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

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

# Меліхов Сергій Володимирович

УДК 619: 579. 841. 93: 579. 882. 11

**МІНЛИВІСТЬ, РОДОВА І ВИДОВА АНТИГЕННІСТЬ BRUCELLA**

**OVIS ТА СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА БРУЦЕЛАОВІСНОЇ І ХЛАМІДІЙНОЇ ІНФЕКЦІЙ ПРИ ЗМІШАНОМУ ПЕРЕБІГУ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

Харків – 2003

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН.

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

**Бабкін Анатолій Федорович**, Інститут експериментальної і

клінічної ветеринарної медицини УААН, завідувач

лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби.

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

**Апатенко Володимир Максимович**, Харківська державна

зооветеринарна академія Міністерства аграрної політики

України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології;

кандидат ветеринарних наук, доцент

**Руденко Анатолій Федорович**, Луганський

національний аграрний університет Міністерства

аграрної політики України, декан факультету

ветеринарної медицини.

**Провідна установа** Національний аграрний університет Кабінету

Міністрів України, кафедра мікробіології і вірусології, м. Київ

Захист відбудеться “ 21 ” жовтня 2003 р. о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.359.01 в Інституті експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН за адресою: 61023, м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН за адресою: м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

Автореферат розісланий “ 19 ” вересня 2003 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

## доктор ветеринарних наук \_\_\_\_\_\_ Бабкін А.Ф.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Серед небезпечних хвороб, що завдають значних економічних збитків вівчарству за рахунок утрати генетичного фонду високоцінних порід і зниження рівня відтворення поголів’я, інфекційний епідидиміт баранів та хламідіоз є найбільш поширеними в багатьох країнах світу з розвинутим вівчарством [Walker R.L. et al., 1986; Burgess G.W., 1992; Katoch R.C. et al., 1996]. Актуальними зазначені хвороби залишаються і для України [Діренко П.М., Руденко А.Ф., 1984; Руденко А.Ф., 1986; Бусол В.О., Бабкін А.Ф., 1991; Бортнічук В.А., 1991; Дейнеш А., 1992; Бабкін А.Ф., 1998].

Аналіз джерел вітчизняної та закордонної літератури свідчить, що незважаючи на всебічне вивчення збудників бруцелаовісної та хламідійної інфекцій, багато питань із діагностики та боротьби з цими захворюваннями залишається все ще не визначеними [Казанков І.Г., 1983; Ромахов В.А., Касьянов А.М., 1990]. За рядом показників, зокрема, морфо-тинкторіальним властивостям, тропізмом до тканин репродуктивної системи, що зумовлює розвиток “статевої інфекції”, а також здатності тривалий час персистувати в організмі у латентному стані, зазначені збудники мають багато спільного, що ускладнює проведення діагностики та диференційної діагностики захворювань [Байтурина О.Ш. та ін., 1976; Хазіпов Н.З., та ін., 1984; Мітрофанов П.М., Казанков М.Г., Ощепков В.Г., 1982; Alton G.G. et al, 1988; Bloch N., Diallo I., 1991; МЕБ, 2000].

В умовах реформування тваринництва, коли в селянських господарствах на одному подвір’ї утримується велика й дрібна худоба, свині, виникають сприятливі умови для міграційних процесів збудників бруцельозу, зокрема, B.ovis, що має важливе епізоотологічне й епідеміологічне значення, враховуючи дані про мінливість цього збудника у напрямку S-форми бруцел [Ощепков В.Г., Гордієнко Л.Н., 1987; Репіна Л.П. та ін., 1989; Кузьмичонок А.П., Мельниченко В.І., 1995]. У зв’язку із зазначеним, подальше вивчення мінливості культурально-морфологічних, антигенних та патогенних властивостей штамів Brucella ovis, питання розробки більш ефективних методів ізоляції й типізації культур та удосконалення методів серологічного скринінгу та діагностичної оцінки виявленої бруцелаовісної серопозитивності є актуальною проблемою.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана у відповідності до науково-дослідних робіт Інституту експериментальної та клінічної ветеринарної медицини УААН, держреєстрація № 0197U000757 “Удосконалити систему і засоби контролю епізоотичної ситуації по бруцельозу тварин в Україні” (1996–2000 рр.) та № 0101U001610 “Розробити та впровадити сучасні засоби і методи діагностики й профілактики бруцелаовісної, кампілобактерійної і хламідійної інфекцій” (2001–2005 рр.).

**Мета і задачі дослідження.** Метою наукової роботи є визначення мінливості штамів Brucella ovis, родової й видової бруцельозної антигенності збудника інфекційного епідидиміту баранів та особливостей серологічної діагностики бруцелаовісної та хламідійної інфекцій овець при змішаному перебігу.

Для досягнення цієї мети, на вирішення були поставлені такі задачі: дослідити мінливість культурально-морфологічних і антигенних властивостей штамів B.ovis в залежності від умов зберігання і культивування; визначити родові та видові бруцельозні антигенні властивості штамів B.ovis і виготовити відповідні діагностичні R-сироватки для серологічної диференціації бруцел; розробити нормативну документацію на виготовлення, контроль та застосування “Набору для серологічної диференціації культур бруцел”; провести серологічний моніторинг щодо виявлення бруцелаовісної та хламідійної інфекцій у вівцегосподарствах з низьким рівнем відтворення поголів’я та при спонтанному спалаху інфекційного епідидиміту баранів; вивчити вплив інокуляції інактивованих бактеринів та живої культури B.ovis на динаміку серологічних зрушень при латентній бруцелаовісній і хламідійній інфекції у ягнят; дослідити причини виявлення перехресних серологічних реакцій при дослідженнях із застосуванням бруцелаовісних і хламідійних антигенів.

**Об’єкт досліджень:** бруцелаовісна та хламідійна інфекції овець, штами бруцел (Brucella abortus, Brucella melitensis, Brucella suis, Brucella ovis), вівцепоголів’я неблагополучних по ІЕ баранів і хламідіозу господарств, антигени B.ovis і Chl.psittaci та діагностичні сироватки.

**Предмет досліджень:** мінливість штамів B.ovis, родо- та видоспецифічні антигенні властивості, індикація та диференціація збудника ІЕ баранів, серологічна діагностика при асоційованому перебігу бруцелаовісної і хламідійної інфекцій.

**Методи досліджень:** в роботі використано епізоотологічні, клінічні, бактеріологічні (ізоляція, типізація та диференціація культур), серологічні (РА, РІД, РЗК, РТЗК, ІФА) та алергічні методи досліджень. Статистичну обробку одержаних результатів проводили на ПК за допомогою програми “Stat SF”, розробленою в ІЕКВМ УААН.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Визначено мінливість культурально-морфологічних та антигенних властивостей штамів B.ovis, що тривалий час культивувались на щільних живильних середовищах, яка характеризувалась дисоціацією 46,7 % штамів у напрямку S-форм, супресією видового бруцелаовісного R-антигену та експресією S-бруцельозного антигену. Уточнено диференційні ознаки при проведенні типізації культур бруцел, зокрема, відсутність росту типових R-форм B.ovis на середовищах з основним фуксином (1:50000) та позитивна уреазна проба. Виявлено штами Brucella ovis із високою видовою бруцелаовісною (67/Б) та родовою бруцельозною (76/982) антигенною активністю. За антигенними взаємозв’язками штамів B.ovis з культурами інших видів бруцел, зокрема, B.abortus та B.melitensis, виявлено 2 групи, які умовно позначено як R-a (R-abortus) та R-m (R-melitensis).

