0,28±0,090,99±0,090,99±0,0020,82±0,10,82±0,090,58±0,1 |

Примітки:

р відносно попередніх даних \* – 0,05, \*\* – 0,01, \*\*\* – 0,001

р відносно вихідних даних º – 0,001

р порівняно з показниками після реімунізації ▫ – 0,05

Фагоцитарна реакція клітин організму, що проявилась одразу після щеплення овець, як видно з табл. 4, є одним із найбільш демонстративних показників захисту організму від збудника.

Вивчаючи неспецифічні гуморальні показники імунітету, ми отримали такі результати: у баранів через 7 днів після щеплення показники БАСК значно зросли (в 2,2 раза), проте через 14 діб знизилися майже вдвічі, але залишилися на вищому рівні порівнянно з вихідними даними. Після ревакцинації ситуація повторилася: спостерігалось зростання БАСК у 2,1 раза відносно попередніх даних та її зниження через місяць після ревакцинації (р<0,001). Загалом, БАСК у щеплених тварин зросла в 1,1 раза через місяць після ревакцинації порівнянно з вихідними даними і залишилась на такому ж рівні через півроку (р<0,001 відносно попередніх даних) після щеплення.

У результаті досліджень ЛАСК отримані протилежні дані: через 7 діб після щеплення відмічали її вірогідне зниження в 10,5 раза відносно вихідних даних (р<0,001), а через 14 діб після щеплення вона вірогідно зростала у 8,3 раза порівняно з попередніми даними, через 10 діб після ревакцинації відмічали тенденцію до зниження з наступним вірогідним збільшенням через місяць в 3 рази (р<0,05 відносно показників перед ревакцинацією). У щеплених тварин ЛАСК порівнянно з вихідними показниками зросла в 1,7 раза через місяць після ревакцинації та у 2,1 раза порівнянно з даними перед нею і залишилась на такому ж рівні через півроку (р<0,001 відносно попередніх даних) після щеплення.

**ВИСНОВКИ**

1. У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми, що виявляється у вивченні епізоотичної ситуації щодо лістеріозу тварин в Україні, одержанні діагностичних та виробничих штамів лістерій, характеристиці особливостей їх морфологічних, культуральних, біохімічних та біологічних властивостей, удосконаленні існуючих засобів та методів діагностики і специфічної профілактики даного захворювання.
2. З 2001 по 2007 рр. в лабораторії ветеринарної медицини України надіслано 21498 проб патматеріалу та біоматеріалу від клінічно хворих тварин з підозрою на лістеріоз. Ефективність лабораторної діагностики становить 0,16 %, що зумовлює потребу в удосконаленні методів індикації та ідентифікації лістерій.
3. Виділено 40 культур польових ізолятів лістерій та вивчено їх властивості. З них Listeria monocytogenes становило – 16 ізолятів (40 %), L. ivanovii – 2 (5 %), L. innocua – 10 (25 %), L. seeligeri – 2 (5 %), L. welshimeri – 2 (5 %), L. grayi – 8 (20 %) відповідно.
4. Ефективна ідентифікація лістерій можлива за умов: правильної їх індикації (досліджуваний матеріал готується шляхом гомогенізації з наступним висівом на бульйон Фрейзера, триптиказо-соєвий бульйон з дріжджовим екстрактом та в МПБ з додаванням 15,0 % жовткової емульсії та 0,5 % активованого вугілля); визначенні лецитиназної активності культур у присутності активованого вугілля; постановці КАМП-тесту для визначення виду лістерій; проведенні біохімічних досліджень на полосках набору системи „API – лістерія”.
5. Розроблений „Набір еталонних культур для ідентифікації лістерій” ТУ У 24.4 – 00699715-001:2007 дає змогу перевірити ростові властивисті живильних середовищ для культивування лістерій та становити КАМП-тест з метою видової ідентифікації цих мікроорганізмів.
6. Відпрацьовані технологічні режими одержання антигену для створення вітчизняної вакцини проти лістеріозу тварин.
7. Експериментальна серія вакцини концентрованої інактивованої проти лістеріозу тварин ”Лістерисан” була нешкідливою для лабораторних тварин і овець та імуногенною (82 %), що дозволяє рекомендувати розроблений препарат для специфічної профілактики лістеріозу тварин.
8. Вивчені імуногенні властивості вакцини “Лістерисан” на вівцях, які характеризувались в поствакцинальний період: інтенсивною диференціацією з кількісним збільшенням Т- та В-лімфоцитів в 1,3 та 2,8 раза відповідно та субпопуляцій Т-лімфоцитів; підвищенням рівня показників ФА і ФІ периферичної крові через 7 і 14 діб у 3,5 раза порівняно з вихідними даними (р<0,001) та на 3,2 мікробних клітин в одному активному нейтрофілі відносно попередніх даних (р<0,05) відповідно; зростанням коефіцієнта бактерицидності після щеплення до 0,99±0,09 і залишався орієнтовно на такому ж рівні протягом дослідного періоду;збільшенням БАСК в 1,1 раза та ЛАСК – 1,7 раза порівняно з вихідними даними; превентивні властивості сироватки крові щеплених тварин для білих мишей утримувалась на рівні 90 % після ревакцинації, що свідчить про достатній рівень захисту.
9. Встановлено профілактичну ефективність експериментального зразка вакцини „Лістерисан” у виробничих умовах господарства ДГ „Асканія Нова” Херсонської області на поголів′ї 6051 голів овець, яка забезпечила стабільну епізоотичну ситуацію з лістеріозу ДРХ.

# ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для удосконалення діагностики та специфічної профілактики лістеріозу запропоновано:

* 1. „Набір еталонних культур для ідентифікації лістерій” ТУ У 24.4 – 00699715-001:2007.
	2. Настанову по застосуванню „Набору еталонних культур для ідентифікації лістерій”.
	3. Методичні рекомендації „Лабораторна діагностика лістеріозу тварин”, затверджені Науково-методичною радою Державного Департаменту ветеринарної медицини Мінагрополітики України 20.12.2006р. (протокол №3).
	4. Виробничий штам Listeria monocytogenes № М-04 (виробничий, типовий, містить О-антигени типів І, ІІ).
	5. Оптимальні живильні середовища для накопичення бактеріальної маси лістерій при виробництві вакцини.
	6. Вакцину концентровану інактивовану проти лістеріозу тварин ”Лістерисан” (патент № 21798, який зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 10.04.2007 р.).
	7. „Тимчасову настанову по застосуванню концентрованої інактивованої вакцини проти лістеріозу тварин”, затверджену Головним державним інспектором ветеринарої медицини України, 24.05.2005.

#### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Бондар (Гаркавенко) Т. О.** Роль лістерій у патології тварин і людини/ Т. О. Бондар(Гаркавенко)// Ветеринарна біотехнологія. – 2005. – № 7.– С. 13–17.
2. **Бондар (Гаркавенко) Т. О.** Сучасний стан лабораторної діагностики лістеріозу / Т. О. Бондар (Гаркавенко)// Ветеринарна біотехнологія. – 2006. – № 8. – С. 16–23.
3. **Бондар (Гаркавенко) Т. О.** Порівняльна оцінка живильних середовищ для культивування збудника лістеріозу / Т. О. Бондар (Гаркавенко),С. А.Дементьєва, В. О. Андріящук // Ветеринарна біотехнологія. – 2006. – № 9. – С. 22–27. *(Здобувач опрацювала літературні дані, виконала експериментальну частину досліджень та підготувала статтю).*
4. **Бондар (Гаркавенко) Т. О.** Шляхи удосконалення специфічної профілактики лістеріозу / Т.О. Бондар (Гаркавенко), С. А.Дементьєва, В. О. Андріящук // Науковий вісник Львівської Національної академії ветеринарної медицини ім. Ґжицького.– 2006. – Т 8, № 4 (31). – Ч.2. – С. 11–14. *(Здобувач опрацювала літературні дані, виконала експериментальну частину досліджень та підготувала статтю).*
5. **Гаркавенко Т. О.** Неспецифічна резистентність овець, щеплених вакциною проти лістеріозу „Лістерисан” / **Т. О.** **Гаркавенко** // Збірник наукових праць Луганського НАУ. – 2007. – № 78/101. – С. 91–95.
6. **Гаркавенко Т. О.** Показники клітинного імунітету овець, щеплених вакциною”Лістерисан” / **Т. О.** **Гаркавенко** // Ветеринарна біотехнологія. – 2007. – № 11. – С. 25–29.
7. Пат. 21798 Україна, А61К 39/08. Вакцина „Лістерисан” концентрована інактивована проти лістеріозу тварин / Риженко В. П., Ображей А. Ф., Риженко Г. Ф., Дементьєва С. А., Андріящук В. О., **Бондар (Гаркавенко) Т. О.** – № u 2006 05689; заявл. 24.05.2006; опубл. 10.04.2007, Бюл. № 4. – 2 с. *(Здобувач провела експериментальні дослідження і патентний пошук).*
8. Лабораторна діагностика лістеріозу тварин [методичні рекомендації] / **Т. О. Бондар (Гаркавенко)**, А. В. Абрамов, В. М. Івченко, В. П. Риженко – К., 2007. – 32 с. *(Здобувач описала методи мікробіологічних досліджень на лістеріоз та підготувала методичні рекомендації до друку).*
9. Технічні умови України ТУ У 24.4 – 00699715 – 001:2007 / Нешта Т. М., Ординська Д. О., **Бондар (Гаркавенко) Т. О.** Погоджено Державним департаментом ветеринарної медицини Мін АПК України та Державним науково-контрольним інститутом біотехнології і штамів мікроорганізмів 26.03.2007 р. *(Здобувач виконала експериментальну частину досліджень).*
10. Тимчасова настанова по застосуванню концентрованої інактивованої вакцини проти лістеріозу тварин”, затверджена Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України 24.05.2005 року. *(Здобувач виконала експериментальну частину досліджень).*

