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

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР

“ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ”

# РУДЕНКО АНДРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 619:616.98:579.84:636.92(043)

**ПОШИРЕННЯ, БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЗБУДНИКА ТА УДОСКОНАЛЕННЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПАСТЕРЕЛЬОЗУ КРОЛИКІВ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата

 ветеринарних наук

Харків – 2007

Дисертацією є рукопис.



Робота виконана в Луганському національному аграрному університеті.

|  |  |
| --- | --- |
| **Науковий керівник** **Офіційні опоненти:** | доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент УААН, заслужений діяч науки і техніки України **Стегній Борис Тимофійович**, Національний науковий центр “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”, директор.доктор ветеринарних наук, професор **Білокінь Віктор Степанович**, Національний науковий центр “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”, головний науковий співробітник лабораторії біотехнології;доктор ветеринарних наук, **Кочмарський Віктор Андрійович**, Харківська державна зооветеринарна академія, професор кафедри епізоотології та ветеринарного менеджменту. |

Захист відбудеться “17” жовтня 2007 р. о 930 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.359.01 у Національному науковому центрі “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини” за адресою: 61023, м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного наукового центра “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини” за адресою: 61023, м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

Автореферат розісланий “11” вересня 2007 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

доктор ветеринарних наук, професор \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Бабкін А. Ф.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Кролівництво є однією з перспективних галузей приватного тваринництва. В Україні, зокрема в Луганській, Донецькій та Запорізькій областях, значного поширення набули дрібні та середні кролівницькі ферми з маточним поголів’ям від 10 до 100 кролематок. Більшість таких кролеферм не мають елементарного ветеринарного обслуговування, профілактичні заходи проводяться безсистемно або взагалі відсутні. Усе вищенаведене призводить до виникнення інфекційних хвороб, які переважно вражають органи шлунково-кишкового та респіраторного трактів кроликів і завдають значних економічних збитків власникам.

Багато дослідників вважають, що пневмоентерити кроликів спричиняються не одним, а асоціацією умовно патогенних мікроорганізмів (Prescott J. F., 1978; Наймитенко Є. П., Павлюк Я. С., 1980; Rai R. B. et al., 1985; Duclos P. et al., 1986; Кирилов А. К., 1997; Ajuvape A. T., Aregbesola E. A., 2001; Cooper S. C. et al. 2001; Gu Z. L. et. al., 2004; Martino P. A. et al., 2004). У бактеріальних паразитоценозах кроликів домінантне місце займає *Pasteurella multocida* (Webster L. T., Burn C., 1927; Пінчук В. А., Волколупова В. А., 1976; Рютова В. П., 1985; Deeb B. J. et. al., 1990; Шевченко А. А. та ін., 1995; Зубченко Т., 2002; Черекаев А. А. та ін., 2002; Ружуаускас М., Снарските А., 2004).

Дослідження в зазначеному напрямку в кролівницьких фермах південно-східного регіону України не проводились. Етіологія, патогенез, діагностика та профілактика пневмоентеритів у кроликів, спричинених пастерелами та асоціаціями умовно патогенних бактерій, залишаються недостатньо вивченими. Визначення мікробного ценозу в кролівницьких фермах та з’ясування ролі пастерел в асоціаціях умовно патогенних бактерій, які спричиняють масові пневмоентерити кроликів, є актуальним і сприятиме підвищенню ефективності лікувально-профілактичних заходів у кролівництві України.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Тема дисертації є частиною науково-дослідної роботи кафедри якості та безпеки продукції АПК Луганського національного аграрного університету, яка виконувалась згідно програми УААН “Вивчення інфекційної патології молодняка сільськогосподарських тварин і птиці і розробка ефективних заходів боротьби в господарствах південно-східної частини України” (0104U005403, 2003–2007 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою даної роботи є вивчення ролі *P. multocida* і бактеріальних асоціантів при пневмоентеритах кроликів та розробка засобів профілактики зазначених хвороб на основі протективних антигенів збудників.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі задачі:

* провести патентний пошук та вивчення літературних джерел щодо теми дисертації;
* провести аналіз епізоотичної ситуації щодо захворювань кроликів, спричинених умовно патогенними бактеріями в господарствах Луганської, Донецької та Запорізької областей;
* вивчити бактеріальний спектр збудників у паразитоценозах кроленят при респіраторних, шлунково-кишкових та змішаних захворюваннях і визначити етіологічне значення пастерел у зазначеній патології;
* вивчити біологічні властивості культур *P. multocida*, виділених від тварин в аматорських кролівницьких фермах (АКФ) південно-східного регіону України;
* вдосконалити метод виявлення кроликів-пастерелоносіїв;
* провести пошук стимуляторів росту *P. multocida* з метою накопичення бактеріальної біомаси для виготовлення вакцин;
* розробити доступний і ефективний спосіб інактивації пастерел та деяких асоціантів (стафілококів, ешерихій та бордетел) для виготовлення профілактичних препаратів;
* виготовити експериментальні зразки моно- і асоційованої вакцин проти пастерельозу і дослідити їх на стерильність, нешкодочинність та протективні властивості;
* визначити реактогенність, антигенність, імуногенність та гематологічні зміни в організмі тварин, щеплених виготовленими вакцинами;
* розробити нормативну документацію на виготовлення інактивованої вакцини проти пастерельозу кроликів.

**Об’єкт дослідження** – пастерельоз кроликів, ускладнений умовно патогенними бактеріями.

**Предмет дослідження** – ступінь поширення і роль пастерел та інших умовно патогенних бактерій при пневмоентеритах кроликів, біологічні властивості пастерел, засоби діагностики та профілактики пастерельозу.

**Методи досліджень.** Робота виконувалась із використанням методів бактеріологічних, серологічних, гематологічних, біохімічних, імунологічних досліджень та статистичного аналізу експериментальних даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше теоретично та експериментально обґрунтовано спосіб виявлення кроликів-пастерелоносіїв шляхом провокації проявлення клінічних ознак хвороби за модифікованим нами методом Н. И. Розанова, що передбачає додаткове введення кроликам дексаметазону. Розроблено і апробовано селективне поживне середовище з м'ясо-пептонного бульйону, біоактиваторів росту пастерел та анілінових барвників-інгібіторів росту кокової мікрофлори у концентрації кристалвіолету 1:54000, метилвіолету 1:64000 і бриліантгрюну 1:100000. За регресійною моделлю різних концентрацій досліджуваних стимуляторів росту (аутолізат дріжджів, дефібринована кров, сироватка крові та дріжджований аутолізат крові) визначено ефективність накопичення біомаси пастерел у середовищі з дріжджованим аутолізатом крові, що має переваги за простотою виготовлення, стерилізації та застосування.

Вивчено режими інактивації пастерел, стафілококів, ешерихій та бордетел за допомогою пероксиду водню з метою отримання активних протективних антигенів. Уперше вивчено вплив вакцин, виготовлених на основі протективних антигенів, інактивованих пероксидом водню культур бактерій, на зменшення захворюваності кролепоголів’я. У порівняльному аспекті досліджено імунокорегуючі властивості вакцин на гематологічні та імунологічні показники крові у щеплених проти пастерельозу тварин.

Наукова новизна виконаної роботи підтверджена деклараційними патентами на корисну модель (11612. Спосіб ізоляції пастерел від кролів-пастерелоносіїв, опубл. 16.01.2006 р.; 18446. Епізоотичний штам *Pasteurella multocida* серовару Д, опубл. 15.11.2006 р.; 21254. Епізоотичний штам *Pasteurella multocida* серовару А для виготовлення інактивованого бактерину проти інфекційних пневмоентеритів кролів, опубл. 15.03.2007 р.).

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено технологію виготовлення інактивованої вакцини проти пастерельозу кроликів із застосуванням епізоотичних штамів *Pasteurella multocida* сероварів А і Д та *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O111 і *Bordetella bronchiseptica*, що найбільш часто ускладнюють перебіг хвороби та спосіб їх інактивації за допомогою пероксиду водню, теоретичні положення яких підтверджено експериментальними даними в лабораторних і виробничих умовах.

За результатами проведених досліджень розроблено і запропоновано для практичного використання:

- нормативну документацію на інактивовану вакцину проти пастерельозу кроликів (ТУ У 24.4-00493669-002:2007, інструкція з виготовлення і контролю вакцини за показниками якості та листівка-вкладка щодо застосування препарату), яка затверджена Державним департаментом ветеринарної медицини МАП України 16 січня 2007 р.;

- настанову з діагностики пастерельозу тварин;

- методичні вказівки з діагностики та організації протиепізоотичних заходів при патологіях кроликів, які викликаються умовно патогенними бактеріями, та методичні рекомендації щодо одержання біомаси пастерел при стаціонарному та глибинному культивуванні, що затверджені науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини МАП України (протокол № 3 від 20.12.2006 р.).

