

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ**  
**УНІВЕРСИТЕТ**

**ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ЗДОРОВ'Я ТВАРИН**  
**ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

Спеціальність 211 «Ветеринарна медицина».

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

Зав.кафедри фізіології та біохімії с.-г тварин

Кандидат біологічних наук, проф.

\_\_\_\_\_ Л.М. Степченко

«        » \_\_\_\_\_ 2020 р.

**ДИПЛОМНА РОБОТА**

**ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА ДІАГНОСТИКА РЕСПІРАТОРНОЇ**  
**ПАТОЛОГІЇ СВИНЕЙ В УМОВАХ НАУКОВО-ДОСЛІДНОГО**  
**ЦЕНТРУ БІОБЕЗПЕКИ ТА ЕКОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ РЕСУРСІВ**  
**АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ ДНІПРОВСЬКОГО**  
**ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ**

**26.06 – ДР. 0873 20 05 08. 047. ПЗ**

Студент-дипломник \_\_\_\_\_ О.С. Гаман

Керівник дипломної роботи

канд. вет. наук, доц. \_\_\_\_\_ проф. Д.М.Масюк

Консультанти:

з охорони праці

канд. с.-г. наук, доц \_\_\_\_\_ В.О. Сапронова

з економічних питань

канд. вет. наук, доц. \_\_\_\_\_ В.В. Зажарський

Дніпро – 2020

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ .....	3
АНОТАЦІЯ .....	4
ВСТУП .....	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Респіраторні хвороби свиней вірусної етіології.....	8
1.2. Респіраторні хвороби свиней бактеріальної етіології.....	15
1.3. Лабораторна діагностика респіраторної патології свиней.....	23
2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	30
2.1. Матеріал і методи досліджень.....	30
2.2. Характеристика науково-дослідного центру.....	43
2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз.....	50
2.3.1. Патологоанатомічні зміни у легенях за респіраторної патології свиней .....	50
2.3.2. Визначення етіології легеневої патології у свиней інфекційного генезу за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції .....	53
2.3.3. Визначення чутливості ідентифікованих мікроорганізмів до різних антибактеріальних препаратів.....	57
2.3.4. Розрахунок економічної ефективності застосування ПЛР та бактеріологічного досліджень.....	63
3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ.....	69
3.1. Аналіз стану охорони праці в умовах НДЦ.....	69
3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів.....	72
3.3. Пожежна безпека.....	74
ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ .....	75
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	77
ДОДАТКИ.....	81

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота була виконана на 84 сторінках комп'ютерного тексту і містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їх аналіз, розрахунок економічної ефективності, охорону праці, висновки та пропозиції виробництву, список використаної літератури. Робота містить 14 рисунків та 9 таблицю. Список використаної літератури налічує 37 джерел, переважно зарубіжних авторів.

Метою роботи було визначити особливості диференціальної діагностики респіраторної патології свиней.

Об'єктом дослідження було застосування методу полімеразної ланцюгової реакції та бактеріологічного дослідження для діагностики респіраторної патології інфекційного генезу у свиней.

У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо виявлення патологоанатомічних змін у легенях, встановлення етіології легеневої патології інфекційного генезу за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції, визначення чутливості ідентифікованих мікроорганізмів до різних антибактеріальних препаратів.

Згідно результатів досліджень, господарству яке і раніше являлося не благополучне щодо патологій респіраторної системи інфекційного походження було рекомендовано проводити вчасно прижиттєву діагностику, дотримуватися схеми вакцинації шляхом парентеральної імунізації, та постійний контроль напруженості імунітету.

## АНОТАЦІЯ

Дипломна робота Гамана О.С. на тему «Диференціальна діагностика респіраторної патології свиней в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету». У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо визначення особливостей диференціальної діагностики респіраторної патології свиней. Встановлено, що патологоанатомічні зміни у легенях за респіраторної патології у свиней на відгодівлі є різноманітними, та у більшості випадків залежать від спектру збудників, що викликають патологічний процес. За результатами ПЛР дослідження встановлено, що основними етіологічними чинниками інфекційної патології серед досліджуваних тварин є коінфекція мікроорганізмів *Circovirus type 2* та *A. pleuropneumoniae* 8 серотипу. З віком відбувається прогресія захворювання, що обумовлено ускладненням патологічного процесу у легенях мікроорганізмами *M. hyorhinea*, *G. parasuis*, *P. multocida* та *M. hyorhinis*. За бактеріологічного дослідження з'ясовано, що більшість ізольованих культур *A. pleuropneumoniae* є мультирезистентними до широкого спектру антибактеріальних препаратів, але всі вони є чутливими до амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, тіамуліну і флорфеніколу. Ізольована від свиней 135 добового віку культура *S. suis* також є мультирезистентною до 50 % досліджуваних антибактеріальних препаратів та одночасно чутливою до дії амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, тіамуліну, флорфеніколу, цефазоліну, цефтіофуру і ципрофлоксацину. Економічна ефективність застосування методу ПЛР для діагностики респіраторної патології у свиней складає 199,32 грн, а культивування мікроорганізмів на поживних середовищах із визначенням чутливості ізольованих мікроорганізмів до антибактеріальних складає 109,78 грн.