**Гаркавенко Т.О. Біологічні властивості збудника, удосконалення методів діагностики та специфічної профілактики лістеріозу тварин. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. – Національний аграрний університет, Київ, 2008.

Дисертація присвячена вивченню основних біологічних властивостей збудника лістеріозу тварин в Україні, удосконаленню бактеріологічних методів діагностики та специфічної профілактики цього захворювання.

Вивчено поширення лістеріозу серед тварин в Україні.

Виявлено, що польові ізоляти лістерій, виділені з патологічного матеріалу від хворих тварин та трупів, а також із харчових продуктів та сировини тваринного походження, мали подібні морфологічні, культуральні властивості, але різнилися за біохімічними властивостями та вірулентністю.

За результатами виконаних досліджень запропоновано способи підготовки патматеріалу для посіву, оптимальні середовища для культивування лістерій та методи ідентифікації збудника.

Виготовлено та вивчено експериментальні зразки вакцини концентрованої інактивованої проти лістеріозу тварин ”Лістерисан”, яка створює достатній протективний захист і може бути використана в системі заходів профілактики цєї хвороби.

 **Ключові слова:** лістеріоз, Listeria monocytogenes, діагностика, профілактика, інактивована вакцина, клітинний імунітет, неспецифічні фактори.

**Гаркавенко Т.A. Биологические особенности возбудителя, усовершенствование методов диагностики и специфической профилактики листериоза животных. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. – Национальный аграрный университет, Киев, 2008.

 Диссертация посвящена изучению основных биологических свойств возбудителя листериоза в Украине, совершенствованию бактериологических методов диагностики и специфической профилактики этого заболевания.

Изучена эпизоотологическая ситуация по листериозу животных в Украине. Болезнь встречается в основном у мелкого и крупного рогатого скота, свиней, а также у домашних животных. Источником заражения людей могут быть больные животные, продукты питания животного происхождения. Также одним из факторов передачи инфекционного начала при листериозе служат городские канализационные сооружения, стоки животноводческих комплексов, мясоперерабатывающих комбинатов и другие пищевые объекты, а также земля .

Установлено, что полевые изоляты листерий, выделенные из патологического материала от больных животных и из трупов, а также из пищевых продуктов и сырья животного происходжения, имеют сходные морфологические и культуральные особенности, но отличаются по биохимическим свойствам и по вирулентности. Выделены культуры листерий 6 видов: Listeria monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua, L. seeligeri, L. welshimeri, L. grayi.

По результатам проведённых исследований предложен способ подготовки патматериала для посева, который предусматривает обязательную гомогенизацию исследуемого материала. Оптимальными средами для культивирования листерий являются бульйон Фрейзера, триптиказо-соевый бульон с дрожджевым экстрактом, мясо-пептонный бульйон с добавлением 15,0 % желточной эмульсии и 0,5 % активированного угля, ПАЛКАМ и Оксфордский агары с селективными добавками.

Определение лецитиназной активности культур на желточном агаре с 0,5 % активированного угля дало возможность надёжно диференцировать листерии от непродуцирующих лецитиназу ентерококков и ешерихий, и от продуцирующих её независимо от присутствия сорбента стафилококков, а также L. monocytogenes от непатогенных видов листерий.