 Для практичної ветеринарної медицини розроблено спосіб ізоляції пастерел від кролів-пастерелоносіїв та запропоновано епізоотичні штами *P. multocida* сероварів А і Д.

Основні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на факультетах ветеринарної медицини Національного аграрного університету України, Державного агроекологічного університету, Дніпропетровського державного аграрного університету, Луганського національного аграрного університету, Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького, Сумського національного аграрного університету, Харківської державної зооветеринарної академії.

**Особистий внесок здобувача.** Автором обґрунтовано науковий напрямок, визначена програма досліджень, проведено аналіз літературних даних, виробничі та лабораторні досліди, виконано статистичну обробку матеріалів, аналіз отриманих результатів та їх інтерпретацію, сформульовано висновки і практичні пропозиції. Імунологічні дослідження здійснено на базі лабораторії імунології при обласній педіатричній лікарні м. Луганська спільно з канд. мед. наук Т. В Ричковою. Гематологічні та біохімічні дослідження крові піддослідних тварин виконано на базі приватної ветеринарної клініки ТОВ “Мауглі” м. Луганська. Експериментальні серії інактивованих вакцин із культур умовно патогенних бактерій, що циркулюють у господарстві, виготовлено разом із співробітниками кафедри епізоотології, патанатомії та судової ветеринарії Луганського НАУ, а саме за участю завідувача кафедри, канд. вет. наук, доц. А. Ф. Руденка та асистента С. С. Кліменка.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації доповідалися і схвалені на звітних сесіях вченої ради, засіданнях методичної комісії факультету ветеринарної медицини Луганського НАУ (2005–2007 рр.); міжнародній науковій конференції “Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування” (м. Львів, 2005 р.); міжнародній науково-практичній конференції “Здобутки і перспективи розвитку ветеринарної медицини” (м. Суми, 2005 р.); міжнародній науковій конференції “Актуальные вопросы борьбы с инфекционными заболеваниями в гуманной и ветеринарной медицине” (м. Харків, 2005 р.); міжнародній науковій конференції “Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини” (м. Харків, 2006 р.).

**Публікації.** Основні положення дисертаційної роботи викладені в 13 наукових працях, 10 із них у статтях (6 одноосібних, 5 з яких – у фахових виданнях, затверджених ВАК України) і описах 3 деклараційних патентів на винахід.

**Обсяг і структура дисертації.** Основний зміст роботи викладений на 112 сторінках комп’ютерного друку. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів виконання роботи, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота ілюстрована 18 рисунками та 35 таблицями. Список використаних літературних джерел включає 363 найменування, в тому числі 251 зарубіжних авторів.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Робота виконана у період 2004–2007 рр. на кафедрі якості і безпеки продукції АПК Луганського національного аграрного університету. Окремі етапи досліджень проведено на базі приватної ветеринарної клініки ТОВ „Мауглі” м. Луганська, імунологічної лабораторії Луганської обласної дитячої лікарні та в 14 АКФ Луганської, Донецької та Запорізької областей.

Для бактеріологічного дослідження від загиблих або вимушено забитих кроликів робили висіви з селезінки, серця, легень, печінки, лімфатичних вузлів середостіння і брижі, слизової оболонки носової порожнини на м’ясо-пептонний агар (МПА), м’ясо-пептонний бульйон (МПБ), глюкозо-сироватковий бульйон та агар Сабуро. Після інкубації в термостаті за температури 37–38º С або за кімнатних умов (агар Сабуро) протягом 24–72 годин з колоній різного типу робили пересіви на МПА, середовище Ендо, кров’яний МПА та агар Борде-Жангу в чашках Петрі. Подальшу ідентифікацію виділених мікробів здійснювали з використанням загальноприйнятих методик досліджень відповідно до „Определителя бактерий Берджи” (1997).

Ізольовані культури бактерій вивчали за тинкторіальними, культурально-морфологічними, біохімічними, патогенними властивостями, а також за чутливістю до антибактеріальних препаратів (бензилпеніцилін, оксацилін, ампіцилін натрієвої солі, цефазолін, цефтриаксон, гентаміцин, амікацин, стрептоміцин сульфату, доксициклін, левоміцетин, пефлоксацин, ципрофлоксацин та енрофлоксацин).

Для порівняння ефективності антибактеріальних засобів розраховували мінімальні інгібуючі концентрації протимікробного препарату, що поширюються на 50 % (МІС50) та 90 % (МІС90)культур пастерел, за допомогою пробіт-аналізу (Gales A. C., 2005).

Визначення серогруп *Е. со1і* проводили за допомогою набору аглютинуючих О-колі-сироваток. Для серологічної типізації пастерел використовували референтні штами 12, 3 та 31 *P. multocida* серологічних типів А, Д і В, відповідно. Капсульні антигени (КАГ) та К-антисироватки отримували за методом Iordashe A. et. al. (1980), еритроцитарний діагностикум готували за Сидоровим М. А. із співавт. (1984). Постановку реакції непрямої гемаглютинації (РНГА) здійснювали за загальноприйнятим мікрометодом (Костенко Г. С., Родионова В. Б., Скородумов Д. И., 2001). Серовар А ідентифікували також за несерологічним методом з використанням гіалуронідази золотистого стафілококу, а пастерел сероваріанту Д за допомогою розчину трипафлавіну (1:500) (Сидоров М. А. та ін., 1995).

LD50 і ImD50 визначали на білих мишах і обраховували за формулою Кербера в модифікації И. П. Ашмарина (1962).

Інгібуючу дію анілінових барвників на *P. multocida* вивчали за допомогою методу двократного серійного розведення (1:500–1:1240000) з використанням бромтимолового синього, метилового блакитного, фуксину основного, бриліантгрюну, кристалічного фіолетового, метилового фіолетового, метилового оранжевого, метилового червоного, сафраніну та фенолового червоного в 2,0 см3 МПБ. Інгібуючі властивості різних барвників порівнювали за розрахованими середньогеометричними титрами.

При вдосконаленні поживного середовища для накопичення пастерел ріст визначали за кількістю мікробних клітин (м. к.) на кров’яному агарі і виражали у колоніїутворюючих одиницях (КУО). У рідких середовищах інтенсивність росту визначали за найбільш вірогідним числом (НВЧ) (Герхард Ф., 1983). В якості стимуляторів росту *P. multocida* нами використані аутолізат дріжджів, дефібринована кров, а також розроблений нами дріжджований аутолізат крові (ДАК).

Для провокації пастерельозу у кроликів-мікробоносіїв тваринам інтраназально інстилювали по 0,2 см3 0,5 %-ного водного розчину бриліантгрюну 1 раз на добу впродовж 3 діб (Розанов Н. И.,1955) і додатково проводили імуносупресію дексаметазоном (наша модифікація), який застосовували внутрішньо­м’язово в дозі 2 мг/кг живої маси 2 рази на добу протягом трьох діб.

В АКФ у порівняльному досліді на 246 кроликах віком 2–5 місяців випробувано дві серії вакцини, виготовленої за розробленою нами технологією. Препарати вводили кроликам підшкірно дворазово з інтервалом 14 діб у дозі 1,0 см3. За вакцинованими тваринами вели спостереження протягом 68 діб. Через 28 діб у них відбирали кров для гематологічних, серологічних та імунологічних досліджень.

Загальну кількість Т-лімфоцитів визначали за методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана (Е-РУК) (Jondell M. et al., 1972; Чередеев А. И., 1976). Вивчали теофілінчутливість (ТФЧ) та резистентність Т-клітин до дії теофіліну (ТФР) (Limatibul S. et. al., 1978). При цьому кількість теофілінчутливих Т-лімфоцитів визначали за різницею між числом теофілінрезистентних Т-клітин і загальним числом Т-лімфоцитів (Е-РУК). Імунорегуляторний індекс (ІРІ) розраховували за співвідношенням ТФР/ТФЧ. Число О-клітин підраховували за різницею суми кількості Т-лімфоцитів (Е-РУК) та В-лімфоцитів (ЕАС-РУК) від загальної кількості лімфоцитів. Визначення імуноглобулінів основних класів (A, M, G) у сироватці крові проводили за методом простої радіальної імунодифузії в гелі (Manchini G. et al., 1965), а загальний рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та їх фракційний склад за молекулярною масою (Digeon M. et. al., 1977).

Середньоарифметичну (М), середньогеометричне (Мгеом), середньоквадратичне відхилення (σ), середньоквадратичну помилку (m), достовірність середньоквадратичної помилки (Pm), достовірність різниці (P), пробіт-аналіз та регресійний аналіз обчислювали на портативному комп’ютері Acer TravelMate 2413NLM за допомогою програми Statіstіca 6.0 (Реброва О. Ю., 2002; Боровиков В. П., 2003).