**Ключові слова:** ПЛР, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *M. Hyorhinea*, РНК, ДНК.

## SUMMARY

Graduate work Haman O. S. on the topic "Differential diagnosis of respiratory pathology of pigs in the the Scientific Research Centre of Biosafety and Environmental Control Agro-industrial Complex of Dnipro State Agrarian and Economic University ". The thesis presents the solution of problems to determine the features of the differential diagnosis of respiratory pathology in pigs. It has been established that the pathological changes in the lungs in respiratory pathology in fattening pigs are diverse, and in most cases depend on the spectrum of pathogens that cause the pathological process. According to the results of PCR, it was found that the main etiological factors of infectious pathology among the studied animals are co-infection of microorganisms Circovirus type 2 and *A. pleuropneumoniae* 8 serotype. With age, the disease progresses due to the complication of the pathological process in the lungs by microorganisms *M. hyopneumoniae*, *G. parasuis*, *P. multocida* and *M. hyorhinis*. Bacteriological studies have shown that most isolated cultures of *A. pleuropneumoniae* are multidrug-resistant to a wide range of antibacterial agents, but they are all sensitive to amoxicillin with clavulanic acid, enrofloxacin, thiamulin, and florfenicol. Isolated from 135-day-old pigs, *S. suis* culture is also multidrug-resistant to 50% of the studied antibacterial drugs and at the same time sensitive to the action of amoxicillin with clavulanic acid, enrofloxacin, thiamulin, florfenicol, cefazolin, ceftiofur and ciprofloxacin. The economic efficiency of PCR for the diagnosis of respiratory pathology in pigs is 199.32 UAH, and the isolation of microorganisms on nutrient media to determine the sensitivity of isolated microorganisms to antibacterial drugs is 109.78 UAH.

**Ключові слова:** PCR, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *M. Hyopneumoniae*, RNA, DNA.

## ВСТУП

Однією з найбільш розповсюджених проблем у свинарстві є респіраторні хвороби, які займають провідне місце у загальній патології тварин і завдають значних економічних збитків, обумовлюючи зниження їх продуктивності, загибель, вимушений забій і витрати на проведення лікувальних, оздоровчих і профілактичних заходів.

За офіційними даними МЕБ (Міжнародне епізоотичне бюро), хвороби органів дихання у переважній більшості випадків відносяться до заразної патології. У багатьох промислових комплексах хвороби органів дихання реєструються на протязі всього технологічного циклу. При цьому рівень захворюваності має широкий діапазон. Стосовно вікової схильності розподіл становить: поросята-сисуні–0,4-2,8%; у період дорощення– 34,5-96,2% і на відгодівлі – 39,7-81,6%. Загибель тварин зазначених вікових груп від респіраторних хвороб із загального стада свиней становить відповідно 0,78 - 2,8%; 28,9-89,0% і 12,0-74,9% [6].

Отримані останніми роками результати досліджень дозволяють поділити більшість респіраторних хвороб свиней на ті, які викликаються вірусами (грип, репродуктивно-респіраторний синдром, хвороба Ауескі, респіраторна коронавірусна інфекція, цирковірусна інфекція, та ін.), бактеріями (мікоплазмоси, актинобацильоз, бордетеліоз, гемофільоз, пастерельоз та ін.). Але у більшості випадків респіраторна патологія перебігає у вигляді асоційованих інфекцій. З огляду на це актуальним є своєчасна діагностика респіраторної патології з метою ідентифікації домінуючого у патологічному процесі мікроорганізму та визначення їх чутливості до антибактеріальних препаратів.

**Об'єкт дослідження** – діагностика респіраторної патології у свиней.

**Предмет дослідження:** патологоанатомічні зміни у легенях, генетичний матеріал збудників респіраторної хвороб свиней та їх культивування на поживних середовищах.

**Мета роботи:** визначити особливості диференціальної діагностики респіраторної патології свиней.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- Визначити патологоанатомічні зміни у легенях за респіраторної патології свиней;
- Встановити етіологію легеневої патології у свиней інфекційного генезу за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції;
- З'ясувати чутливість ідентифікованих мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів;
- Розрахувати економічну ефективність культивування мікроорганізмів на поживних середовищах та методу ПЛР для діагностики респіраторної патології у свиней.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Респіраторні хвороби свиней вірусної етіології

Нові методи утримання та експлуатації свиней, які передбачають постійне перебування тварин у закритих приміщеннях, та концентрацію їх на обмежених виробничих площах, впливають на організм шляхом технологічних стрес-факторів. Це призводить до підвищення сприйнятливості свиней до інфекційних агентів, включаючи потенційно небезпечних мікроорганізмів. Однією з найбільш гострих проблем у свинарстві є респіраторні хвороби, які займають провідне місце у загальній патології тварин і завдають значних економічних збитків, обумовлюючи зниження їх продуктивності, загибеллю, вимушеним забоєм і витратами на проведення профілактичних, лікувальних і оздоровчих заходів [21].

За офіційними даними МЕБ ( Міжнародне епізоотичне бюро) , хвороби органів дихання у переважній більшості випадків відносяться до заразної патології. У багатьох промислових комплексах хвороби органів дихання реєструються на протязі всього технологічного циклу. При цьому рівень захворюваності має широкий діапазон. Стосовно вікової схильності розподіл становить: поросята-сисуни–0,4-2,8%; у період дорощення– 34,5-96,2% і на відгодівлі – 39,7-81,6%. Загибель тварин зазначених вікових груп від респіраторних хвороб із загального стада свиней становить відповідно 0,78 - 2,8%; 28,9-89,0% і 12,0-74,9% [6].

Суттєві коливання захворюваності та смертності поросят обумовлені рівнем порушень санітарно-гігієнічних правил утримання, догляду та годівлі свиней. Отримані останніми роками результати досліджень дозволяють поділити більшість респіраторних хвороб свиней на ті, які викликаються вірусами (грип, репродуктивно-респіраторний синдром, хвороба Ауескі, респіраторна коронавірусна інфекція, цирковірусна інфекція, та ін.),



бактеріями (мікоплазмози, актинобацильоз, бордетеліоз, гемофільоз, пастерельоз та ін.), а також низка інших збудників інвазійних хвороб, що окремо, або в різних асоціаціях індукують розвиток респіраторної патології. Яскраву патогенну дію вони проявляють на тлі низького рівня природної резистентності організму в результаті впливу на тварин різних стрес-факторів.

Хвороби респіраторної патології в залежності від здатності викликати захворювання поділяють на три групи [6].

До першої групи відносять постійні або первинні патогени, які індукують клінічні ознаки, тим самим мають пряме ураження органів дихання (вірус РРСС, вірус грипу свиней, вірус хвороби Ауескі, Респіраторний коронавірус).