Теоретично обґрунтовано та розроблено способи одержання родової бруцельозної (патент № 53910 А) і видової бруцелаовісної (патент № 49257 А) R-сироваток із застосуванням селекційонованих штамів B.ovis.

Установлено й охарактеризовано природу антиген-неспецифічної модуляції імунної відповіді на хламідійні антигени при введенні тваринам бруцельозних антигенів, зокрема, бруцеліну ВІЕВ, по фону латентного хламідіозу, що проявилося підвищенням титрів протихламідійних антитіл. В ІФА з використанням моноклональних протихламідійних антитіл не виявлено антигенної спорідненості з антигенами B.ovis. Подвійна серопозитивність, що виявлена в сироватках овець обумовлена наявністю антитіл проти антигенів обох збудників.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати досліджень використано при розробці нормативної документації на виготовлення, контроль та застосування “Набору компонентів для серологічної диференціації культур бруцел”, яка затверджена Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики за № 15-14/125 від 22 квітня 2002 року.

Розроблено способи виготовлення видо- та родоспецифічних R-сироваток із використанням штамів B.ovis з високими родовими та видовими антигенними властивостями, що поліпшило серологічну ідентифікацію та диференціацію культур бруцел, зокрема, Brucella ovis.

Запропоновано й задепоновано у ДНКІБШМ виробничі штами B.ovis, які мають різні антигенні характеристики, зокрема, 67/Б і 76/982, для виготовлення діагностичних наборів.

Виявлено залежність рівня бруцелаовісної і хламідійної серопозитивності та рівня відтворення поголів’я, що вказує на необхідність серологчних досліджень тварин на зазначені хвороби у господарствах з низьким виходом ягнят.

**Особистий внесок здобувача** полягає у безпосередньому виконанні клініко-епізоотологічних досліджень у господарствах, проведенні наукових дослідів і експериментів, статистичній обробці та аналізі первинних даних, узагальненні результатів та висновків.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації доповідались й обговорювались на: Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених “Стан та перспективи розвитку ветеринарної науки” (6–7 жовтня 1999 р., ІЕКВМ, м. Харків); Міжнародній конференції “Ветеринарная наука на пороге ХХІ века” (15–16 листопада 2000 р., ІЕКВМ, м. Харків); 5-му з’їзді паразитоценологів України “Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини” (5–6 квітня 2001 р., м. Харків, ХДМУ, ХЗВІ); Міжнародній науково-практичній конференції “ІЕКВМ – 80 років на передовому рубежі ветеринарної науки” (15–19 жовтня 2002 р., ІЕКВМ, м. Харків); Міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні проблеми ветеринарної медицини в умовах сучасного ведення тваринництва” (26 травня–2 червня 2003 р., ІЕКВМ, м. Феодосія); засіданнях і звітних сесіях Вченої ради ІЕКВМ УААН в 1999–2002 рр.; засіданнях методичної ради ІЕКВМ УААН; міжлабораторному засіданні ІЕКВМ УААН.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 7 наукових праць у фахових виданнях, отримано два патенти на винаходи.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 155 сторінках комп’ютерного тексту та ілюстрована 24 таблицями, 9 рисунками й складається зі вступу, огляду літературних джерел, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який налічує 221 джерело, із них 115 іноземних, та додатків.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконана впродовж 1999–2002 років в лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН.

У двох вівцегосподарствах Харківської області: № 1 і № 2, проведено серологічний моніторинг та ретроспективний епізоотологічний аналіз благополуччя щодо ІЕ баранів і хламідіозу, з урахуванням рівня відтворення вівцепоголів’я та збереження приплоду, а також умов утримання поголів’я. Серологічні дослідження на інфекційний епідидиміт проводили в реакції імунодифузії (РІД) й реакції тривалого зв’язування комплементу (РТЗК) на інфекційний епідидиміт та в реакції зв’язування комплементу (РЗК) на хламідійну інфекцію за загально прийнятими методиками згідно з настановами по застосуванню з використанням комерційних діагностикумів, виготовлених в ДП “Ветеринарна медицина” та на Херсонській біофабриці. При постановці серологічних реакцій (РЗК і РТЗК) використовували сухий комплемент морської свинки і гемолітичну сироватку виробництва ЗАО “Біолік”, м. Харків, у робочих титрах.

В серологічних реакціях досліджено 3136 проб сироваток крові від тварин різних статево-вікових груп (вівцематок, баранів-плідників, ремонтного молодняка). На підставі отриманих даних проведено аналіз тенденції змін динаміки серопозитивності по господарствах у цілому та серед різних вікових груп баранів, а також рівня відтворення поголів’я .

Епізоотологічний аналіз спонтанного спалаху інфекційного епідидиміту баранів провели у трьох дослідних вівцегосподарствах Херсонської області: д/г “А”, “М”, “Т”. Для ідентифікації ізольованих культур використали методи запропоновані ФАО/ВОЗ (1986) та МЕБ (2000). Серологічну диференціацію культур B.ovis проводили в РА за допомогою Набору для серологічної диференціації культур бруцел, виготовленого в ІЕКВМ, ТУ У 24.4–00497087–654–2002.

Експериментальні дослідження на 20 ягнятах 5-ти місячного віку проводили в умовах експериментальної бази ІЕКВМ. Протягом 16 місяців вивчали серологічний статус тварин при змішаному перебігу латентних форм бруцелаовісної й хламідійної інфекцій у овець та вплив бактеринів B.ovis на динаміку імунної відповіді. По закінченні досліду проведено діагностичний забій та бактеріологічні.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою комп’ютерної програми “Stat SF”, розробленою в ІЕКВМ УААН.

Досліди по вивченню причин появи перехресних серологічних реакцій поміж антигенами збудників хламідіозу овець і інфекційного епідидиміту баранів проведено у трьох серологічних реакціях: пробірочній реакції аглютинації, реакції зв’язування комплементу та імуноферментному аналізі (ІФА). Реакцію аглютинації та реакцію зв’язування комплементу проводили за загальноприйнятими методиками. Імуноферментний аналіз проводили в Центральній державній лабораторії ветеринарної медицини, м. Київ, директор – кандидат ветеринарних наук М.С. Павленко,– за допомогою набору для визначення антигенів хламідій Chlamydia Microplate EIA, виробництва Sanofi Diagnostics Pasteur, Франція, що зареєстрований в Україні. В ІФА з моноклональними антитілами досліджували бруцелаовісні та хламідійні антигени. Реакцію проводили згідно “Інструкції щодо застосування імуноферментного набору для визначення антигенів Chlamydia trachomatis в клінічному матеріалі CHLAMYDIA MICROPLATE EIA, код 33081”, (1999).

Вивчено мінливість біологічних і антигенних властивостей культур 15 штамів B.ovis, які зберігались в музеї лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби ІЕКВМ. Характеристику штамів визначали згідно методик, рекомендованих ФАО/ВОЗ (1986) та МЕБ (2000). Антигенні властивості досліджували в пластинчатій реакції аглютинації (РА) із бруцельозними S- та R- бруцельозними сироватками виробництва НВО “Рівес”, Росія, згідно настанови по застосуванню набору. З метою визначення морфо-тинкторіальних характеристик B.ovis для диференційної мікроскопії від хламідій 7-добові курячі ембріони заражали вакцинним штамом B.ovis 67/Б. У досліді використано 40 ембріонів. Розрахунок 50 % летальної дози проводили за методом Ріда й Менча.