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Роль *P. multocida* в етіології пневмоентеритів кроликів у господарствах південно-східної частини України.** Вивчення ролі *P. multocida* в етіології респіраторних та шлунково-кишкових захворювань кроликів проведено в фермерських господарствах Луганської (10), Донецької (2) та Запорізької (2) областей.

Епізоотологічними обстеженнями встановлено, що в усіх фермах кролівники-аматори заради отримання максимальної економічної вигоди не завжди проводять необхідні ветеринарно-санітарні заходи щодо профілактики пневмоентеритів. Майже в усіх АКФ для утримання кроликів використовують пристосовані приміщення, в яких раніше утримували тварин інших видів. Приміщення не відповідають зоогігієнічним нормативам щодо утримання кроликів (недостатня площа на одну голову, невідповідне сумісне утримання різних статево-вікових груп, недостатня вентиляція). В усіх крільчатниках відсутні санпропускники, приміщення для карантинування та лікування хворих тварин. У деяких АКФ до крільчатників мають доступ кури, качки, кішки та сторонні особи. Більшість господарств не мають елементарного ветеринарного обслуговування: профілактичні заходи несистемні або взагалі не проводяться, не з’ясовуються причини інфекційних захворювань, застосовуються антибактеріальні засоби без визначення чутливості збудників і в занижених дозах.

Вищезазначене свідчить про те, що в господарствах відсутні умови для забезпечення розриву ланок епізоотичного ланцюга, внаслідок чого відбувається накопичення та підвищення вірулентності умовно патогенних бактерій, спроможних викликати різноманітні патології у кроликів.

При бактеріологічних дослідженнях 226 трупів кроленят було виділено 863 культури 14 видів умовно патогенних бактерій. Частіше за все ізолювали *P. multocida* (34,1 %), *S. aureus* (23,6 %), *E. coli* (13,8 %) та *Staphylococcus epidermidis* (7,5 %); менш розповсюдженими виявилися *B. bronchiseptica* (4,2 %), *Streptococcus pyogenes* (3,8 %), *Klebsiella pneumoniae* (3,8 %), *Streptococcus* *pneumoniae* (2,7 %), *Staphylococcus* *saprophyticus* (2,3 %), *Pseudomonas aeruginosa* (2,1 %) і зовсім рідко виділялися бактерії інших видів: *Proteus vulgaris*, *Streptococcus* *faecalis*, *Proteus* *mirabilis* та *Micrococcus luteus* (2,1 %).

В обстежених господарствах кількість патогенів коливалась від 3 до 9. Найбільш широке розповсюдження в господарствах мали *P. multocida* та *E. coli* (в 12-ти), *S. aureus* (в 11-ти), менше – *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* (в 6-ти), *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* (в 5-ти), *P. vulgaris*, *B. bronchiseptica*, *S. pneumoniae* (в 4-ох), і рідко *P. mirabilis*, *S. faecalis* (в 2-ох) та *M. luteus* (в 1-ому з 14 АКФ).

При серологічній ідентифікації 119 ізолятів кишкової палички було визначено, що в кролівницьких господарствах південно-східної частини України частіше циркулюють серогрупи О111 (52,9 %), О78 (24,4 %) і О8 (16,0 %), а також О126 (6,7 %).

При визначенні кількісного складу бактеріального паразитоценозу в кроликів, хворих на респіраторні, кишкові захворювання та пневмоентерити, встановлено, що асоціації умовно патогенних бактерій складаються з 2 – 3 співчленів. В якісному відношенні було виділено 21 варіант асоціацій умовно патогенних бактерій, з яких частіше всього зустрічалися: *P. multocida + S. aureus* (20,9 %), *P. multocida + S. epidermidis* (19,2 %), *P. multocida + E. coli* (11,8 %), *E. coli + S. aureus* (10,5 %), *S. aureus + S. epidermidis* (7,8 %), *P. multocida + S. pneumoniae* (6,9 %) та *P. multocida + B. bronchiseptica* (5,0%); рідше – *P. multocida + B. bronchiseptica + S. aureus* (3,2 %), *S. aureus + S. pyogenes* (2,3 %), *P. multocida + E. coli + S. aureus* (2,7 %), *E. coli + S. pyogenes* (1,4 %), *P. multocida + K. pneumoniae* (1,4 %), *E. coli + S. saprophyticus* (0,9 %), *S. aureus + M. luteus* (0,9 %), *E. coli + B. bronchiseptica* (0,9%), *P. multocida + S. saprophyticus* (0,9 %), *P. multocida + S. pyogenes* (0,9 %), *B. bronchiseptica + S. aureus* (0,9 %), *B. bronchiseptica + S. epidermidis* (0,5%), *K. pneumoniae + S. epidermidis* (0,5%) та *S. pneumoniae + S. saprophyticus* (0,5 %).

**Біологічні властивості культур *P. multocida*, ізольованих від хворих і загиблих кроликів**. Усі ізоляти *P. multocida* за культуральними та морфологічними властивостями не відрізнялись між собою. При мікроскопії бактерії розташовувались ізольовано, рідше парами та короткими ланцюжками. У мазках із патологічного матеріалу та свіжовиділених агарових культур, фарбованих за Міхиним, пастерели завжди мали біполярність. При фарбуванні тушшю за методом Буррі-Гінса більшість свіжовиділених ізолятів (79,6 %) мали капсулу.

У МПБ всі культури пастерел протягом першої доби викликали рівномірне помутніння середовища та незначний слизовий осад на дні пробірки. На МПА через 18–24 годин спостерігали ріст дрібних напівпрозорих, росинчастих, злегка блакитнуватих округлих колоній, із рівними краями та гладенькою блискучою опуклою поверхнею. При боковому освітленні такі колонії мали своєрідне світіння – „флуоресценцію”. Усі культури пастерел у м’ясо-пептонному напіврідкому агарі росли чітко за уколом голки. В сироватковому та кров’яному агарі епізоотичні культури пастерел давали більш пишний та соковитий ріст, ніж на простому МПА. Ні один з отриманих ізолятів не викликав гемолізу в 5 %-му кров’яному агарі.

За характером росту на твердих поживних середовищах виявили 3 типи колоній культур *P. multocida*, а саме: S- 129 (43,9 %), M- 141 (47,9 %) та R-форми 24 (8,2 %). В окремих АКФ кількість пастерел S-форм коливалась від 0,0 до 10,9 %; M-форм – від 0,0 до 18,7 % та R-форм – від 0,0 до 2,0 %.

За біохімічними властивостями виділені культури пастерел також варіювали. Усі культури володіли каталазною властивістю та ферментували сорбіт, часто ферментували глюкозу (96,3 %), сахарозу (93,5 %), манозу (88,4 %), утворювали сірководень (99,7 %), індол (94,9 %) орнітиндекарбоксилазу (92,2 %); рідше розщеплювали мальтозу (54,1 %); рідко маніт (23,8 %); дуже рідко лактозу (2,4 %), дульцит (0,3 %); зовсім не утворювали лізиндекарбоксилазу, β-галактозидазу, ацетилметилкарбінол; не утилізували цитрат та малонат натрію.

За допомогою РНГА 173 культури (58,8 %) було віднесено до серовару А, 98 (33,4 %) – до серовару D. У 23 ізолятів (7,8 %) не встановлено сероваріантної належності. У 10 господарствах (83,3 %) ізольовано культури пастерел сероварів А та D і не виявлено жодного ізоляту *P. multocida* серовару В. При несерологічному типуванні пастерел 173 культури (58,8 %) були позитивними в стафілококовому тесті, а 121 (41,2 %) – утворювали флокулят у трипафлавіновій пробі.

За патогенними властивостями культури пастерел суттєво відрізнялись між собою: ізоляти із внутрішніх органів хворих кроликів викликали загибель 64,1 % мишей, і навпаки культури з носової порожнини були патогенними тільки для 29,9 % мишей.

Отримані ізоляти пастерел були найбільш чутливими до цефтриаксону, амікацину, ципрофлоксацину, цефазоліну та пефлоксацину. Середню антибактеріальну активність відносно пастерел показали оксацилін, ампіцилін, левоміцетин та енрофлоксацин, найменшу – стрептоміцин, доксициклін, гентаміцин та бензилпеніцилін.

**Удосконалення діагностики *P.multocida*-інфекції кроликів.** Для виявлення джерел *P.multocida*-інфекції кроликів нами було поставлено завдання удосконалити методику індикації та вивчити перебіг прихованої інфекції у кроликів-пастерелоносіїв.

У досліді використано 11 кроликів-пастерелоносіїв. У 5 голів провокацію захворювання проводили за методом Н. И. Розанова (перша група), у 6 голів – за цим методом у нашій модифікації (друга група). Чотири здорових тварини було взято в якості контролю (третя група).