До другої групи входить збудники, які є постійно циркулюючими у свинарських господарствах. Їх патогенна дія проявляється тільки на поросятах з низьким імунним статусом, або при інфікуванні іншими вірусами або бактеріями (Цирковірус II типу, збудник х. Ауескі, вірус КЧС).

До третьої групи відносяться віруси, які рідко проявляються при хворобах респіраторної патології, тому що вони відіграють другорядну роль у патології (параміксо-, парво-, адено- і реовіруси свиней).

**Грип свиней** - високо контагіозна хвороба, що індукує гострі респіраторні синдроми, та характеризується кашлем, чханням, виділенням з носу, лихоманкою і апатією. Захворювання іноді може перебігати у більш важкій формі, що супроводжується у наступному затримкою росту або смертністю. Симптоматично може спостерігатися також хронічне захворювання дихальних шляхів, особливо в комплексі з іншими респіраторними хворобами [24].

Збудник грипу свиней є РНК-геномний вірус який належить до родини *Orthomyxoviridae* і характеризується сегментованим геном, що складається з восьми одноланцюгових молекул РНК з негативною полярністю. Вірус грипу типу А, що циркулює у популяціях свиней по

всьому світі, представлений трьома основними підтипами H1N1, H1N2 та H3N2 [35].

Хворіють свині різного віку, але найбільш сприйнятливі поросята у період відлучення. Для хвороби характерні раптовий прояв, висока захворюваність і низька летальність тварин. Також у грипу свиней присутня сезонність прояву. В холодний період року випадків хвороби значно більше. Джерелом збудника інфекції є хворі та перехворілі, свині-вірусоносії. Основний шлях передачі збудника – повітряно крапельний. Інкубаційний період досить короткий, і складає від 1-2 до 7 діб. На початку хвороби спостерігається підвищення температури тіла до 41,0 – 42,0°C, що супроводжується млявістю, відмовою від корму, кон'юнктивітом, слизовими і серозними витіками з носової порожнини, чханням, кашлем, важким диханням. Хвороба триває від 5 до 10 днів. Смертність коливається в межах 1-3%.

При розтині загиблих або хворих тварин можна спостерігати гіперемію слизової оболонки гортані і бронхів, а також набряк серцевих, а іноді і в діафрагмальних частках легень. Запальні вогнища легеневої тканини мають темно-червоною колір. Бронхіальні та середостінні лімфовузли збільшені, гіперемійовні, набряклі [6].

**Репродуктивно-респіраторний синдром свиней (PRRS)** – це захворювання яке викликає респіраторну патологію переважно у молодняка свиней, особливо у період дорощування та відгодівлі. У свиноматок PRRS супроводжується абортами на пізніх термінах поросності, передчасними опоросами або затримкою опоросу, народженням мертвих або слабких і нежиттєздатних поросят.

Збудник представлений РНК-геномним вірусом який відноситься до роду *Arterivirus*, сімейства *Arteriviridae*. Розрізняють 2 генотипа вірусу - європейський і американський. Сприйнятливі до вірусу свині всіх вікових груп. Інкубаційний період може тривати від 4-7 до 35 днів. Хвороба протікає в гострій, хронічній та латентній формах.

При гострому перебігу у дорослих тварин реєструється незначне підвищення температури тіла, втрата апетиту, важке дихання, блакитно-червоне забарвлення шкіри вух, п'ятачка, вульви, хвоста. У поросних свиноматок в останній термін поросності реєструються масові аборти, народження мертвих, муміфікованих плодів, або слабких і нежиттєздатних поросят. У молодняка спостерігається затруднене дихання, кашель, пригнічення та підвищення температури. При хронічному перебігу тварини пригнічені, втрачають апетит. Спостерігається ураження органів дихання (риніт, запалення легенів, плеврит, тощо) [30].

При розтині загиблих новонароджених і поросят старших вікових груп, на макрокартині можна спостерігати набряклість і крововиливи в підшкірній клітковині, підвищений вміст рідини в грудній і черевній порожнинах, катаральне запалення легень з наявністю крововиливів і гіперемію, дистрофічні процеси з крововиливами в серці і печінці, збільшення лімфатичних вузлів [27].

**Респіраторна коронавірусна інфекція свиней** – це хвороба яка характеризується переважно субклінічним перебігом. Спостерігається відсутність апетиту, утруднене дихання, млявість, та зниження продуктивності. Збудник представлений РНК-геномним вірусом із сімейства *Coronaviridae*. Цей вірус є природним мутаційним вірусом ТГС, з яким знаходиться в генетичній і антигенній спорідненості, але володіє респіраторним тропізмом. Штами респіраторного коронавірусу поділяють на авірулентні, слабо вірулентні, помірно вірулентні і високо вірулентні. Всі вони викликають легку, середню та важку форму пневмонії крім авірулентного штаму. Джерелом збудника інфекції є хворі і перехворіли тварини-вірусоносії. У постійно неблагополучних господарствах поросята інфікуються повітряно-крапельним шляхому віці 6-12 тижнів. Хвороба у поросят протікає переважно латентно або зі слабо вираженими клінічними ознаками (зниження апетиту, лихоманка, задишка, втрата маси тіла, тощо).

Захворювання може протікати тяжче, якщо воно перебігає у конфекції з іншими респіраторними патогенами [29].

При розтині трупу можна спостерігати малопомітні зміни у легенях які варіюють від ураження малої долі легень до всієї частки. В основі макрокартини лежать вогнища катарального запалення [27].