Родо- та видоспецифічні антигенні властивості штамів B.ovis визначали у пластинчатій реакції аглютинації на предметних скельцях з антисироватками, одержаними в лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби на штами B.ovis 67/Б, 76/982, 156/7807, які мали антигенну варіабельність. В роботі було використано 5 штамів B. abortus, 1 штам B. melitensis, 3 штами B. suis та 15 штамів B. ovis.

Родо- та видоспецифічні бруцелаовісні сироватки одержували проти бактеринів, виготовлених із штамів B. ovis 67/Б та 76/982. Для імунізації використано 10 клінічно здорових кролів, вагою 2–2,5 кг. Технологію виготовлення бактеринів та схеми імунізації розроблено в лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби ІЕКВМ (автори: А.Ф. Бабкін, М.Г. Галіщев, С.В. Меліхов). Одержані сироватки перевіряли на стерильність за загально прийнятими методами, а також активність і специфічність у пластинчатій РА зі стандартними S- та R- бруцельозними антигенами комерційного виробництва (Росія), S-бруцельозним та R-бруцелаовісним антигенами власного виробництва, а також живими культурами бруцел в S-, R- та RS- формах.

Розроблено нормативну документацію та виготовлено дослідно-виробничу й виробничу серії “Набору для серологічної диференціації культур бруцел”.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

**Вивчення бруцелаовісної й хламідійної серопозитивності у вівцегосподарствах із низьким рівнем відтворення та при спонтанному спалаху інфекційного епідидиміту баранів.** Серологічним моніторингом на бруцелаовісну та хламідійну інфекції у двох вівцегосподарствах Харківської області було визначено тенденцію серопозитивності серед отар баранів-плідників в умовах щорічного виявлення та вилучення серопозитивних на бруцелаовісну й хламідійну інфекції тварин, а також відтворення поголів’я. Особливу увагу в обох вівцегосподарствах привертав рівень виходу й збереження приплоду, який в останні роки становив у середньому 40 – 50 %. Як свідчать дані аналізу відтворення поголів’я, на початку наших досліджень вихід ягнят на 100 вівцематок становив 81 % у д/г № 1 і 52,4 % у д/г № 2. При подальших спостереженнях установлено тенденцію до зниження рівня відтворення поголів’я. Проте, в обох господарствах не реєстрували масових абортів (1–2 %). Низький вихід приплоду зумовлювали мертвонародження (10 %), загибель приплоду у перший місяць життя, а також яловість вівцематок у наслідок ендометритів, тощо.

Проведеними серологічними дослідженнями на бруцелаовісну та хламідійну інфекції встановлено, що в обох вівцегосподарствах у 1999 роках виявляли до 5,2 % тварин серопозитивних на ІЕ баранів і 19,7 % серопозитивних на хламідіоз у д/г № 1 та відповідно 4,9 і 13,2 % у д/г № 2. У 2000 році серопозитивність на обидві хвороби дещо знизилась, але у подальші роки, знову реєстрували підвищення кількості серопозитивних на ІЕ баранів тварин. У зв’язку з упровадженням у технологічну схему профілактичних заходів у 2001 році щеплення тварин проти хламідійного аборту овець, серологічні дослідження у 2001 та 2002 роках в обох господарствах, згідно з вимогами чинної настанови, не проводили.

Необхідно наголосити, що застосування для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів одночасно РІД та РТЗК додатково виявляло до 1,7 % серопозитивних тварин, тобто хворих на бруцелаовісну інфекцію. При порівняльному аналізі серопозитивності та рівня відтворення поголів’я, нами виявлено тенденцію, при якій підвищення кількості серопозитивних тварин у поточному році співпадало зі зниженням виходу ягнят в окітний сезон наступного року (рис. 1).

Проведений аналіз серопозитивності різних вікових груп серед отар баранів, свідчив про високий відсоток виявлення серопозитивних на ІЕ баранів та хламідіоз тварин у репродуктивному віці, 2 роки і старше, що вказує на високу значимість баранів у підтриманні епізоотичного процесу зазначених інфекційних хвороб.

Щорічне виявлення серопозитивних на бруцелаовісну та хламідійну інфекції тварин, низький рівень відтворення й збереженості приплоду при відсутності масових абортів дали підставу вважати, що в обох господарствах серед дорослого поголів’я, зокрема, баранів-плідників, реєструвався змішаний стаціонарний перебіг бруцелаовісної та хламідійної інфекцій. При такому перебігу зазначених хвороб культури збудників B.ovis або Chl.abortus виділити важко. У зв’язку з цим, чинні інструкції регламентують діагноз на ІЕ або хламідіоз ставити на підставі результатів серологічних досліджень та клініко-епізоотологічних даних. Бактеріологічними дослідженнями матеріалу від 15 баранів з обох вівцегосподарств, які проводились в лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби і Харківською ОДЛВМ, культур B.ovis та Chl.abortus ізольовано не було.

У 2002 році у трьох вівцегосподарствах Херсонської області було зареєстровано спонтанний спалах ІЕ баранів, який характеризувався високим рівнем серопозитивності серед дослідженого поголів’я баранів (68-70 %). Високий рівень серопозитивності та аналіз інших епізоотологічних даних свідчив про тривалість епізоотичного процесу. Установлено порушення технологічної схеми утримання статево-вікових груп, коли всі групи овець утримувались на одній території, до групи дорослих баранів-плідників щорічно вводили молодих баранчиків у віці 1 рік. Привертає увагу і недостатній рівень відтворення поголів’я, хоча масових абортів у господарствах не реєструвалось. На тривалість епізоотичного процесу вказував також, у деякій мірі, низький процент виявлення позитивно реагуючих у РІД – 13,5 %.

Аналіз серопозитивності серед різних вікових груп баранів свідчив про високу інтенсивність інфікування вівцепоголів’я. Найвищі показники інфікування встановлено в групах баранів у віці від 2,5 до 5,5 років – 68,6 – 76,7 % (рис. 2).

Бактеріологічними дослідженнями біоматеріалу від забитих 20-ти серопозитивних баранів проведеними в Херсонській ОДЛВМ, лише від одного барана з придаткової статевої залози на МППГГА було ізольовано культуру, яку в лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби ІЕКВМ за культурально-морфологічними та антигенними властивостями ідентифіковано і типовано, як B.ovis і занесено в реєстр штамів ІЕКВМ за № 175/1257.