Установлено, що у тварин-бактеріоносіїв у порівнянні з контрольними відбуваються зміни в загально-клінічному стані, які маніфестуються помірною тахікардією, тахіпное та субфебрильним підвищенням ректальної температури тіла. У дослідній групі тварин, клінічний прояв пастерельозу в яких спровоковано за методом Н. И. Розанова, частота дихальних рухів (ЧДР), частота серцевих скорочень (ЧСС) та ректальна температура тіла до кінця терміну спостереження знизились до нормальних значень і в 3-х кроликів (60,0 %) зникли ознаки риніту та кон’юнктивіту. Проте, необхідно відмітити, що у тварин дослідної групи, провокацію в яких здійснювали за методом Н.И. Розанова в нашій модифікації, протягом усього періоду спостереження у всіх кроликів були виражені стійкі клінічні ознаки риніту. Через 24 години після введення дексаметазону в кроликів-пастерелоносіїв відзначено незначне підвищення ЧДР, ЧСС та достовірне підвищення температури тіла. На 48 годину досліду було встановлено подальше погіршення загального стану оброблених гормоном кроликів, що проявлялось більше вираженою тахікардією, тахіпное, лихоманкою. Після закінчення досліду (через 72 годин) 2 тварини (33,3 %) цієї групи загинули, а в кроликів, які вижили, показники ЧДР та ЧСС ще незначно збільшились, проте ректальна температура різко знизилась на 3,0 ºС.

Після закінчення досліду легені кроликів, які загинули під час проведення експерименту, а також еутаназованих під наркозом, піддали бактеріологічному дослідженню для ізоляції культур. Найбільш ефективним виявився метод виявлення кроликів-пастерелоносіїв за нашою модифікацією. Частота виділення пастерел у цих тварин у 5,0 разів перевищувала показник ізоляції аналогічних культур від кроликів, у яких інфекція була спровокована за класичним методом Н.И. Розанова.

Для прискорення постановки діагнозу проведено пошукові дослідження щодо вивчення ефективності в якості біостимуляторів дефібринованої крові великої рогатої худоби, аутолізату дріжджів, нормальної сироватки крові коней та запропонованого нами дріжджованого аутолізату крові.

Установлено, що досліджувані інгредієнти поживного середовища помітно впливають на ріст пастерел. Середнє число живих мікробних клітин *P. multocida* збільшується у відповідності з підвищенням концентрації стимулюючих біодобавок до МПБ. Максимальне накопичення пастерел відбувається відповідно при 15 %-ній концентрації аутолізату дріжджів, 10 %-ній дефібринованої крові, 15 %-ній сироватки крові та 15 %-ній ДАК. При подальшому збільшенні концентрації дріжджового аутолізату, дефібринованої крові та нормальної сироватки крові в МПБ кількість бактеріальних клітин, навпаки, зменшується. Використання 20 %-го ДАК у МПБ забезпечує накопичення бактеріальної маси *P. multocida* на тому ж рівні, що і при 15 %-ній концентрації цієї добавки.

Найбільш інтенсивно стимулювала ріст пастерел дефібринована кров. Кількість пастерел, які виросли в середовищі з цією добавкою, була в 8,4–11,6 рази більше, ніж у простому МПБ. Дещо менше поліпшували ріст мікробів сироватка крові (в 3,2–5,8 рази) і ДАК (в 3,8–5,4 рази) та найбільше слабко (в 1,3–2,2 рази) – аутолізат дріжджів.

Розраховану нами функціональну залежність числа бактеріальних клітин пастерел (y) від концентрації (x) аутолізату дріжджів (у1), дефібринованої крові (у2), сироватки крові (у3) і ДАК (у4) можна відповідно представити наступними рівняннями регресій: у1 = – 0,012.x2+ 0,264.x + 1,056; у2= – 0,064.х2+ 1,747.х + 1,483; у3= -0,016.х2+ 0,575.х + 1,083 та у4= - 0,026.х2 + 0,776.х + 1,375.

На моделі 14 видів культур умовно патогенних бактерій, які були виділені при шлунково-респіраторних захворюваннях кроликів в АКФ південно-східної частини України, вивчено інгібуючі властивості анілінових барвників на ріст бактерій у МПБ.

Найбільш чутливими до випробуваних барвників виявилися стрептококи (*S. pneumoniae*, *S. faecalis* та *S. pyogenes*), мікрококи (*M. luteus*) і стафілококи (*S. aureus*, *S. epidermidis* та *S. saprophyticus*). Ріст цих мікроорганізмів відбувався переважно при додаванні до живильного середовища фуксину основного (1,0–5,1×10-4), бриліантгрюну (1,0–9,2×10-5), кристалвіолету (5,1×10-4–1,2Ч10-6), метилвіолету (6,4×10-4–1,2Ч10-6). *P. multocida* мала практично однакову чутливість до барвників з іншими грамнегативними бактеріями.

**Удосконалення специфічної профілактики асоційованого перебігу пастерельозу кроликів.** Для встановлення ролі *P. multocida* в етіології пневмоентеритів кроликів нами також було використано імунобіологічний метод. Для цього виготовили і в порівняльному експерименті випробували одну дос­лідну серію вакцини з асоціації мікробів, а другу – з *P. multocida*, які були виділені у хворих на пневмоентерити кроликів.

При виготовленні антигенів для експериментальних серій вакцин було відібрано 5 культур мікроорганізмів: *P. multocida* сероварів A та D, *S. aureus*, *E. coli* О111 та *B. bronchiseptica*. Усі ізоляти були типовими для відповідного виду мікроорганізмів, із S-формою росту і мали досить високу вірулентність для білих мишей. Показники LD50 відібраних для досліду культур суттєво відрізнялись між собою: найвищу вірулентність мала культура *P. multocida* 127 серовару А (25,3 м. к.), нижчу – ізоляти *P. multocida* 99 серовару D (7,3.105 м. к.), *E. coli* 88 серогрупи О111 (2,4.106 м. к.), *B. bronchiseptica* 129 (3,6.106 м. к.), штам 115 *S. aureus* (4,6.107 м. к.).

Суттєвим у розробці інактивованих біопрепаратів є інактивація мікроорганізмів при збереженні їх імуногенних властивостей. Метою даного етапу досліджень було вивчення впливу різних концентрацій (0,06–1,00 %) пероксиду водню (ПВ), дімеру етиленіміну (ДЕІ) та формальдегіду (ФА) на життєздатність пастерел, стафілококів, ешерихій та бордетел.

Установлено, що інактивація мікробів за допомогою ФА протікає швидше, ніж при використанні ПВ та ДЕІ. Інактивація досліджуваних мікроорганізмів відбувалась у концентрації ПВ не нижче, ніж 0,5 %, а при вмісті його в концентрації 0,06 % в жодній із проб знешкодження бактерій не було відмічено. ДЕІ інактивував культури пастерел і стафілококів за 24 години в концентрації 0,25 %. Повна стерилізація цим інактиватором ешерихій та бордетел відбувалась у концентрації 1,0 % при експозиції 12 годин. ФА викликав загибель пастерел та бордетел у концентрації 0,125 % за 24 години. Для стафілококів та ешерихій цей інактиватор виявився ефективним лише в концентрації 0,25 % і при експозиції 24 години.

Ураховуючи біологічну неоднорідність збудників пневмоентеритів кроликів, наступним етапом наших досліджень було вивчення динаміки інактивації пастерел, стафілококів, ешерихій та бордетел за допомогою 0,5 % ПВ, 1,0 % ДЕІ та 0,25 % ФА.

Установлено, що в процесі інактивації культур мікроорганізмів щогодини відбувається зменшення числа живих мікробних клітин (ж. м. к.). При застосуванні 0,5 % розчину ПВ пов­на інактивація ізолятів *P. multocida*, *E. coli* та *B. bronchiseptica* здійснювалася через 6 годин, а культури *S. aureus* лише через 8 годин дії інактиватора. Повна інактивація культур пастерел, стафілококів 1,0 % розчином ДЕІ відбувалася за 8 годин, в той час як бактеріальна суспензія ешерихій та бордетел при зазначеній експозиції мала ще незначну кількість ж. м. к. При стерилізації досліджуваних культур за допомогою 0,25 %-ного розчину ФА повна інактивація культур відбувалася впродовж 6 годин. У той же час регламент стерилізації стафілококів, ешерихій та бордетел становив 8 годин.