**Цирковірусная інфекція свиней** – це хвороба яка характеризується мультисистемним виснаженням поросят після відлучення, свинячим дерматитом, синдромом нефропатії, проліферативною або некротизуючою пневмонією, та репродуктивними порушеннями у свиноматок. Збудник – цирковірус II типу (ЦВС 2 типу) являє собою одноланцюговий кільцевий вірус ДНК, що належить до роду *Circovirus*, родина *Circoviridae*. Дослідження ряду авторів показали, що ЦВС II типу має чотири генотипи: ЦВС 2а, ЦВС 2в, ЦВС 2с, ЦВС 2d які ідентифіковані завдяки філогенетичному аналізу геномних послідовностей [2]. Три основні (ЦВС 2а, ЦВС 2в, ЦВС 2с)генотипи є поширеними у всьому світі [18]. Вражає всі системи органів, що пов'язані з імунною системою. Патогенез захворювання тісно пов'язаний з імунодефіцитним станом що, виникає внаслідок інтенсивного розмноження вірусу в клітинах імунної системи. Це створює сприятливі умови для проникнення вторинних інфекцій.

Джерелом збудника цирковірусної інфекції є хворі та латентно інфіковані свині різних вікових груп, які можуть виділяти вірус з фекаліями, сечею, слиною, спермою, носовим та очним секретом. У клінічно хворих свиней спостерігається зниження вгодованості, блідість шкіри, кашель, задишка, підвищення температури тіла, часто це спостерігається у поросят 7-10 тижневого віку і старше. У більшості випадків тварини гинуть через 2-4 доби [18].

При розтині трупів загиблих або хворих тварин можна спостерігати збільшення лімфатичних вузлів зокрема пахових. Легені набряклі, гіперемійовані з ділянками ущільнення і вогнищами запалення. Збільшені в розмірах селезінка та нирки [18].

**Хвороба Ауєскі** – це висококонтагіозне захворювання, що характеризується ураженням нервової системи і органів респіраторного тракту. Збудник належить до роду *Varicellovirus*, підродини *Alpha-Herpesviridae*, родини *Herpesviridae*. Це обумовлює його основні характеристики: тропність до епітеліальних клітин і тривалу персистенцію в організмі. Хворіють свині різного віку. Особливо чутливі до вірусу є новонароджені поросята.

Передача вірусу відбувається переважно за прямого контакту з інфікованою твариною, або через забруднені (контаміновані) предмети догляду, воду чи корм.

Джерелом збудника інфекції є хворі і перехворіли свині-вірусоносії, а також латентно інфіковані тварини, які виділяють вірус у зовнішнє середовище з секретами носової і ротової порожнин, а підсисні свиноматки із молоком. Зараження відбувається переважно аерогенним і аліментарним шляхом. Інкубаційний період триває від 1 до 8 днів.

Клінічно хвороба проявляється по-різному і залежить багато в чому від віку тварин. У поросят до 3-х тижнів від народження переважно відзначають ознаки порушення центральної нервової системи, а у тварин старшого віку - респіраторну патологію: пригнічення, сонливість, чхання, кашель, задишку, виділення з носових отворів. Швидко розвиваються ознаки септицемії, запалення верхніх дихальних шляхів, набряку та запалення легенів закінчується через 1-2 дні гибеллю тварини, а прихована форма, характеризується загальною слабкістю, сонливістю, відмовою від корму, кашлем.

При розтині поросят можна спостерігати фібрoneкротичний риніт, тонзиліт, ларингіт, трахеїт, бронхіт і набряк легень. Ділянками відмічається катаральна бронхопневмонія. Біло-жовті осередки некрозу у печінці та селезінці [27].

**Класична чума свиней** – інфекційна, висококонтагіозна вірусна хвороба, яка характеризується за гострого перебігу гарячкою, явищами

геморагічного діатезу, серозного кон'юнктивіту, за підгострого й хронічного – крупозною пневмонією і крупозно-дифтеритичним колітом [3].

Хвороба уражає свійських і диких свиней. Збудник за розмірами дрібний, оболонковий, РНК-геномний вірус, який має ікосаедричний нуклеокапсид. У природних умовах вірус КЧС патогенний лише для свиней. Усі штами вірусу КЧС споріднені в антигенному відношенні і належать лише до одного серотипу. Серотип у свою чергу має 3 підгрупи серологічних варіантів (А, В, С) та 10 субтипів вірусу. Група А включає високо вірулентні штами, які викликають гострий перебіг хвороби у всіх вікових груп свиней. Гинуть всі свині незалежно від віку. Штам групи В має помірну вірулентність, що викликає гострий перебіг хвороби тільки у поросят. У дорослих свиней і свиноматок цей тип вірусу індукує атипову форму перебігу. Хронічна форма може призвести до гибелі або одужання. До групи С відносяться вакцинні штами, останні є авірулентними і практично не викликають захворювання у тварин.

Переносником збудника інфекції є хворі тварини, свині з латентною інфекцією і перехворілі свині – вірусносії. До класичної чуми свиней сприйнятливі всі вікові групи свиней. Шляхи зараження свиней – аліментарний, аерогенний, кон'юнктивальний, генітальний. Хворі тварини виділяють збудник у навколишнє середовище зі слиною, сечею, калом, назальними і слізними секретами.

Виділення вірусу відбувається до самої загибелі тварини. Якщо свиноматки заразилися епізоотичним низько вірулентним штамом, у першій половині поросності спостерігається трансплацентарне інфікування плодів, яке закінчується абортами або народженням мертвих (муміфікованих) чи слабких поросят. Поросята, які виживають, можуть не проявляти клінічних ознак, але виділяти збудник у навколишнє середовище [29,5].

Клінічні ознаки можуть майже не проявлятися або бути повністю відсутніми. У таких тварин спостерігають малорослість, атрофія тимуса і генералізоване лімфоїдне виснаження. За умови індукування поросних

свиноматок високовірулентним вірусом, тварини гинуть, або абортують, народжують слабких, нежиттєздатних поросят, які гинуть у продовж перших днів життя.

При розтині трупів крововиливи різного розміру й форми виявляють в усіх органах і тканинах. Лімфатичні вузли в ділянці голови, шиї, середостіння й брижі збільшені в розмірі, в'ялі, з мармуровим малюнком на поверхні розрізу. Легені плямисто забарвлені, з поодинокими крововиливами на поверхні. При ускладненні збудниками бактеріальної етіології в під гострому та хронічному перебігу можна спостерігати крупозно-геморагічну пневмонію, серозно-геморагічний плеврит, тощо [30].