**Вивчення впливу інокуляції інактивованих бактеринів та живої культури Brucella ovis на динаміку серологічних зрушень при латентному перебігу змішаної бруцелаовісної й хламідійної інфекцій у ягнят.** У лабораторному досліді на 20 ягнятах (11 баранчиків, 9 ярок) 5-ти місячного віку нами проведено довгострокові спостереження, протягом 19 місяців, серологічного статусу тварин щодо бруцелаовісної та хламідійної інфекцій до й після введення інактивованих бактеринів і живої культури B.ovis. На початку спостережень було виявлено три позитивно реагуючі тварини на бруцелаовісну інфекцію в РІД і п’ять на хламідійну в РЗК у титрі 1:10. Повторними дослідженнями через 10 і 23 доби було виявлено вже 5 ягнят (25 %) серопозитивних на бруцелаовісну інфекцію, а також зареєстровано підвищення титрів протихламідійних антитіл до 1:20. У чотирьох ягнят установлено одночасну серопозитивність на обидва захворювання. Зазначені дані свідчили про поступовий розвиток інфекційного й епізоотичного процесів на обидві інфекції. У віці 8 місяців тваринам було введено експериментальну інактивовану емульсин-вакцину проти ІЕ баранів. Поствакцинальна гуморальна відповідь через 21 добу після вакцинації була слабкою і виявлена у 35,7 % тварин в РТЗК у титрах від 1:5 до 1:20 порівняно з 21,4 % позитивно реагуючих тварин до вакцинації. Через 8 місяців після першої вакцинації, у віці 16 місяців, тваринам повторно було введено інактивовану емульсин-вакцини проти ІЕ баранів, яка зумовила імунну відповідь на бруцелаовісні антигени у 92,3 % тварин із середньогеометричними титрами 3,066 log2. Результати досліджень на хламідіоз у цей же період свідчили про зниження кількості серопозитивних тварин, що вказувало на відсутність кореляції поміж серологічним статусом тварин на ІЕ та хламідіоз. Протягом наступних двох місяців бруцелаовісна серопозитивність поступово знижувалась. Привертає увагу, що саме в цей період, на спаді бруцелаовісної серопозитивності, значно поширилась хламідійна інфекція.

Через 3 місяці після вакцинації проти ІЕ баранів було проведено алергічну пробу бруцеліном ВІЕВ. При серологічному дослідженні через 14 днів після алерготесту виявили різке зростання кількості серопозитивних на ІЕ серед 14 дослідних тварин з 27,8 до 72,2 %. При цьому значно збільшилися середньогеометричні титри з 0,475 log2 до 3,585 (Р<0,05). Заслуговують на увагу результати дослідження на хламідіоз у тіж строки. При серологічному дослідженні в РЗК через 14 днів після алергічної проби виявили достовірне підвищення середньогеометричних титрів антитіл з 0,475 до 4,013 (P<0,05). Рівень серопозитивності становив 94,4 % у порівнянні з попереднім дослідженням – 22,2 %. Тобто, введення бруцеліну по фону латентних бруцелаовісної й хламідійної інфекцій супроводжувалось підвищенням специфічних бруцелаовісних антитіл, а також протихламідійних. Необхідно зазначити, що введення алергену призвело до підвищення титрів протихламідійних антитіл у тварин, які раніше реагували за РЗК (№№ 25, 29, 64, 31, 34, 61, 72), та появу серопозитивності у негативних тварин (№№ 27, 32, 35, 38, 40, 58).

Через 3,5 місяці після вакцинації всім тваринам було підшкірно, в області пахової складки, введено живу культуру вірулентного штаму B.ovis 65/65939 в дозі 2×109 м.к., що викликало підвищення титрів протибруцелаовісних антитіл при дослідженні через 21 добу, які було виявлено в усіх штучно інфікованих тварин. Граничні титри бруцелаовісних антитіл сягали від 1:10 до 1:160 (5,251 ±0,298 log2). Дослідження сироваток від заражених тварин в РЗК з хламідійним антигеном виявило тенденцію до збільшення серопозитивності з 94,4 до 100 % тварин із середньогеометричним титром протихламідійних антитіл 4,108 ±0,270 log2. Протягом наступних 1,5 місяців відбувалося поступове зниження серопозитивності на обидві інфекції.

Через 6 місяців після інокуляції живої культури B.ovis, було проведено алергічну пробу бруцеліном ВІЕВ з метою з’ясування рівня клітинної імунної відповіді, а також визначення впливу активності клітин імунної пам’яті. Алергічна реакція на бруцелін була негативною. При дослідженні сироваток крові через 14 днів після введення алергена, встановлено, що титри антитіл проти обох збудників зросли з 1,393 ±0,636 log2 до 2,922 ±0,447 log2 (Р<0,05) при дослідженні в РТЗК із бруцелаовісним антигеном, і з 1,593 ±0,755 log2 до 2,658 ±0,743 log2 (Р>0,05) – з хламідійним. Разом із тим, необхідно наголосити, що в даному випадку рівень підвищення титрів антитіл проти антигенів B.ovis і Chl.abortus був дещо меншим, ніж в першому дослідженні з бруцеліном, особливо це стосується протихламідійних антитіл.

При бактеріологічному дослідженні біоматеріалу від 10 забитих баранів у 2-х випадках від позитивно реагуючих баранів було ізольовано культуру B.ovis. Мікроскопією мазків-відбитків із внутрішніх органів пофарбованих за Стемпом і Романовським-Гімза від баранів №№ 27, 28 , 40 та 61 виявлено елементарні тільця хламідій. Усі ці барани були серопозитивні на хламідіоз у титрах від 1:5 до 1:20. Необхідно зазначити, що у баранів №№ 27 і 40 діагноз підтверджено серологічно, бактеріологічно та бактеріоскопічно на обидві хвороби.

За результатами клінічних і серологічних досліджень слід вважати, що серед поголів’я овець у 5–6-ти місячному віці реєструвався латентний перебіг бруцелаовісної й хламідійної інфекцій. Введення специфічних бруцелаовісних антигенів, зокрема, емульсин-вакцини проти ІЕ баранів або живої культури B.ovis, призводило до збільшення показників імунного статусу тварин, що свідчило про специфічну вторинну імунну відповідь латентно інфікованих тварин. Установлено, що введення сенсибілізованим тваринам R-бруцеліну не тільки підвищувало титри протибруцелаовісних антитіл, але й стимулювало параспецифічну імунну відповідь, що проявлялося підвищенням титрів антитіл на антигени хламідій.

**З’ясування причин виявлення перехресних серологічних реакцій при дослідженнях із застосуванням бруцелаовісних і хламідійних антигенів.** Нами проведено вивчення перехресних реакцій із застосуванням серологічних тест-систем в РА, РЗК та ІФА. В дослідах було використано специфічні бруцелаовісні та хламідійні антигени комерційного виробництва, які досліджували в перехресних реакціях із гомологічними й гетерологічними комерційними сироватками (хламідійними й бруцелаовісними) овець та гіперімунними сироватками кролів з установленням граничного титру сироваток й антигенів, а також із моноклональними протихламідійними антитілами. За результатами досліджень встановлено, що в РА стандартний R-бруцелаовісний антиген (НВО “Рівес”, Росія) аглютинувався бруцелаовісною сироваткою розведеною 1:80. У той же час, спостерігали позитивну реакцію аглютинації і з комерційною хламідійної сироваткою, але в значно нижчих титрах – 1:20. Аналогічний результат отримано і при дослідженні бруцелаовісного антигена ІЕКВМ для РА. Титри бруцелаовісної сироватки в РА з цим антигеном сягали 1:640, тоді як хламідійної сироватки – 1:10. В РЗК тільки в одному випадку зареєстровано неспецифічну реакцію, коли позитивна бруцелаовісна сироватка реагувала з хламідійним антигеном у розведені 1:10 ++. При дослідженні гіперімунних бруцелаовісних сироваток кролів в РЗК із хламідійним антигеном перехресних реакцій не виявлено (табл. 1).