У великих об’ємах бактеріальної суспензії, яка піддається інактивації, завжди існує ймовірність виживання деякої кількості бактеріальних клітин, виявити які загальноприйнятими методами неможливо. Виходячи з цього, пот­рібна теоретична оцінка процесу інактивації, яка б дозволила прогнозувати зниження числа життєздатних бактерій до допустимого рівня. При виробництві невеликих серій біопрепаратів часто інактивацію мікробів здійснюють у реакторах ємкістю 10 л, а рівень інактивації оцінюють за числом ж. м. к. в 1 см3. У цьому випадку рівень залишкової вірулентності матеріалу повинний бути менше 10-4 ж. м. к./см3, тобто логарифм життєздатних клітин становитиме ≤–4. Отримані цифрові значення дали нам можливість за допомогою регресійного аналізу виявити залежність логарифму життєздатності досліджуваних бактерій від тривалості інактивації. Установлено, що регресійний зв'язок близький до прямолінійного і його можна виразити рівнянням прямої лінії yx=a – b.x, де yx – lg ж. м. к.; x – тривалість інактивації, годин; a і b – коефіцієнти регресії (b – константа інактивації, год-1). Рівняння регресії виражають функціональний зв'язок між стерилізуючою активністю інактиваторів у вигляді динаміки НВЧ мікробів у часовій перспективі.

Необхідно відзначити, що функціональна залежність НВЧ клітин бактерій (y) від часу інактивації (x) *P. multocida* серовару А (у1), *P. multocida* серовару D (у2), *S. aureus* (у3), *E. coli* (у4) і *B. bronchiseptica* (у5) за допомогою 0,5 % ПВ можна відповідно представити наступними рівняннями регресій: у1= – 1,8.х + 9,9; у2= – 1,7.х + 9,2; у3= – 1,1.х + 7,7; у4= – 1,7.х+8,4 та у5 = –1,6.х + 8,4. Кінетика інактивації пастерел, стафілококів, ешерихій та бордетел при використанні 1 %-го ДЕІ може бути описана відповідними рівняннями, а саме: у1= – 1,3.х + 8,8; у2 = – 1,2.х + 8,4; у3= – 1,2.х + 8,4; у4= – 1,3.х + 8,9 та у5= – 1,2.х + 8,2. При стерилізації вказаних бактерій 0,25 %-ним ФА рівняння регресії відповідно мають вигляд: у1 = – 1,6.х + 8,0; у2 = – 1,6.х + 7,9; у3 = – 1,2.х + 7,9; у4 = – 1,2.х + 8,1 та у5 = – 1,3.х + 9,1.

Величина достовірності апроксимації (R2)кінетики інактивації досліджуваних бактерій відповідно дорівнювала 0,98; 0,92; 0,81; 0,82 та 0,86 при використанні в якості інактиванту 0,5 %-го ПВ, 0,91; 0,89; 0,88; 0,92; 0,86 при інактивації культур 1 %-ним ДЕІ і 0,81; 0,78; 0,83; 0,85 при стерилізації 0,25 %-ним ФА, що вказує на близькість значень теоретично розрахованих ліній регресій до фактичних експериментальних даних.

На підставі проведеного регресійного аналізу зроблено висновок, що безпечний поріг інактивації *P. multocida* серовару А, *P. multocida* серовару D, *S. aureus*, *E. coli* та *B. bronchiseptica* при застосуванні ПВ наступить відповідно через 7,7; 7,8; 10,6; 7,3 та 7,8 годин, а при використанні ДЕІ і ФА – через 9,9; 10,3; 10,3; 9,9; 10,2 та 7,5; 7,4; 9,9; 8,4; 10,3 годин.

Інактивовані антигени пастерел сероварів А і D, стафілококів, ешерихій та бордетел детально були перевірені на імуногенність (ImD50) та токсичність (LD50).

За тестом активного захисту мишей, установлено, що всі інактивовані антигени зберігали імуногенність. Проте, необхідно відмітити, що антигени з культур *P. multocida* серовару А, *P. multocida* серовару D, *S. aureus*, *E. coli* та *B. bronchiseptica*, які були інактивовані з використанням ДЕІ, мали найвищу імуногенну активність. Показники ImD50 відповідно становили 4,07×107; 6,17Ч107; 1,07Ч108; 6,18Ч107 та 3,56×107 м.к. Інактивовані за допомогою ПВ біопрепарати, що були виготовлені з асоціації цих мікроорганізмів, мали середню імуногенну активність, проте, вона була більш вираженою в порівнянні з аналогічними за складом антигенами, інактивованими за допомогою ФА. Так, для захисту 50 % мишей від зараження (4 LD50) вихідними культурами пастерел сероварів А і D, стафілококів та бордетел була відповідно необхідна в 6,9; 3,0; 2,3 та 1,3 рази менша доза інактивованих ПВ антигенів, ніж ФА. Що стосується імуногенності антигенів *E. coli*, виготовлених у різний спосіб, то треба відзначити, що інактивовані ФА антигени в 1,7, а інактивовані ДЕІ в 6,8 рази були більш активними порівняно з інактивованими ПВ.

Токсичність антигенів оцінювали за тестом летальності для мишей. Результати досліджень свідчать про істотно нижчу токсичність інактивованих ПВ антигенів у порівнянні з інактивованими за допомогою ДЕІ та ФА. Так, 50 % летальні дози для білих мишей антигенів, виготовлених шляхом стерилізації бактеріальної суспензії 0,5 %-ним розчином ПВ, були у 15,7 (*B. bronchiseptica*), 12,1 (*P. multocida* серовару D), 5,2 (*P. multocida* серовару А), 5,2 (*E. coli*) та 4,2 (*S. aureus*) рази вищими, ніж в аналогічних біопрепаратів, виготовлених за допомогою інактивації 1,0 %-ним розчином ДЕІ. Інактивовані ПВ антигени мали у 6,9 (*B. bronchiseptica*), 4,0 (*P. multocida* серовару D), 2,4 (*S. aureus*), 1,7 (*P. multocida* серовару А) та 1,6 (*E. coli*) рази меншу токсичність, ніж у відповідних біологічних препаратів, виготовлених шляхом інактивації 0,25 %-ним розчином ФА.

В аматорській кролівницькій фермі в порівняльному досліді нами випробувано дві серії інактивованих вакцин: перша – протипастерельозна, виготовлена тільки з *P. multocida* сероварів A та D; друга – асоційована, виготовлена з мікроорганізмів (*P. multocida* сероварів A та D, *S. aureus*, *E. coli*, *B. bronchiseptica*), що були ізольовані в цьому господарстві від кроликів 3–5-місячного віку, хворих на шлунково-респіраторні захворювання.

Для виготовлення дослідних зразків інактивованих вакцин використовували суспензії бактерій, які інактивували 0,5 %-ним розчином ПВ. Конструювання вакцин проводили з таким розрахунком, щоб в 1,0 см3 імунологічного біопрепарату містилося 5×109 м. к. Для вакцини першої серії використовували антигени пастерел сероварів А і D у співвідношенні 1:1. При виготовленні асоційованого препарату (серія 2) застосовували співвідношення бактеріальних антигенів, в якому вони ізолювались в АКФ (пастерели – 40 %, стафілококи – 30 %, ешерихії – 20 % та бордетели – 10 %). Після додавання ад’юванту, в якості якого використовували 10 %-ний аеросил (6 %) в 0,9 %-му розчині натрію хлориду, розфасовки готових вакцин, етикетування та проведення контролю на стерильність і нешкідливість для кроликів, виготовлені біопрепарати були випробувані в господарстві (табл. 1).

Установлено, що інактивована вакцина, яка була виготовлена з асоціації культур мікроорганізмів (серія 2), мала вищі превентивні властивості. Декілька нижчою захисною ефективністю володів вакцинний препарат, виготовлений тільки з культур пастерел (серія 1).

Таблиця 1

**Результати клінічних випробувань виготовлених вакцин**

**у кролівницькому господарстві**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Група тварин, щеплених вакцинами | Кількість тварин у групі | З них: |
| захворіло | вимушено забито | загинуло |
| голів | % | голів | % | голів | % |
| 1 | 93 | 26 | 28,0 | 9 | 9,7 | 1 | 1,0 |
| 2 | 102 | 19 | 18,6 | 5 | 4,9 | 0 | 0,0 |
| Контроль | 51 | 34 | 66,7 | 29 | 56,9 | 5 | 9,8 |

**Вивчення біологічних властивостей інактивованих вакцин.** Реактогенність виготовлених вакцин визначали через 12, 24 та 48 годин після ін’єкції. Враховували температурну реакцію, загальний стан та місцеву реакцію у піддослідних тварин.

Реакції на щеплення звичайно реєструвалися через 12 годин після ін’єкції вакцин, найбільш вираженими вони були через 24 години, а через 48 годин дещо зменшувались. Загальна реакція на вакцинацію через 12 годин після ін’єкції проявлялась незначним пригніченням, зниженням апетиту та підвищенням ректальної температури тіла. Післявакцинальні реакції у тварин, які були щеплені проти пастерельозу як моно- (23,7 %), так і асоційованою (24,5 %) вакциною, були майже однаковими. Проте, при застосуванні першого біопрепарату тільки в одного кроленяти через 24 години була відмічена сильна загальна реакція, яка зникла через добу. Реакції місцевого характеру були найбільш вираженими через 24 години після ін’єкції як протипастерельозної, так і асоційованої вакцин у 38,7 та 40,2 % кроликів, відповідно. В однієї тварини, щепленої вакциною першої серії, була відмічена більш сильна місцева реакція, яка проявлялася збільшенням підколінного лімфовузла. Віддалених реакцій на препарати не було виявлено.