Отже, макрокартина за респіраторної патології вірусної етіології суттєво не відрізняється одна від одної та характеризується інтерстиціальною пневмонією з некрозом бронхіолярного епітелію. Мікроскопічно пошкодження мають тенденцію обмежуватися дрібними та кінцевими бронхіолами, а також супроводжується потовщенням альвеолярних стінок шляхом інфільтрації макрофагів та набряку пневмоцитів.

## 1.2. Респіраторна патологія бактеріальної етіології

Респіраторні хвороби органів дихання бактеріального походження, в залежності від здатності викликати захворювання, поділяються на три групи [34].

До першої групи входять основні (первинні) респіраторні патогени:

**Ключові слова,** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*. При проникненні в трахею поросят вони індукують розвиток захворювання. Ці збудники володіють високою патогенністю, завдяки чому з легкістю долають легеневий імунний бар'єр.

Друга група включає другорядні (вторинні) респіраторні патогени, такі як *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis*, тому що ці мікроорганізми при потрапленні до органів дихання не

можуть викликати запалення, за умови якщо епітеліальна тканина попередньо не була пошкоджена іншими патогенами [15,22].

До третьої групи відносять збудники які при розвитку септицемії потрапляють до респіраторного тракту через кров: *Salmonella cholerae suis*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces pyogenes*, тощо [27].

**Актинобацилярна плевропневмонія свиней (АПП)** – інфекційне контагіозне захворювання, що за гострого перебігу характеризується геморагічно-некротизуючою пневмонією, а при підгострому та хронічному - вогнищевою гнійно-некротизуючою плевропневмонією і фібринозним плевритом. Збудником АПП є *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Це грамнегативна бацила, яка відноситься до сімейства *Pasteurellaceae*. Розрізняють 18 серотипів *Actinobacillus pleuropneumoniae* з яких високопатогенними є серотипи 1, 5, 9, 11, 1 серотипи, і слабо патогенні — 2, 3, 4 і 10 серотипи. Виняток становить тільки серотип 2, який на сьогодні володіє високою патогенністю в Європі [13]. Серотипи 6, 8, 12, 15, 16, 17, 18 — серотипи зі змінною патогенністю. Доведено, що в одному господарстві може циркулювати одразу декілька серотипів *Actinobacillus pleuropneumoniae*. На сьогоднішній день є ще одна класифікація, згідно якої *Actinobacillus pleuropneumoniae* поділяють за токсинами, які вони продукують. Ці токсини відповідають за формування і перебіг клінічних проявів. Для лейкоцитів сильно токсичними є Арх 1 та 3, а Арх 2 має помірну токсичність, але, при продукуванні одночасно Арх 2 і Арх 1 / 3, клінічні прояви є значно виражені. Токсин Арх 4 продукується усіма серотипами, проте не має суттєвого значення у патогенезі хвороби. Також відомо, що всі серотипи мають антигени ОМР (Outer Membrane Protein) – це зовнішні мембранні білки, які відповідають за адгезію, збудника АПП на клітинній мембрані, що є важливим при виборі біопрепаратів для специфічної імунопрофілактики. Тому, важливим аспектом є наявність цих антигенів у вакцинах, які використовуються у свинарстві [36]. Свині будь-якого віку можуть інфікуватись *Actinobacillus pleuropneumoniae*, але найчастіше діагностують



захворювання у віці від 12 до 16 тижнів. Спалахи захворювання АПП виникають зазвичай після 9 тижневого віку, коли захист від антитіл матері зникає. Саме тварини цього віку більше схильні до респіраторних захворювань, оскільки в цей час у них знижена здатність виділяти хвороботворні речовини з мокротою. Такі фактори, як холод, тепловий стрес, переповнення приміщень, знижує здатність імунної системи до боротьби з патогенними агентами [13]. Захворювання індуковане *Actinobacillus pleuropneumoniae* може перебігати в підгострій, гострій, та хронічній формах. У гострих випадках захворювання, смерть може настати протягом 24-48 годин. З носової порожнини перед смертю виділяється кровава піна, що виникає внаслідок набряку легень. Клінічні ознаки виражені під час хронічної та підгострої стадії захворювання, вони включають у себе затруднене дихання, кашель, пригнічення, адинамію, лихоманку, ціаноз та ознаки, що вказують на втрату ваги. Хронічно заражені свині є постійно інфікованими та переносять *Actinobacillus pleuropneumoniae* тривалий час [16].

При розтині трупу свині, що загинула в надгострій формі, можна спостерігати геморагічне запалення легень, зокрема серцевих і діафрагмальних часток з вираженим набряком інтерстиціальної сполучної тканини. Ділянки ураження щільної консистенції вишнево-червоного кольору, при натисканні на поверхню розрізу стікає кровяниста рідина. За гострого перебігу лобулярна пневмонія та фібринозне запалення плеври. При підгострому і хронічному перебігу - в серцевих і діафрагмальних частках легень відмічається фібринозно-некротичні або інкапсульзовані осередки, фібринозний плеврит [16].

**Ензоотична пневмонія свиней** – це інфекційне захворювання, що протікає - підгостро і хронічно, і проявляється сухим непродуктивним кашлем, бронхопневмонією та зниженням продуктивності. Збудник – *Mycoplasma hyopneumoniae*, що відноситься до сімейства *Mycoplasmataceae*, класу *Mollicutes*. Інші мікоплазми, такі як *M. Hyorhinis*, *M. Hyosinovia*, та ін.)