Дослідження комерційних хламідійних антигенів (серії 6 і 3) у хламідійні тест-системі ІФА виявило позитивні результати: оптична щільність (ОЩ) становила від 0,998 (серія 6) до 1,287 (серія 3) одиниць при довжині хвилі 490 нм. В РЗК із позитивною хламідійної сироваткою ці антигени мали граничні титри розведені 1:256 та 1:64 відповідно. При дослідженні бруцелаовісних антигенів для РА та РТЗК у хламідійній тест-системі ІФА було одержано негативні результати. Оптична щільність з корпускулярним антигеном становила 0,057 одиниць, а з розчинним 0,045 одиниць, тобто не перевищувала значення показника KP/CUT-OFF.

**Таблиця 1**

**Результати дослідження антигенів B.оvis та Chl.psittaci в перехресних серологічних тест-системах РА, РЗК, ІФА**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Антигени | Граничні титри сироваток (log2) | | | | | | ІФА з моно-клональни-ми проти-хламідійни-ми антиті-лами |
| РА | | | РЗК | | |
| бруцела-овісна сироват-ка (овеча) | хламіді-йна си-роватка (овеча) | бруцела-овісна сироват-ка (кроля) | бруцела-овісна сироват-ка (овеча) | хламіді-йна си-роватка (овеча) | бруцела-овісна сироват-ка (кроля) |
| R-бруцелаовісний кольоровий для РА (НВО “Рівес”) | 1:80 (6,322) | 1:20 (4,322) | 1:40 (5,322) | × | × | × | × |
| R-бруцелаовіс-ний для РА (ІЕКВМ) | 1:640 (9,322) | 1:10 (3,322) | 1:40 (5,322) | × | × | × | 0,057 (нег.) |
| Rбруцелаовісний розчинний для РТЗК (ІЕКВМ) | × | × | × | 1:40 (5,322) | нег. | 1:80 (6,322) | 0,045 (нег.) |
| Хламідійний для РЗК (Херсонська біофабрика) | × | × | × | 1:10 (3,322) | 1:80 (6,322) | нег. | 0,998-1,287 (поз.) |

Примітка: “×” - не досліджували; “нег.”– негативно, “поз.”– позитивно.

Таким чином, при дослідженні антигенів B.ovis та Chl.psittaci в ІФА з використанням моноклональних антитіл та в РЗК з гіперімунними сироватками кролів не виявлено антигенної спорідненості поміж збудниками інфекційного епідидиміту баранів та хламідіозу. Установлені в наших дослідженнях перехресні реакції у РА і РЗК можливо пов’язані з наявністю в сироватках крові овець антитіл проти антигенів обох збудників, що обов’язково треба враховувати при відборі тварин для виготовлення діагностичних сироваток.

**Дослідження мінливості культурально-морфологічних та антигенних властивостей штамів Brucella ovis.** Нами було досліджено культурально-морфологічні та антигенні властивості 15 штамів B.ovis які тривалий час (більше 10 років) пересівались з інтервалом 1,5–2 місяці в лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби ІЕКВМ на щільних живильних середовищах (МППГГА) з 10 % сироватки великої рогатої худоби в середовищі та без сироватки) і зберігались при 6±2 °C. Дослідження штамів проводили за наступними показниками: характер росту на рідких та щільних бруцельозних середовищах, морфо-тинкторіальні властивості колоній 3–4 добових агарових культур на чашках Петрі за модифікованою П.М. Жованіком (1975) методикою у нефарбованому та пофарбованому за методом Уайт-Вілсона вигляді, морфо-тинкторіальні властивості бактеріальних клітин, ріст культур на середовищах з основним фуксином та тіоніном, трипафлавінова проба, термоаглютинація суспензії бруцел, продукція сірководню, аглютинація зі стандартними R- та S- бруцельозними сироватками.

Результати наших досліджень свідчать, що 8 з 15 штамів відповідали характеристикам типових штамів B.ovis у R-формі: через 48-72 години на МППГГБ спостерігали слабку опалесценцію з утворенням осаду, на МППГГА – дрібні напівпрозорі колонії або легке нашарування, на чашках Петрі 3-4-х добові культури мали вигляд дрібних, напівпрозорих колоній, сіро-блакитного кольору, при забарвленні за Уайт-Вілсоном такі колонії набували синього або синьо-фіолетового кольору, при висіві на НРА з аніліновими фарбами штами росли на середовищі з тіоніном та не росли з фуксином, добре аглютинувались розчином трипафлавіну та були позитивні в реакції термоаглютинації. В РА зазначені штами аглютинувались R-бруцельозною сироваткою та не аглютинувались S-сироваткою.

Серед досліджених штамів було виявлено сім, які відрізнялись за своїми властивостями від типових R-форм. Вони характеризувались неоднорідністю колоній: поряд із сіро-блакитними, виявляли колонії сіро-жовтого кольору в прохідному світлі, які за Уайт-Вілсоном забарвлювались у синьо-фіолетовий та червоно-фіолетовий кольори відповідно. На відміну від типових, такі штами добре росли на середовищах не тільки з тіоніном, а і з фуксином, три з них набували властивості утворювати сірководень. Зазначені штами аглютинувались розчином трипафлавіну та були позитивні у реакції термоаглютинації. У пластинчатій РА атипові культури аглютинувались як R-, так і S-бруцельозними сироватками. Указані дані свідчили про те, що в процесі довгострокового культивування й зберігання зазначені штами дисоціювали у напрямку RS-форми.

Дослідженнями культурально-морфологічних та антигенних властивостей штамів B.ovis в залежності від умов культивування встановлено, що адаптація штамів до умов культивування без підвищеної концентрації СО2 та без сироватки ВРХ у середовищі, суттєво не впливала на стабільність штамів. Серед адаптованих і неадаптованих культур виявили як типові, так і дисоційовані штами.

Враховуючи те, що біоматеріал від хворих тварин може бути одночасно інфікованим бруцелами і хламідіями, з метою визначення морфо-тинкторіальної характеристики для диференціації зазначених збудників нами проведено дослід, в якому 7-добовим курячим ембріонам (КЕ) в жовтковий міхур вводили суспензію живих бактерій вакцинного штаму B.ovis 67/Б в дозах від 102 до 1010 м.к. Загибель ембріонів спостерігали з 4 доби після зараження. LD50 за методом Ріда й Менча становило 108,77 м.к./0,2 см3, що свідчило про відсутність вірулентних властивостей у вакцинного штаму. При проведенні мікроскопії мазків-відбитків із жовткових міхурів інфікованих КЕ пофарбованих за Стемпом і Романовським-Гімза виявлено два морфологічні типи бактерій: дрібні кокобактерії, за морфологією, розмірами та фарбуванням дещо схожі на елементарні тільця хламідій, та великі, розташовані поодиноко, подібні до B.ovis. З усіх заражених ембріонів реізольовано культуру B.ovis. Зазначені дані свідчили про складність проведення диференціації зазначених збудників на підставі мікроскопії мазків-відбитків із біоматеріалу.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено, що з 15 штамів B.ovis при пересівах на твердих живильних середовищах та зберіганні при 6±2 °С сім (46,7 %) дисоціювало з R- форми у напрямку RS- форми, що супроводжувалось зміною культурально-морфологічних й антигенних властивостей. У дисоційованих штамів відбувалась супресія R-бруцелаовісного антигену та експресія S-бруцельозного антигену. Проте у типових і дисоційованих штамів B.ovis стабільно зберігався R-антиген, загальний для різних видів роду Brucella – родовий R-бруцельозний антиген. Додатковими ознаками при селекції штамів B.ovis в типовій R-формі було те, що вони не росли на середовищі з основним фуксином у концентрації 1:50000, редукували сечовину та аглютинувались видовою R-бруцелаовісною сироваткою.