С помощью КАМП-теста определяли не только наличие гемолиза, но и зоны расширеного гемолиза около культур Staph. aureus и R. еqui, что дало возможность отличать листерии разных видов.

Исследование биохимических свойств листерий на полосках набора системы „API – листерия” облегчило работу и ускорило сроки проведения идентификации культур.

Предложены референс-культуры листерий, которые вошли в состав „Набору еталонних тест-культур для ідентифікації лістерій” ТУ У 24.4 – 00699715-001:2007, используемых для проверки ростовых свойств питательных сред, а также в качестве контрольных культур при постановке КАМП-теста.

Отсутствие отечественной вакцины против листериоза животных вызвало необходимость создания вакцины. Предложен вакцинный штамм Listeria monocytogenes, отработаны оптимальные питательные среды и температурные режимы культивирования возбудителя, обеспечивающие максимальное накопление бактериальной массы, способы инактивации и сорбции листериозного антигена, в результате чего сконструированы экспериментальные образцы вакцины концентрированой инактивированой против листериоза животных ”Листерисан”.

 Применение препарата на лабораторных животных и овцах показало, что вакцина вызывает синтез листериозных антител у двухкратно вакцинированных животных, среднегеометрический титр которых через 6 месяцев после прививки составлял 2,70±0,06,, что характеризуется достаточной протективной активностью и она может быть использована в системе профилактических мероприятий против этого заболевания.

 Гематологические показатели у овец, привитих вакциной “Листерисан”, характеризуются незначительным увеличением количества сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, интенсивной дифференциацией и количественным увеличением в 1,3 и 2,8 раза Т- и В-лимфоцитов соответственно, что свидетельствует о доброкачественном поствакцинальном процессе.

 Достаточно хорошо проявились неспецифические защитные реакции организма привитых животных. Так, показатели неспецифической резистентности были значительно выше по сравнению с исходными данными, БАСК увеличилась в 1,1 раза, а ЛАСК – в 1,7 раза. Повторное введение вакцины через 14 дней вызывало у животных повышение активности БАС и ЛАС крови по сравнению с показателями после первого введения вакцины.

 Более выражено на листериозный антиген проявилась клеточная реакция у привитых овец. Фагоцитарная активность нейтрофилов в исследованных пробах крови подопытных животных увеличилась в 3,5 раза по сравнению с исходными данными (р<0,001), а фагоцитарный индекс – на 3,2 м. к. в одном активном нейтрофиле, относительно предыдущих данных (р<0,05), коэффициент бактерицидности после вакцинации возрос до 0,99±0,09 и оставался приблизительно на таком же уровне на протяжении опыта.

 Установлена полная безвредность вакцины. Использование экспериментального образца вакцины “Листерисан” в ОХ “Асканийское” Херсонской обл. на овцах обеспечило зпизоотическое благополучие хозяйства в течении года (срок набладения).

 **Ключевые слова:** листериоз, Listeria monocytogenes, диагностика, профилактика, инактивированная вакцина, клеточный иммунитет, неспецифические факторы.

**Garkavenko T. Biological properties of agents, improvement of diagnostics and specific prevention of animals listeriosis. – Manuscript.**

The dissertation on competition of a scientific degree of the Candidate of Veterinary Science in speciality 16.00.03 – Veterinary microbiology and virology. – National Agricultural University, Kyiv, 2008.

Dissertation is devoted the study of basic biological properties of agents of animals listeriosis in Ukraine, to the improvement of bacteriological methods of diagnostics and specific prophylaxis of this disease.

Distribution of listeriosis is studied among animals in Ukraine.

It is discovered that isolates listeria, that was pich from pathological material from sick animals and dead bodies, and also from food products and raw material of animal origin,were similar morphological, cultural properties, but differed after biochemical properties and virulence.

As a result of the executed researches the methods of pathological material preparation of patmaterialu are offered forsowing, optimum mediums for cultivation oflisteria and methodsof identification of agents.

Made and studied the experimental sample of vaccine concentrated inactivated against the animals listeriosis of ”Listerisan”, which creates sufficient protective defence and can be used in the system of measures of prophylaxis of this disease.

**Key words:** listeriosis, Listeria monocytogenes, diagnostics, prevention maintenance, inactivated vaccine, cellular immuniti,nonspecific factors.

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