також здатні викликати запальні процеси в респіраторному тракті свиней. *M. hyorhynchiae* – це дрібна бактерія, яка втратила клітинну стінку. Збудник осідає на війковому епітелію верхньої частини дихальних шляхів. *Mycoplasma hyorhynchiae* може бути ключовим компонентом латентної багатофакторної пневмонії свиней у віці від 4 до 6 місяців. Проявляється у неускладненій формі кашлем, малорухливістю, втратою живої ваги та зниженням конверсії корму. Захворюваність за ензоотичної пневмонії зазвичай висока, а смертність низька, якщо вона не ускладнюється супутніми вірусними або бактеріальними інфекціями. Слід відзначити, що коінфекція *M. hyorhynchiae* і вірусу РРСС у свиней 3-х тижневого віку може виникати анорексію, лихоманку, утруднене дихання і можливо навіть смерть [27,26]. На розтині відмічають катаральне запалення верхніх дихальних шляхів, серозно-катаральну бронхопневмонію з переважним ураженням верхівкових, серцевих і діафрагмальних часток, збільшення і гіперплазію лімфатичних вузлів, іноді - плеврити, перикардити.

**Пастерельоз** – інфекційне захворювання, що проявляється кашлем, задишкою, виділення з носових отворів, ремітуючою лихоманкою та пригніченням. В окремих випадках супроводжується артритом та сепсисом. Збудник – *Pasteurella multocida* є етіологічним чинником атрофічного риніту і пневмонії свиней, а також судомної лихоманки. *P. multocida* поділяється на 5 серотипів А, В, D, Е, F. Серотип В при гострому перебігу викликає геморагічну септицемію, сепсис, набряк легень, крупозну пневмонію. При хронічному перебігу проявляється гнійно-некротичною пневмонією. Найбільш сприйнятливі до *P. multocida* свині віком від 1 до 4 місяців. Джерелом поширення збудника є хворі та перехворілі тварини які можуть розповсюджувати збудник до 1 року і більше. Фактором передачі може бути виділення з носу, фекалії, слина, предмети догляду, а також латентно інфіковані тварини, які можуть привести до спалаху захворювання. Інкубаційний період триває близько до 2-3 діб. За підгострого перебігу у хворих свиней реєструють підвищення температури тіла, пригнічення,

задишку, кашель, виділення з носу. При хронічному перебігу спостерігають симптоми пневмонії, схуднення, слабкість, іноді екзему та набряк суглобів. Серотип В *P. multocida* має підгострий, гострий і хронічний перебіг хвороби. Для підгострого перебігу характерна лихоманка з температурою тіла 41°C і вище, утруднене дихання, фарингіт, набряк підщелепового простору і в області шиї [35]. При розтині відмічаємо збільшення бронхіальних та середостінних лімфатичних вузлів. При загибелі за підгострого і хронічного перебігу захворювання в легенях знаходять різні ділянки з червоною і сірою гепатизації та серозно-фібринозний плеврит і перикардит [9].

**Хвороба Глессера (Гемофільозний полісерозит)** – інфекційне захворювання, що проявляється різними комбінаціями симптомів: менінгоенцефалітом, полісерозитом, поліартритом, а також пневмоніями. У зв'язку з цим, клінічний та патоморфологічний прояв захворювання може відрізнятися від ферми до ферми. Збудником цієї хвороби є *Glasserella parasuis* (*Haemophilus parasuis* за старою класифікацією). Відноситься до сімейства *Pasteurellaceae*. За антигенною структурою розрізняють 5 капсульних серологічних груп *G. parasuis*: А, В, С, D і N, які включають 15 серотипів збудника. Найбільш патогенними є 1, 2, 4, 5, 10, 12, 13 і 14 серовари. За біологічними властивостями збудника *G. parasuis*, має виражений тропізм до серозних оболонок. Гемофільозний полісерозит виникає спорадично або як ензоотія, майже завжди після стресу (насамперед, післявід'ємного), а також як коінфекція. Доведено, що тригером для розвитку гемофільозного полісерозиту в стаді було колонізація інфікування слизових оболонок верхніх дихальних шляхів *Bordetella bronchiseptica* та *Pasteurella multocida* [33,25].

*G. parasuis* передається при прямому контакті. Всі вікові групи поросят чутливі до інфекції та можуть бути уражені за спалаху хвороби, або на тлі інфікування тварин новим, антигенно відмінним штамом мікроорганізму. У цьому випадку перебіг захворювання гострий і проявляється підвищенням температури тіла, апатією та відсутністю апетиту. Подальший розвиток

клінічних симптомів залежить від того, де відбулася локалізація мікроорганізму. Ознаки ураження центральної нервової системи виникають внаслідок колонізації *G. parasuis* оболонки головного та спинного мозку, у наслідок чого реєструється тремор, порушення координації, парез, поза сидячої собаки. У деяких випадках переважають спалахи артритів, на тлі чого тварини кульгають. Ураження серозних оболонки грудної порожнини і легень. Виникають характерні клінічні ознаки бронхопневмонії: задишку, кашель, витікання з носа, виснаження, ціаноз кінцівок і підгруддя [14,34].

При розтині трупів поросят, які згинули за гострої форми хвороби, у грудній, черевній порожнині та серцевій сорочці виявляють значну кількість ексудату солом'яно-жовтого кольору з пластівцями фібрину. При підгострому і хронічному перебігу - кількість ексудату менше, але відзначають велику кількість фібрину у вигляді плівок, що покривають серцеву сорочку, плевру, очеревину. У черевній порожнині знаходять численні фібринозні спайки кишечника. У суглобах збільшено кількість синовіальної рідини з домішками фібрину. У верхівкових і серцевих частках легень виявляють вогнища серозно-катарального запалення [35].