**Вивчення родо- та видоспецифічних антигенних властивостей штамів Brucella ovis та виготовлення діагностичних сироваток.** Родо- та видоспецифічні антигенні властивості штамів B.ovis визначали в пластинчатій РА з бруцельозними S- та R- сироватками, а також дослідженням водорозчинного та корпускулярного антигенів і живих культур бруцел з гіперімунними сироватками у серологічних реакціях з визначенням граничних титрів. При дослідженні живих культур з антисироватками було встановлено, що сироватка, яку одержано на бактерини з штаму B.ovis 76/982 аглютинувала всі культури B.ovis в R- та RS- формах. На відміну, із сироватками, які одержано на штами 67/Б та 156/7807 дисоційовані культури B.ovis виявляли аглютинацію в низьких титрах (нерозведена або 1:5), а типові штами аглютинували до розведення сироваток 1:20 – 1:40. Таким чином, проведені дослідження дали підставу вважати, що штами, на які одержано сироватки мали різну активність видових і родових антигенів, що зумовило різну специфічність сироваток. Тобто, штам B.ovis 67/Б характеризувався високою активністю видових бруцелаовісних R-антигенів, а штам 76/982, відповідно, родового бруцельозного R-антигену (табл. 2).

**Таблиця 2**

**Результати дослідження антигенних властивостей штамів B.ovis**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Штами | Граничні титри (M±m log2) із сироватками одержаними на бактерини з: | |
| штаму 67/Б | Штаму 76/982 |
| Brucella ovis (R-форма) – 8 штамів | 1:20 – 1:40  (5,07±0,3) | 1:20 – 1:40  (4,7±0,2) |
| Brucella ovis (RS-форма) – 7 штамів | 1:5 – 1:10  (2,8±0,3) | 1:5 – 1:20  (3,32±0,4) |
| Brucella abortus (RS-форма) – 3 штами | 1:5 – 1:10  (2,82±0,7) | 1:5 – 1:10  (1,7±1,1) |
| Brucella melitensis (RS-форма) – 1 штам | н/р  (–) | 1:20 – 1:40  (4,3±1,4) |
| Brucella suis (RS-форма) – 1 штам | –  (–) | 1:20 – 1:40  (4,3±1,4) |

Примітка: н/р – нерозведена сироватка

Нами виявлено різницю в антигенних взаємовідносинах штамів B.ovis із дисоційованими культурами бруцел інших видів, зокрема, B.abortus, B.melitensis, B.suis. Сироватка, яку одержано на штам B.ovis 67/Б, аглютинувала всі досліджені культури B.ovis і два штами B.abortus в RS-формі. Що стосується штаму B.melitensis Rev 1-a в RS-формі, то аглютинацію спостерігали лише з нерозведеною сироваткою, а з штамом B.suis 172/112 (RS-форма) реакція була негативною. Сироватки, які було одержано на шт. B.ovis 76/982 в типовій R- формі, крім штамів B.ovis в розведенні 1:5–1:20 аглютинували всі дисоційовані RS- штами B.abortus, B.melitensis і B.suis. Проте, виявилося, що дисоційовані штами B.abortus ця сироватка не аглютинувала починаючи з розведення 1:20, а штами B.melitensis Rev 1a і B.suis 172/112 аглютинувала в розведені до 1:40 ++. Одержані дані свідчили про те, що штам B.ovis 67/Б мав більшу антигенну спорідненість до RS- форм B.abortus, а штам 76/982 антигенно ближчий до RS- форм B.melitensis і B.suis, що, можливо, пояснюється наявністю двох напрямків в еволюції B.ovis. Ці штами нами віднесено до різних груп, які умовно визначені як R-a (R-abortus) та R-m (R-melitensis).

На підставі результатів дослідження видових і родових антигенних властивостей штамів B.ovis, нами було розроблено способи одержання видових бруцелаовісних і родових бруцельозних аглютинуючих R-сироваток. Для виготовлення сироваток застосовували штами B.ovis 67/Б та 76/982, які мали різну активність видових і родових антигенів. Імунізацію кролів проводили кожним штамом окремо за двома схемами: внутрішньовенно бактерином інактивованим формаліном і підшкірно термоінактивованим корпускулярним бактерином. Дослідженням сироваток у РА з живими культурами бруцел установлено, що сироватка, яку одержано у спосіб імунізації кролів формолбактерином із штаму 67/Б, починаючи з розведення 1:10 аглютинувала тільки культури B.ovis в типовій R-формі. Сироватки, які одержано на бактерини зі штаму 76/982, не залежно від способу імунізації, аглютинували всі R- та RS- форми культур B.ovis, а також дисоційовані культури B.abortus, B.melitensis, B.suis. Зазначені способи одержання сироваток захищені патентами України. Штами 67/Б і 76/982 депоновано як виробничі у ДНКІБШМ для виготовлення діагностичних сироваток й антигенів.

Результати вивчення антигенних властивостей штамів B.ovis та способів одержання сироваток, нами було використано при виготовленні дослідно-виробничої серії “Набору компонентів для серологічної диференціації культур бруцел”, що призначений для серологічної диференціації живих культур бруцел у пластинчатій реакції аглютинації. Діагностична цінність набору полягає в можливості проведення більш точної диференціації R-культур бруцел, зокрема, B.ovis. Це досягається тим, що набір, поряд із S- та R- бруцельозними сироватками, вміщує видову R- бруцелаовісну сироватку, що дозволяє виявляти культури збудника ІЕ баранів B.ovis у типовій R- формі. Принциповою відмінністю набору є те, що для виготовлення R-сироваток у зазначеному наборі використовуються штами Brucella ovis із високими родовими бруцельозними (штам 76/982) або видовими бруцелаовісними (штам 67/Б) антигенними властивостями у спосіб імунізації кролів інактивованими бактеринами. Разом із тим, контрольний бруцельозний R-антиген запропоновано виготовляти зі стабільних R-штамів B.ovis. Зазначені способи виготовлення сироваток і антигенів застосовано вперше.

За розробленими методиками було виготовлено дослідно-виробничу серію Набору компонентів для серологічної диференціації культур бруцел (10 наборів) і проведено комісійне випробування, яке підтвердило специфічність, активність та діагностичну цінність набору. На підставі випробувань було розроблено нормативну документацію на виготовлення, контроль та застосування набору (ТУ У 24.4–00497087–654–2002, Інструкція на виготовлення та контроль та Настанова по застосуванню), яку затверджено Державним департаментом ветеринарної медицини Мінагрополітики України від 22 квітня 2002 р. за № 15-14/125. Налагоджено виробництво набору в ДП “Ветеринарна медицина” згідно держзамовлення. Набір використовується в практиці державних лабораторій ветеринарної медицини.