При визначенні антигенних властивостей експериментальних серій вакцин установлено, що протипастерельозна і асоційована вакцини спричиняли підвищення титрів аглютинуючих антитіл до бактерій, з яких були виготовлені біопрепарати, відповідно до 6,52±0,49 та 7,12±0,37 log2 у порівнянні з аналогіч­ними показниками тварин цієї ж групи до щеплення, які становили відповідно 3,72±0,25 та 3,32±0,0 log2, що свідчить про індукцію вакцинами специфічних аглютинінів.

Аналіз гематологічних показників показав, що в імунізованих тварин у порівнянні з контрольною групою збільшилась кількість не тільки еритроцитів і гемоглобіну, але і лейкоцитів, зокрема паличкоядерних та сегментоядерних субпопуляцій (відповідно у 1,1; 1,1; 1,6; 4,4; 1,5 рази), що також свідчить про активізацію клітинної ланки імунітету.

При вивченні імунобіологічних властивостей виготовлених препаратів установлено, що в крові щеплених тварин вірогідно в порівнянні з аналогічними показниками цієї ж групи до щеплення підвищились показники Е-РУК, ЕАС-РУК (відповідно у 1,3-1,6; 1,1-1,4 рази), що свідчить про стимуляцію вакцинами механізмів клітинного імунітету. Зниження кількості О-клітин лімфоцитів у щеплених тварин можна пояснити більш швидкою диференціацією лімфоцитів, тобто активізацією імунної відповіді у вакцинованих кроликів у порівнянні з тваринами контрольної групи. Імунорегуляторні індекси у тварин, щеплених протипастерельозною і асоційованою вакцинами, також підвищились відповідно до значень 2,5 та 3,1. Це свідчить про те, що в організмі імунізованих тварин кількість Т-хелперів у 2,5 та 3,1 рази перевищує рівень Т-супресорів і що у тварин відбувається активна імунна відповідь на введення досліджуваних вакцин. У сироватках крові щеплених вакцинами кроликів вірогідно збільшувався рівень імуноглобулінів класів G, A і M (відповідно у 1,4; 1,2–1,8; 1,3–1,6 рази) у порівняні з такими показниками до щеплення та контрольної групи, що переконливо свідчить про активізацію не тільки клітинної, але і гуморальної ланок імунітету. Особливо важливим є підвищення рівня Ig А, що свідчить про утворення локального імунітету слизових оболонок.

**ВИСНОВКИ**

* У дисертації на підставі клініко-епізоотологічного обстеження та аналізу епізоотичного стану кролеферм, бактеріо­логічних і серологічних досліджень вивчено особливості захворювання пастерельозом кроликів та впливу бактеріальних асоціантів на характер перебігу хвороби, експериментально обґрунтовано режим інактивації виділених збудників з метою виготовлення інактивованих препаратів, розроблено і випробувано з позитивним результатом експериментальні зразки моно- та асоційованої вакцин.
* Перебіг пастерельозу кроликів на кролефермах Донецької, Запорізької та Луганської областей характеризується ураженням респіраторних органів і шлунково-кишкового тракту, або протікає в асоціації з іншими бактеріозами, що залежить від умов утримання, годування, сезону року. Встановлено, що серед кролепоголів’я поряд із пастерелами циркулюють 13 видів умовно патогенних бактерій, а саме: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (серогрупи О111, О78, О8 і О126), *Staphylococcus epidermidis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* та *Micrococcus luteus*. У кожній з обстежених ферм асоціація включає від 3 до 9 видів умовно патогенних мікроорганізмів.
* За бактеріологічним дослідженням патологічного матеріалу від загиблих кроликів виділено 294 культури *Pasteurella multocida*, 204 *S. aureus*, 119 *E. coli*, 65 *S. epidermidis*, 36 *B. bronchiseptica*, 33 *K. pneumoniae*, 33 *S. pyogenes*, 23 *S. pneumoniae*, 20 *S. saprophyticus*, 18 *P. aeruginosa*, 9 *P. vulgaris*, 4 *S. faecalis*, 3 *P.mirabilis* та 2 *M.luteus*. Провідну роль у виникненні маніфестальних форм захворювання відіграють пастерели сероварів А і Д.
* В організмі хворих на пастерельоз кроликів формується сталий бак­теріальний ценоз, що складається з асоціації *P. multocida + S. aureus* (20,9 %), *P. multocida + S. epidermidis* (19,2 %), *P. multocida + E. coli* (11,8 %), *E. coli + S. aureus* (10,5 %), *S. aureus + S. epidermidis* (7,8 %), *P. multocida + S. pneumoniae* (6,9 %) та *P. multocida + B. bronchiseptica* (5,0 %); рідше – *P. multocida + B. bronchiseptica + S. aureus* (3,2 %), S.aureus + S.pyogenes (2,3 %), *P. multocida + E. coli + S. aureus* (2,7 %), *E. coli + S. pyogenes* (1,4 %), *P. multocida + K. pneumoniae* (1,4 %), *E. coli + S. saprophyticus* (0,9 %), *S. aureus + M. luteus* (0,9 %), *E. coli + B. bronchiseptica* (0,9 %), *P. multocida + S. saprophyticus* (0,9 %), *P. multocida + S. pyogenes* (0,9 %), *B. bronchiseptica + S. aureus* (0,9 %), *B. bronchiseptica + S. epidermidis* (0,5 %), *K. pneumoniae + S. epidermidis* (0,5 %) та *S. pneumoniae + S. saprophyticus* (0,5 %).
* За серологічною ідентифікацією 294 ізолятів пастерел до серовару А віднесено 173 (58,8 %), до серовару Д – 98 (33,4 %) і 23 культури (7,8 %) не типовано. Виділені культури пастерел ідентичні за тінкторіальними, культурально-морфологічними та мають виражену варіабельність біохімічних властивостей. На твердих поживних середовищах вони ростуть у вигляді S- (43,9 %), M- (47,9 %) та R- (8,2 %) колоній; 79,6 % культур утворюють капсулу.
* Внесення до м'ясо-пептонного бульйону 15 % аутолізату дріжджів, 10 % дефібринованої крові, 15 % сироватки крові або 15 % дріжджованого аутолізату крові стимулює накопичення пастерел відповідно в 1,8; 10,0; 4,5 і 4,6 рази.
* Модифікований спосіб провокації пастерельозної інфекції у тварин-бактеріоносіїв шляхом інтраназального інстилювання 0,2 см3/гол 0,5 %-го розчину бриліантгрюну один раз на добу впродовж 3 діб та додаткової імуносупресії дексаметазоном у дозі 2 мг/кг маси тварини 2 рази на добу протягом 3 діб підвищує ізоляцію культур *P. multocida* у 5 разів порівняно з методом Н.И. Розанова.
* Теоретично і експериментально обґрунтовано переваги застосування 0,5 %-го пероксиду водню порівняно з 1 %-ним дімером етиленіміну та 0,25 %-ним формальдегідом щодо інактивації *P. multocida* сероварів А і Д, *S. aureus*, *E. coli* та *B. bronchiseptica*, повна інактивація інфекційності настає відповідно впродовж 7,7 і 7,8; 10,6; 7,3 та 7,8 годин. Величина вірогідності апроксимації (R2) кінетики інактивації досліджуваних бактерій відповідно сягає 0,98; 0,92; 0,81; 0,82 та 0,86 при використанні 0,5 %-го розчину пероксиду водню; 0,91; 0,89; 0,88; 0,92; 0,86 при інактивації культур 1 %-ним розчином дімеру етиленіміну і 0,81; 0,78; 0,83; 0,85 при стерилізації 0,25 %-ним розчином формальдегіду, що вказує на близькість значень теоретично розрахованих ліній регресій до фактичних експериментальних даних.
* Застосування інактивованих моно- та асоційованої вакцин у комплексі протиепізоотичних заходів щодо профілактики респіраторних, кишкових та змішаних хвороб кроликів, сприяє збереженості і зниженню захворюваності кроленят у 3,0 рази в порівнянні з невакцинованими тваринами.
* Введення кроликам експериментальних зразків вакцин в об’ємі 1,0 см3 підшкірно (5×109 м. к.) активізує як клітинний, так і гуморальний імунітет, про що свідчить збільшення в популяції лімфоцитів кількості Т-хелперів у 2,5 і 3,1 рази, в сироватці крові імуноглобулінів класів G, A, M у 1,5 рази та титрів аглютинуючих антитіл у 1,9 рази. Протективна ефективність експериментальних зразків моно- і асоційованої вакцин сягає 98,9 і 100,0 %, відповідно.

**ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Розроблено і впроваджено для ветеринарної медицини: “Методичні вказівки з діагностики та організації протиепізоотичних заходів при патологіях кроликів, які викликаються умовно патогенними бактеріями”, “Методичні рекомендації щодо одержання біомаси пастерел при стаціонарному та глибинному культивуванні”, “Настанову з діагностики пастерельозу тварин”, що затверджені науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини МАП України (протокол № 3 від 20.12.2006 р.); “Вакцину інактивовану проти пастерельозу кроликів” (ТУ У 24.4-00493669-002:2007); “Листівку-вкладку із застосування вакцини інактивованої проти пастерельозу кроликів”; “Інструкцію щодо виготовлення та контролю вакцини інактивованої проти пастерельозу кроликів”; спосіб ізоляції пастерел від кроликів-пастерелоносіїв; епізо­отичні штами 99 *P. multocida* серовару D та 127 *P. multocida* серовару А.

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

* Паразитоценози сільськогосподарських тварин / А. Ф. Руденко, П. А. Руденко, **А. А. Руденко**, С. С. Кліменко, А. П. Бабенко // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Ветеринарні науки. – Луганськ, 2006. – № 69 (92). – С. 201–210. *Дисертантом були вивчені бактеріальні паразитоценози при кишково-респіраторних хворобах кроликів у господарствах південно-східної частини України.*
* Руденко А. А. Бактеріальні паразитоценози з домінуючою участю *Pasteurella multocida* кроленят в аматорських господарствах південно-східної частини України // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини.– Х., – 2006. – Вип. 13 (38), ч. 3. – С. 103–106.
* Руденко А. А. Выделение *Pasteurella multocida* от кроликов с инфекционной патологией в фермерском хозяйстве Луганской области // Наукові праці. Актуальні проблеми ветеринарної медицини. – Сімферополь, 2005. – Вип. 92. – С. 38–43.
* Руденко А. А. Значення *Pasteurella multocida* в специфічній профілактиці пневмоентеритів кроленят // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Ветеринарні науки. – Луганськ, 2006. – № 63/86. – С.136–144.
* Руденко А. А. Изоляция *Pasteurella multocida* серовара А от кроликов-пастереллоносителей // Вісник Сумського національного аграрного університету. – Суми, 2005. – Вип. 1–2 (13–14). – С. 117–120.
* Руденко А. А. Культурально-морфологічні властивості культур *Pasteurella multocida*, ізольованих у кролівничих господарствах південно-східної частини України // Матеріали 1 Міжнародної науково-практичної конференції “Наукова молодь: досягнення та перспективи”. – Луганськ, 2006. – Т. 2. – С. 166–169.
* Руденко А. А. Этиопатогенетические и иммунобиологические аспекты пастереллеза кроликов // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Ветеринарні науки.– Луганськ, 2005. – № 50/73. – С.223–228.
* **Руденко А. А.**, Заболотная В. П., Сосницкий А. И. Биологические закономерности функционирования болезнетворных потенций микробиального патогена *Pasteurella multocida* в паразито-хозяинной системе на модели организма кролика // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Ветеринарні науки.– Луганськ, 2005. – № 50/73. – С. 229–234. *Дисертантом вивчено біологічні властивості P. multocida, як гетерогенного за патогенністю і вірулентністю виду, що детермінує функціональну активність паразито-хазяїнної моделі і результат взаємодії антагоністичних систем збудника захворювання зі сприйнятливим організмом.*
* Изучение биологических свойств реактивированных культур *Pasteurella multocida* / А. И. Сосницкий, Б. Т. Стегний, **А. А. Руденко**, В. П. Заболотная // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Х. – 2005. –Вип. 85, Т. 2. – С.1007–1011. *Дисертантом досліджено біологічні властивості пастерел при проведенні реактивації ліофільно висушених культур P. multocida.*
* Сосницький О. І., **Руденко А. А.**, Заболотна В. П. Розробка і випробування пастерельозного бактерину для імунізації кролів // Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів, 2005. – Вип. 6., № 3,4. – С. 372–377. *Аспірантом вивчено кінетику інактивації пастерел за допомогою ДЕІ і ФА. Проведено порівняльний аналіз імуногенної активності пастерельозних вакцин для імунізації кролів.*
* Деклараційний патент України на корисну модель 11612, МКИ B 61L 7/00; A61 K39/102. Спосіб ізоляції пастерел від кролів-пастерелоносіїв. Руденко А.А.; ЛНАУ. - № а200506473; Заявл. 01.07.2005; Опубл.16.01.2006; Бюл. №1. – 2 с.
* Патент України на корисну модель 18446. МКИ A61K 39/00. Епізоотичний штам *Pasteurella multocida* серовару D. Руденко А.А.; ЛНАУ - № u200604400 ; Заявл. 19.04.2006; Опубл. 15.11.2006; Бюл. № 11. – 4 с.
* Патент України на корисну модель 21254. МКИ A61K 39/00. Епізоотичний штам *Pasteurella multocida* серовару А для виготовлення інактивованого бактерину проти інфекційних пневмоентеритів кролів. Руденко А.А. ; ЛНАУ - № u200608023; Заявл. 17.07.2006; Опубл.15.03.2007; Бюл. № 3. – 4 с.

**Руденко А. А. Поширення, біологічні властивості збудника та удосконалення профілактики пастерельозу кроликів. – Рукопис.**

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. Національний науковий центр “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”. Харків, 2007*

У дисертації викладено результати вивчення спектру і поширення асоціацій умовно патогенних бактерій, які спричиняють або ускладнюють перебіг шлунково-кишкових, респіраторних та змішаних форм перебігу цих хвороб кроликів, біологічні властивості збудника, зокрема *P. multocida*, та удосконалення діагностики і профілактики зазначених хвороб, зокрема пастерельозу кроликів.

У господарствах південно-східної частини України в етіології пневмоентеритів кроликів беруть участь 14 видів умовно патогенних бактерій. Частіше за все ізолюють *P. multocida* (34,1 %), *S. aureus* (23,6 %), *E. coli* (13,8 %) та *S. epidermidis* (7,5 %); менш розповсюдженими – *B. bronchiseptica* (4,2 %), *S. pyogenes* (3,8 %), *K. pneumoniae* (3,8 %), *S. pneumoniae* (2,7 %), *S. saprophyticus* (2,3 %), *P. aeruginosa* (2,1 %) і рідко – *P. vulgaris*, *S. faecalis*, *P. mirabilis* та *M. luteus* (2,1 %).

За біологічними властивостями культури *P. multocida*, які ізольовані від кроликів із господарств південно-східної частині України, мало чим відрізняються від пастерел, отриманих від інших видів тварин. За допомогою РНГА 173 культури (58,8 %) було віднесено до серовару А, 98 (33,4 %) – до серовару D, 23 ізоляти (7,8 %) не мали сероваріантної належності. За патогенними властивостями культури пастерел суттєво відрізняються між собою: ізоляти з внутрішніх органів хворих кроликів викликали загибель 64,1 % мишей, і нав­паки культури з носової порожнини були патогенними тільки для 29,9 % мишей.

З метою удосконалення діагностики пастерельозу запропоновано модифікацію методу Н.И. Розанова, що передбачає додаткову імуносупресію кроликів-пастерелоносіїв дексаметазоном.

Встановлено оптимальні параметри інактивації культур пастерел, стафілококів, ешерихій та бордетел 0,5 %-ним пероксидом водню, поріг безпечності цього процесу забезпечується відповідно через 7,7; 7,8; 10,6; 7,3 та 7,8 годин.

У порівняльному досліді на 246 кроликах випробувано 2 серії інактивованих вакцин, що виготовлені із пастерел сероварів А і Д та з асоціації культур умовно патогенних бактерій, в тому числі і *P. multocida*, що циркулюють в аматорських кролефермах, які сприяють збільшенню збереженості і зниженню захворюваності кроликів, відповідно у 2,8 й 3,0 рази. Щеплення тварин інактивованими вакцинами активізує як клітинний, так і гуморальний імунітет, про що свідчить збільшення в крові імуноглобулінів класів G, A, M, Т- і В-лімфоцитів та імунорегуляторного індексу, відповідно у 1,4; 1,2–1,8; 1,3–1,6; 1,3–1,6; 1,1–1,4 та 1,4–2,5 разів.

Інактивована вакцина проти пастерельозу кроликів пропонується для оздоровлення кролівницьких ферм, неблагополучних щодо пневмоентеритів.

**Ключові слова**: умовно патогенні бактерії, паразитоценоз, пастерельоз, пневмоентерити кроликів, пастерелоносійство, інактивована вакцина, антиген, біологічні властивості пастерел.