**Атрофічний риніт** – інфекційна висококонтагіозна хвороба свиней, що характеризується масовим розвитком серозно-гнійного риніту, чханням, кашлем, катарально-гнійною пневмонією, атрофією носових раковин. Свині відстають у рості та розвитку. Збудником є *Bordetella bronchiseptica*, що відноситься до сімейства *Pasteurellaceae*. За О-антигенами розрізняють 3 основні серотипи - О1, ПРО5 і О7. Часто хворіють свині в підсисний та відлучний період, але сприйнятливими є всі вікові групи. Свині бактеріоносії можуть виділяти збудник упродовж 12 місяців під час чхання, кашлю, та з носовими витіками. Передача здійснюється аліментарно, аерогенно та контактним шляхом. Основними факторами передачі є корм, вода, підстилка, предмети догляду, гризуни. У господарствах, де не дотримуються ветеринарно-санітарних норм, незадовільні умови утримання та годівлі, збудник приймає стаціонарний статус і несе за собою високу смертність

серед поросят. Інкубаційний період триває 14-20 днів. Трапляються випадки ускладнення хв. Глессера секундарною мікрофлорою. Захворювання має гострий, підгострий або хронічний перебіг. При гострому перебігу реєструються: прискорене дихання, лихоманка з періодичним підвищенням температури тіла до 41,0°C, кон'юнктивіти, слизисто-гнійні виділення з носа, чхання з тривалістю до 14-20 днів. При підгострому і хронічному перебігу, який ускладнюється секундарною мікрофлорою в запальний процес втягуються інші органи і тканини. Падіж поросят може досягати 20-30% і більше [4].

При розтині тварин, у легенях знаходять вогнища запалення різної величини синювато-рожевого кольору з дрібними некротичними вузликами коричневого кольору. Збільшення і гіперемію бронхіальних лімфатичних вузлів, гіперемію слизових оболонок трахеї, бронхів, а в їх просвіті - скупчення слизу. При хронічному перебігу з ускладненням хвороби секундарною мікрофлорою відзначають фібринозний плеврит, перикардит, абсцеси в легенях.

**Стрептококова інфекція** - інфекційне захворювання, що проявляється менінгітом, артритом, септицемією і пневмонією. Стрептококоз викликають мікроорганізми роду *Streptococcus spp.* Це грампозитивні, круглі до овальних(ланцетовидних) форми коки, розміром до 2 мкм, розташовані парами або ланцюжками різної довжини. Сучасна класифікація стрептококів заснована на антигенній структурі, яка визначається реакцією преципітації за рахунок групової полісахаридної речовини, але в патології свиней найбільш патогенні є стрептококи серологічних груп А, В, С, D, Е [15].

Стрептококи мають ряд факторів патогенності: гемолізину О і S, які руйнують еритроцити, та токсично впливають на кардіоміоцити. Лейкоцидини вражають нейтрофілів та макрофагів викликають структурні зміни в еритроцитах. Клінічна картина залежить від серологічної групи, ступеня патогенності, сприйнятливості господаря, тощо. Стрептококи у свиней можуть викликати менінгіти, лімфаденіти, артрити, риніт, пневмонію,

тощо. Найбільш сприйнятливі новонароджені поросята у яких ця хвороба протікає гостро і супроводжується септицемією. Сприйнятливі також і маточне поголів'я у період поросності та після опоросу. Шляхами зараження можуть бути пошкоджена шкіра вимені, а також при попаданні збудника інфекції на слизові оболонки органів дихання, травлення, статевого апарату. Первинним джерелом інфекції у господарствах служать свиноматки, хворі ендометритом і маститом. У таких тварин збудник часто знаходять у вимені при абсцесному маститі, в матці при ендометриті на слизових оболонках органів дихання. Поросята інфікуються головним чином від хворих свиноматок аліментарним і аерогенним шляхом, а також через травми шкіри. У більшості випадків стрептококова інфекція у поросят протікає спорадично. Рідше він набуває ензоотичний характер. Спалахи стрептокової інфекції спостерігаються здебільшого в період опоросів. При гострому перебігу хвороби відзначають підвищення температури тіла до 42°C і вище, порушення координації руху, судоми, втрату апетиту, запалення суглобів, утруднене дихання, задишка [31,20].

При розтині тварин у черевній порожнині можна спостерігати геморагічний ексудат. Легені ущільнені з множинними гнійниками, фібринозні спайки на плеврі та серцевій сумці. Патологічні зміни можуть бути як в органах дихання, так і в травній системі. При стрептокової септицемії у поросят домінуючими ознаками є стійкі геморагічні явища: геморагічний гастроентерит, геморагічний лімфаденіт, геморагічний некротичний міокардит.

Отже, збудники респіраторної патології бактеріальної етіології можуть виступати як самостійні агенти, які безперешкодно долають природній бар'єр викликаючи при цьому розвиток патологічного процесу, так і як вторинні, які ускладнюють перебіг патології індукованої іншими факторами шляхом колонізації тканин органів дихання.

### 1.3. Лабораторна діагностика респіраторної патології свиней

Симптоми та патологічні зміни за респіраторної патології у свиней є специфічними завдяки участі у патогенезі різних інфекційних агентів. Тому діагностика є складною і повинна включати одночасно декілька методів. Перш за все збирають клініко-анамнестичні дані та епізоотичну ситуацію. Цінною є інформація стосовно технології утримання тварин, вікова категорія свиней, у яких проявляється захворювання захворілих, схеми вакцинації, які проводяться у господарстві, захворюваність та смертність, лікувальні та профілактичні заходи, тощо [24].

Патологоанатомічна діагностика займає одне із головних місць серед методів діагностики респіраторної патології у свиней. Чим швидше була проведена посмертна діагностика тяжко хворих тварин, тим вище ймовірність встановлення точного діагнозу через мінливість патоморфологічних змін при респіраторній патології [35]. Якщо ураження виявлені у більш ніж 15% від загальної площі легень, це може вказувати на наявність ензоотичної пневмонії у стаді. У господарствах, вільних від *M. hyopneumoniae*, ураження легенів більш ніж у 1% свиней, спостерігається рідко [26, 27].

Лабораторна діагностика дає більш детальну інформацію про спектр та види патогенних агентів, що спричинили захворювання, а також імунний статус стада. Для проведення лабораторного дослідження у тварин прижиттєво відбирають назальні та бронхо-альвеолярний лаваш. Серологічні тести забезпечують точність діагнозу. У змішаній системі досліджують сироватку свиней різних вікових груп, навіть якщо захворювання зустрічається лише у деяких з них (чим більша захворюваність у групі, тим більша кількість обстежуваних тварин).