Висновки

1. Результати серологічного моніторингу п’яти племінних вівцегосподарств із низьким рівнем відтворення у період 1999–2002 років свідчать про циркуляцію серед поголів’я збудників інфекційного епідидиміту баранів та хламідіозу. Стаціонарність і латентний перебіг хвороб були обумовлені не тільки біологією збудників, а й недодержанням технологічних вимог щодо відокремленого утримання різних статево-вікових груп та повноти проведення діагностичних і протиепізоотичних заходів. Серед досліджених штамів збудника ІЕ баранів B.ovis встановлено гетерогенність щодо родового бруцельозного і видового бруцелаовісного R-антигенів, визначено і задепоновано виробничі штами, розроблено нормативну документацію на виготовлення, контроль та застосування набору компонентів для серологічної диференціації бруцел.
2. Щорічне виділення 1,8–6,4 % тварин серопозитивних на інфекційний епідидиміт, 8–19 % тварин серопозитивних на хламідіоз та від 1,9 до 3,7 % тварин позитивно реагуючих одночасно на ІЕ і хламідіоз, а також низький рівень відтворення поголів’я, який становив, у середньому по отарах, від 40,7 до 62,7 %, свідчили про стаціонарне неблагополуччя вівцегосподарств № 1 і № 2 на бруцелаовісну й хламідійну інфекції. Установлена тенденція залежності високого рівня серопозитивності на бруцелаовісну та хламідійну інфекції й зниження виходу ягнят в окітний сезон наступного року.
3. Спонтанний спалах бруцелаовісної інфекції у д/г “А”, д/г “М” і д/г “Т” влітку 2002 року характеризувався високим рівнем серопозитивності баранів репродуктивного віку (2–5 років), який сягав від 68,6 до 71,4  %. При проведенні бактеріологічних досліджень від одного барана було ізольовано культуру, яку за культурально-морфологічними та антигенними властивостями типовано нами як B.ovis.
4. У лабораторних умовах на групі 20 клінічно здорових ягнят у 5-ти місячному віці виявлено серопозитивність на бруцелаовісну й хламідійну інфекції у 25 % тварин, що свідчило про латентний перебіг ІЕ баранів і хламідіозу. Введення бруцеліну ВІЕВ тваринам, серед яких виявляли серопозитивність на ІЕ баранів і хламідіоз, викликало активацію імунної відповіді, що супроводжувалось появою та підвищенням при дослідженні через 14 діб титрів антитіл у 92,9 % тварин не тільки на ІЕ баранів, а й на хламідіоз. Протягом наступних 2–3 місяців, спостерігали зниження, а у деяких тварин повне зникнення серопозитивності на антигени обох збудників.
5. При дослідженні бруцелаовісних та хламідійних гіперімунних сироваток кролів в перехресних імунологічних тест-системах (РА, РЗК) та антигенів в ІФА з моноклональними протихламідійними антитілами не виявлено антигенної спорідненості поміж збудниками інфекційного епідидиміту баранів і хламідіозу.
6. При тривалому зберіганні 15 штамів B.ovis на щільних живильних середовищах у 46,7 % виявлено дисоціацію у напрямку RS-форми незалежно від умов культивування. Характерною відмінністю культуральних властивостей стабільних штамів B.ovis від дисоційованих було те, що вони не росли на напіврідкому агарі з основним фуксином 1:50000, редукували сечовину та аглютинувались видовою бруцелаовісною R-сироваткою.
7. Селекційоновано стабільні штами B.ovis з високою активністю видових бруцелаовісних (штами 67/Б, 156/7807) та родових бруцельозних (штам 76/982) R-антигенів. При дисоціації штамів відбувалась супресія видового бруцелаовісного R-антигену й експресія родового бруцельозного S-антигену. У стабільних і дисоційованих штамів B.ovis зберігався родовий бруцельозний R-антиген, загальний для різних видів бруцел, B.abortus, B.melitensis, B.suis, B.ovis, в R- та RS-формах.
8. Серед культур B.ovis виявлено два штами, які мали різну антигенну спорідненість до інших видів бруцел за родовим бруцельозним R-антигеном. Штам B.ovis 67/Б виявив більшу спорідненість до RS- форм B.abortus – група R-a (R-abortus), а штам B.ovis 76/982 антигенно ближчий до RS- форм B.melitensis і B.suis – група R-m (R-melitensis).
9. Розроблено способи одержання видоспецифічної бруцелаовісної аглютинуючої R-сироватки, за допомогою якої виявляли тільки типові штами збудника інфекційного епідидиміту баранів B.ovis в R-формі (патент UA, № 49257 А), та родоспецифічної бруцельозної аглютинуючої R-сироватки, яка аглютинувала типові та дисоційовані штами B.ovis, а також штами B.abortus, B.melitensis та B.suis в R- та RS- формах (патент UA, № 53910 А).

## Перелік наукових робіт, опублікованих за темою дисертації

1. Меліхов С.В. Спектр імунної відповіді кролів на введення живих або інактивованих бактеринів Brucella ovis // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 1999.– Вип. 76.– С. 38 – 40.
2. Мелихов С.В. Изучение ассоциативной хламидиозной и бруцеллаовисной инфекции в племенных хозяйствах // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2000.– Вип. 77.– С. 259 – 264.
3. Мелихов С.В., Бабкин А.Ф. Влияние некоторых факторов на динамику иммунного ответа при латентном течении ассоциированной бруцеллаовисной и хламидийной инфекции // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2000.– Т. 1, Вип. 78.– С. 211 – 219.

Дисертант безпосередньо проводив серологічні дослідження, визначення імунного статусу тварин, аналіз та узагальнення даних.

1. Бабкин А.Ф., Галищев Н.И., Мелихов С.В. Серологическая идентификация культур возбудителя инфекционного эпидидимита баранов – Brucella ovis // Пробл. зооінженерії та вет. медицини: Матеріали 5-го з’їзду паразитоценологів України (м. Харків, 5 – 6 квітня 2001 р.): Зб. наук. праць / ХЗВІ.– Х., 2001.– С. 68 – 69.

Дисертант приймав участь у розробці, випробуванні та впровадженні набору для серологічної ідентифікації збудника.

1. Меліхов С.В. Вивчення антигенної спорідненості Brucella ovis та Chlamydia psittaci в серологічних реакціях // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2001.– Т.2, Вип. 79.– С. 50 – 54.
2. Бабкин А.Ф., Мелихов С.В., Галищев Н.И. Изменчивость штаммов Brucella ovis. Родовая и видовая антигенная специфичность // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2002.– Вип. 80: 80 років ІЕКВМ.– С. 38 – 42.

Дисертантом досліджено мінливість біологічних та антигенних властивостей штамів B.ovis, визначено родову та видову антигенну активність штамів.

1. Бабкин А.Ф., Мелихов С.В. RS-формы бруцелл как индикатор антигенной неоднородности штаммов возбудителя инфекционного эпидидимита баранов Brucella ovis // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2003.– Вип. 82.– С. 63 – 66.

Дисертантом визначено антигенну неоднорідність штамів B.ovis, встановлено антигенні взаємозв’язкі збудника інфекційного епідидиміту баранів з представниками інших видів роду Brucella.

1. Пат. 49257 А UA, МКІ 7 А61К39/10. Спосіб одержання видоспецифічної R-бруцелаовісної аглютинуючої сироватки: Пат. 49257 А UA, МКІ 7 А61К39/10/ А.Ф. Бабкін, М.Г. Галіщев, С.В. Меліхов; Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини.– № 2001106708; заявл. 01.10.2001; Опубл. 16.09.2002; Бюл. № 9.
2. Пат. 53910 А UA, МКІ 7 А61К39/10. Спосіб одержання родоспецифічної R-бруцелаовісної аглютинуючої сироватки: Пат. 53910 А UA, МКІ 7 А61К39/10/ А.Ф. Бабкін, М.Г. Галіщев, С.В. Меліхов, С.М. Орлов; Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини.– № 2002021484; заявл. 22.02.2002; Опубл. 17.02.2003; Бюл. № 2.