**Руденко А. А. Распространение, биологические свойства возбудителя и усовершенствование профилактики пастереллеза кроликов. - Рукопись.**

*Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины”. Харьков, 2007*

В диссертации изложены результаты изучения ассоциаций условно патогенных бактерий, которые вызывают или осложняют течение желудочно-кишечных, респираторных и смешанных болезней кроликов, биологических свойств возбудителя и усовершенствования диагностики и профилактики пастереллеза кроликов.

В хозяйствах юго-восточного региона Украины в этиологии пневмоэнтеритов кроликов принимают участие 14 видов условно патогенных бактерий. Чаще всего изолируют *P. multocida* (34,1 %), *S. aureus* (23,6 %), *E. coli* (13,8 %) и *S. epidermidis* (7,5 %); реже встречались – *B. bronchiseptica* (4,2 %), *S. pyogenes* (3,8 %), *K. pneumoniae* (3,8 %), *S. pneumoniae* (2,7 %), *S. saprophyticus* (2,3 %), *P. aeruginosa* (2,1 %) и редко – *P. vulgaris*, *S. faecalis*, *P. mirabilis*, *M. luteus* (2,1 %).

По биологическим свойствам культуры *P. multocida*, изолированные от кроликов в хозяйствах юго-восточного региона Украины, мало отличаются от пастерелл, выделенных от других видов животных. С помощью РНГА 173 культуры (58,8 %) отнесено к серовару А, 98 (33,4 %) – к серовару D, 23 изолята (7,8 %) не имели серовариантной принадлежности. В 10 хозяйствах (83,3 %) изолировано культуры пастерелл сероваров А и D и не выделено ни одного изолята *P. multocida* серовара В. При несерологическом типировании пастерелл 173 культур (58,8 %) были положительными в стафилококковом тесте, а 121 (41,2 %) – образовывали флокулят в трипафлавиновой пробе.

По патогенным свойствам культуры пастерелл существенно отличаются между собой: изоляты из внутренних органов больных кроликов вызывали гибель 64,1 % мышей, и наоборот культуры из носовой полости были патогенными только для 29,9 % мышей.

С целью усовершенствования диагностики скрытого течения пастереллеза предложен модифицированный нами метод, который предполагает интраназальное введение кроликам по 0,2 см3 0,5 %-го водного раствора бриллиант­грюна 1 раз в сутки в течение 3 суток и дополнительную иммуносупрессию дексаметазоном, который при внутримышечном применении в дозе 2 мг/кг 2 раза в сутки на протяжении 3 суток в 5 раз повышает выделяемость пастерелл у животных-пастереллоносителей.

Для усовершенствования состава питательной среды и повышения эффективности накопления бактериальной массы испытано дефибринированную кровь, аутолизат дрожжей, сыворотку крови и изготовленный дрожжевой аутолизат крови. Добавление дрожжевого аутолизата крови к питательной среде способствует повышению накопления живых микробных клеток *P. multocida* в 5,4 раза по сравнению с простым МПБ, что может быть использовано в производстве инактивированных биопрепаратов.

Для инактивации культур пастерелл, стафилококков, ешерихий и бордетелл использовано перекись водорода, димер этиленимина и формальдегид. Лучшие результаты получены при применении 0,5 % перекиси водорода, которая обеспечивает безопасный порог инактивации *P. multocida* серовара А, *P. multocida* серовара D, *S. aureus*, *E. coli* и *B. bronchiseptica* соответственно через 7,7; 7,8; 10,6; 7,3 и 7,8 часов.

В сравнительном опыте на 246 кроликах испытаны 2 серии инактивованных вакцин, которые соответственно изготовлены из культур пастерелл сероваров А и Д и ассоциации условно патогенных бактерий, в том числе и *P. multocida*, в комплексе противоэпизоотических мероприятий при респираторных, кишечных и смешанных заболеваниях, которые снижают заболеваемость и увеличивают сохранность крольчат соответственно в 2,8 и 3,0 раза. Технология изготовления вакцины обеспечивает получение стерильного, безвредного, иммуногенного, малореактогенного и обладающего высокими превентивными и иммунобиологическими свойствами препарата. Прививка животным инактивированных вакцин активизирует как клеточный, так и гуморальный иммунитет, о чем свидетельствует увеличение в крови иммуноглобулинов классов G, A, M, Т- и В-лимфоцитов и иммунорегуляторного индекса соответственно в 1,4; 1,2–1,8; 1,3–1,6; 1,3–1,6; 1,1–1,4 и 1,4–2,5 раза.

Инактивированная вакцина против пастереллеза кроликов предлагается для оздоровления кролеводческих ферм, неблагополучных относительно пневмоэнтеритов.

**Ключевые слова**: условно патогенные бактерии, паразитоценоз, пастереллез, пневмоэнтериты кроликов, пастереллоносительство, инактивированая вакцина, антиген, биологические свойства пастерелл.

**Rudenko A.A. Distribution, biological properties of the infestant and improvement of a prophylaxis of the pasteurellosis of the rabbits. – Manuscript.**

 *Thesis for the defense of Ph. D., speciality 16.00.03 – veterinary microbiology and a virology. National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”. Kharkov, 2007.*

There are stated results of studying of associations of conditional pathogenic bacterias which cause or complicate the streaming of gastro-intestinal, respiratory and blended rabbits’ diseases, biological properties of infestant and improvement of diagnosis and prophylaxis of the pasteurellosis of rabbits in the thesis.

Clinicoepizootologic and bacteriological researches testify that 14 kinds of conditional pathogenic bacteriums take part in economies of southeast of Ukraine in etiology of rabbits’ pneumoenterites. *P. multocida* (34,1 %), *S. aureus* (23,6 %), *E. coli* (13,8 %) and *S. epidermidis* (7,5 %) have being isolated more often; *B. bronchiseptica* (4,2 %), *S. pyogenes* (3,8 %), *K. pneumoniae* (3,8 %), *S. pneumoniae* (2,7 %), *S. saprophyticus* (2,3 %), P. *aeruginosa* (2,1 %) have being isolated less and as for *P. vulgaris*, *S. faecalis*, *P. mirabilis* and *M. luteus* (2,1 %) - rarely.

On the biological properties of *P. multocida* cultures isolated from rabbits from economies of southeast of Ukraine did not differ much from *P. multocida* which was isolated from the other types of animals. 173 (58,8 %) cultures has been referred to serovar A, 98 (33,4 %) – to serovar D, 23 (7,8 %) isolates did not have any serovar belonging. On pathogenic properties *P. multocida* cultures essentially differed among themselves: isolates from internals of sick rabbits caused death of 64,1 % of mice and, on the contrary the cultures form a nasal chamber were pathogenic only for 29,9 % of mice.

With a purpose of improvement of diagnosis of the pasteurellosis of the rabbits – carriers of bacterium there were introduced intranasally about 0,2 sm3 0,5 % of a water solution of tetraethyl-diamino-triphenyl-carbohydride sulphate once a day during 3 days, and in addition it was carried out imunosuppression with a help of dexamethasonum, which was applied intramuscularly in a dose of 2 mg/kg twice a day during 3 days.

To inactivate *P. multocida* culture, staphylococcuses, esherichias and bordetellas, the peroxide of hydrogenium, dimmer ethyleneimine and a formic aldehyde are used. The best results are received by applicating of 0,5 % of a peroxide of hydrogenium which provides a safe threshold of inactivation of *P. multocida* of a serovariant A, D; *S. aureus*, *E. coli* and *B. bronchiseptica*, accordingly through 7,7; 7,8; 10,6; 7,3 and 7,8 hours. In relative experiment at 246 rabbits, 2 series of inactivated vaccines are tested, they are made of cultures of conditional pathogenic bacteriums, *P. multocida* including. In a complex of anti-epizootologic measures on respiratory, intestinal and blended diseases assist decreasing and safety of a sick rate of rabbits accordingly in 2,8 and 3,0 times, compared with non vaccinated animals. The vaccines made by us are sterile, harmless, immunifacient, areactive and have high preventive and immunobiological properties. The inoculation of animals by the inactivated vaccines activate both cellular and humoral immunity, and as a fact there is in blood an augmentation of immunoglobulins of classes G, A, M, T and B-lymphocytes, accordingly in 1,4; 1,2–1,8; 1,3–1,6; 1,3–1,6 and 1,1–1,4 times.

The inactivated vaccine against the pasteurellosis of rabbits is offered for improvement of rabbit farms, unsuccessful concerning pneumoenterites.

**Key words:** conditional pathogenic bacteriums, parasitocoenosis, pasteurellosis, pneumoenterites of rabbits, carrier of *P. multocida*, inactivated vaccine, an antigen, biological properties of *P. multocida*.

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