**Меліхов С.В. Мінливість, родова і видова антигенність Brucella ovis та серологічна діагностика бруцелаовісної і хламідійної інфекцій при змішаному перебігу.– Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія, Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини УААН, Харків, 2003.

В дисертації викладено результати дослідження мінливості культурально-морфологічних та антигенних властивостей штамів B.ovis, родової та видової антигенності збудника інфекційного епідидиміту баранів. Серед культур B.ovis визначено штами з високою активністю родових і видових R-антигенів. Визначено додаткові ознаки при селекції штамів. Розроблено способи одержання видової бруцелаовісної та родової бруцельозної R-сироваток із застосуванням штамів B.ovis. Розроблено й впроваджено в практику ветеринарних лабораторій “Набір компонентів для серологічної диференціації культур бруцел”.

Проведено серологічний моніторинг 5 вівцегосподарств щодо бруцелаовісної та хламідійної інфекцій. Виявлено тенденцію залежності виходу ягнят від рівня серопозитивності тварин. Визначено роль баранів-плідників репродуктивного віку у розповсюдженні збудників бруцелаовісної та хламідійної інфекцій та підтриманні епізоотичного процесу. Досліджено серологічний статус тварин при змішаному перебігу ІЕ баранів і хламідіозу.

Ключові слова: інфекційний епідидиміт баранів, хламідіоз, вівці, серологічна діагностика, індикація і диференціація збудника.

**Мелихов С.В. Изменчивость, родовая и видовая антигенность Brucella ovis и серологическая диагностика бруцеллаовисной и хламидийной инфекций при смешанном течении.– Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология, Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН, Харьков, 2003.

В диссертации изложены результаты исследования изменчивости культурально-морфологических и антигенных свойств штаммов B.ovis. Установлено, что при длительном культивировании B.ovis 46,7 % штаммов диссоциируют в сторону RS-форм независимо от условий культивирования. Характерными отличиями стабильных штаммов было то, что они не росли на НРА с фуксином (1:50000), редуцировали мочевину и агглютинировались R-бруцеллаовисной сывороткой, что необходимо учитывать при селекции штаммов. При диссоциации наблюдалась супрессия видового R-антигена и экспрессия бруцеллезного S-антигена. Установлено, что шаммы возбудителя инфекционного эпидидимита баранов – B.ovis, неоднородны по активности и специфичности видовых бруцеллаовисных и родовых бруцеллезных R-антигенов. Выявлены штаммы с высокой активностью видовых бруцеллаовисных (B.ovis 67/Б) и родовых бруцеллезных (B.ovis 76/982) R-антигенов. По аналогии с A- и M- антигенными детерминантами у культур бруцелл в S-форме, выявлена тенденция к распределению штаммов B.ovis на две группы: R-a (R-abortus), к которой антигенно ближе штамм B.ovis 67/Б, и R-m (R-melitensis), к которой относится штамм B.ovis 76/982. Разработаны и защищены патентами способы получения видовой бруцеллаовисной и родовой бруцеллезной R-сывороток с применением бактеринов из штаммов B.ovis. Разработан и внедрен в практику ветеринарных лабораторий “Набор компонентов для серологической дифференциации культур бруцелл”, позволяющий более точно проводить индикацию и типизацию культур бруцелл, в т.ч. возбудителя инфекционного эпидидимита баранов B.ovis.

Проведен серологический мониторинг 5 овцеводческих хозяйств относительно бруцеллаовисной и хламидийной инфекций. В двух хозяйствах установлено стационарное течение смешанной бруцеллаовисной и хламидийной инфекций, которое характеризовалось ежегодным выявлением серопозитивных животных и низким уровнем воспроизводства при отсутствии массовых абортов и ярко выраженного клинического проявления заболеваний. Выявлена тенденция зависимости выхода ягнят от уровня серопозитивности животных: высокий показатель серопозитивности среди группы баранов-производителей сопровождался снижением выхода ягнят в следующий окотный период. В трех овцеводческих хозяйствах проведен епизоотологический анализ спонтанной вспышки бруцеллаовисной инфекции, которая характеризовалась высоким уровнем серопозитивности животных. Во всех хозяйствах определена роль баранов-производителей репродуктивного возраста в распространении возбудителей бруцеллаовисной и хламидийной инфекций и поддержании эпизоотического процесса. Наиболее высокий уровень серопозитивности выявлен среди баранов в возрасте от 2 до 5 лет. Исследован серологический статус животных при смешанном течении латентных бруцеллаовисной и хламидийной инфекций. Установлено, что введение серопозитивным на ИЭ баранов и хламидиоз животным бруцеллина ВИЭВ сопровождалось появлением и повышением титров не только специфических бруцеллаовисных антител, но и гетероспецифических хламидиозных. В течение последующих 2–3 месяцев серопозитивность на антигены B.ovis и Chl.psittaci постепенно снижалась, а у некоторых животных исчезала. Исследованием антигенов B.ovis и Chl.psittaci в перекрестных иммунологических тест-системах (РА, РСК, ИФА) с применением гипериммунных сывороток и моноклональных антител антигенного родства между указанными возбудителями не установлено.

Ключевые слова: инфекционный эпидидимит баранов, хламидиоз, овцы серологическая диагностика, индикация и дифференциация возбудителя.

**Melikhov S.V. Brucella ovis changeability, genus-specific and species-specific antigenicity, and ovine epididymitis (Brucella ovis) and ovine chlamydiosis serological diagnostics at a mixed current. - The Manuscript.**

The dissertation for the Candidate's degree of the Veterinary Sciences on a speciality 16.00.03 - veterinary microbiology and virology, Institute of experimental and clinical veterinary medicine of UAAS, Kharkov, 2003.

The results of examination of variability of cultural, and morphological, and antigenic properties of B.ovis strains, genus-specific and species-specific antigenicity of an ovine epididymitis agent have been presented. Among the cultures of B.ovis the strains with high activity of the genus-specific and species-specific rough antigens are identified. The additional signs for selection of Brucella ovis strains have been discovered. The ways of obtaining species-specific (Brucella ovis) and genus-specific (Brucella spp.) R- serum’s with B.ovis strains application have been developed. The set of components for serological differentiating of Brucella cultures has been developed and put into practice in veterinary laboratories.

Serological monitoring of 5 breeding rams farms on both Brucella ovis-infection and ovine chlamydiosis has been conducted. The tendency of dependence of a yield of lambs from a level of animal’s positivity is detected. We have specified role of the rams of genesial age in spreading the agent of ovine epididymitis and chlamydiosis and maintaining of epizootic process. The serological status of animals at mixed Brucella ovis and chlamydiosis infections has been researched.

Keywords: ovine epididymitis (Brucella ovis), ovine chlamydiosis, sheep, serological diagnostics, indication and differentiating of the pathogen.

Підписано до друку 15.09.2003 р. Формат 60×90/16. Друк офсет. Папір офсет. Гарнітура Times NR Cyr. Умовн. друк. арк. 0,9. Тираж 100 прим.

Надруковано в АТЗТ “САММІТ-Харків”

Св-во ДК № 133 від 01.08.2000 р.

61023, м. Харків, вул. Мироносицька, 86. Тел. 142-620

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