Лабораторну діагностику збудників респіраторної патології проводять прямим та непрямими методами. До прямих методів відносять ідентифікацію

вірусу з використанням полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) та ізоляція збудників на живильних середовищах, подальша їх ідентифікація і типізація.

До непрямих методів відносять серологічні тести які спрямовані на виявлення специфічних до антигенів збуднику антитіл: імуноферментний аналіз (ІФА) та реакція нейтралізації (РН), тощо.

Збудників респіраторної патології зажиттєво можна виділити із слини, бронхо-альвеолярного лаваша, мазків з носу. Для посмертної діагностики кращими зразками є легені, середостінні лімфатичні вузли. Відібрані зразки тканин гомогенізують і додають клітине культуральне середовище з додаванням антибіотиків. Суспензію яку було отримано після гомогенізації центрифугують на низькій швидкості впродовж 8 хвилин. Виділення вірусу *Influenza A* може проводитися на безперервних клітинних лініях і в курячих ембріонах. Також слід зауважити, що збудники вірусної етіології в короткі терміни (1-4 дні) проявляють свій цитопатичний ефект. Цей метод є ефективним але трудомістким.

Збудники бактеріальної етіології культивуються на специфічних живильних середовищах. *P. multocida* культивується казеїновому ,сахарозному, дріжджовому агарі, що містить 5% крові. Звичайна кров'яний агар також може бути використаний. *A. pleuropneumoniae* культивується на агарі PPLO. Вторинний посів проводять на агар PPLO з NAD, агар Макконкі, і на агарі з баранячої крові, щоб дослідити ріст збудника [31]. *Salmonella* культивується на живильних середовищах Агар з сульфідом вісмуту але трапляються випадки що в зразках наскільки мало бактерії, що їх потрібно збагачувати перед посівом на агар. Відібраний зразок потрібно витримувати в селенітному бульйоні або соєво пептоновому бульйоні які містять поживні речовини. Стандартним живильним середовищем для культивування *Salmonella* є кров'яний агар [11].

Таким чином, культивування збудників бактеріальної етіології є ефективним враховуючи всю свою трудомісткість виконання методики.



Майже всі живильні середовища для них є стандартними, але є виключення і це пов'язано з примхливістю росту НАД-залежних мікроорганізмів.

Ідентифікація збудників респіраторної патології за допомогою полімеразно ланцюгової реакції ґрунтується на селективній реплікації частин геному, які є унікальними для кожного збудника. Використовують два праймери які розташовані на кожному кінці різної послідовності. ПЛР діагностика ґрунтується на основних етапах: екстракції нуклеїнових кислот, безпосередньо полімеразно-ланцюгова реакція та кінцева ідентифікація результату ампліфікації.

Перший етап оснований на денатурації ДНК що знаходиться в матеріалі. Для цього потрібно розпнути дволанцюгову молекулу ДНК щоб утворилося дві одноланцюгові молекули. Передумовою для цього є нагрівання до 92–95°C на протязі 1 хвилини.

Другий етап – відпал. Температуру реакційної суміші знижують до 55°C, в цей момент праймери приєднуються до одноланцюгові ДНК-мішені. Праймери повинні бути комплементарні протилежним ланцюгам ДНК.

Третій етап – елонгація, або другими словами синтез ДНК. На цьому етапі щоб забезпечити оптимальну роботу Таq-полімерази, температура реакційної суміші повинна досягти позначки оптимуму – 75°C. Якщо ця умова виконана починається синтез комплементарного ланцюжка ДНК, ініційований 3'-гідроксильною групою праймера, який проходить з максимальною ефективністю.

В подальшому ці етапи по черзі повторюються в своїй послідовності що найменше 30 разів, додаючи з кожного циклу копію синтезованого фрагменту ДНК.

1. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, ПЛР-ПДРФ – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів). Спочатку проводять ПЛР, а потім – рестрикцію отриманого ПЛР-продукту [12].

2. Real-time PCR (ПЛР у реальному часі). Спостерігають за реакцією в реальному часі, безпосередньо вимірюючи накопичення продукту ПЛР в

кожному циклі. Принциповою особливістю методу ПЛР в режимі реального часу, на відміну від класичної ПЛР, є можливість кількісного визначення ДНК/РНК в досліджуваному матеріалі, відсутність стадії електрофорезу, менш суворі вимоги до організації ПЛР-лабораторії та автоматична реєстрація та інтерпретація отриманих результатів [23].

3. RT-PCR (ПЛР з використанням зворотної транскрипції). З РНК, за допомогою ферменту зворотної транскриптази отримують ДНК. Потім з отриманої ДНК проводять власне ПЛР дослідження. Це зручно, для виявлення генів які вданій клітині експресуються [32].

4. Вкладена ПЛР «Nested PCR». Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів потрібна для ампліфікації ДНК усередині продукту первинної реакції. Цей метод застосовують для зменшення кількості побічних продуктів реакції.

5. Inverse PCR «Інвертована ПЛР». Цей метод є корисним у випадку, якщо завчасно відома лише невелика ділянка всередині потрібної послідовності. Базується на ряді послідовних розрізів ДНК рестриктазами з подальшим лігуванням. Результатом є утворення фрагментів на обох кінцях невідомої ділянки [12].

6. Асиметрична ПЛР Asymmetric PCR. Проводиться у випадку тоді коли є необхідність в ампліфікації одного з ланцюжків початкової ДНК, з використанням деяких методик секвенування і гібридаційного аналізу початкової ДНК. ПЛР проводиться за звичним сценарієм [23].

7. ПЛР довгих фрагментів «Long-range PCR». Методика виявлення довгих ділянок ДНК. Для цього потрібно дві полімерази, одна – Taq-полімераза, друга – ДНК полімераза з 3'-5'-ендонуклеазною активністю. Taq-полімераза здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК, а друга необхідна для корегування помилок першої [10].

8. Multiplex PCR (мультиплексна ПЛР). Цей метод базується на використанні кількох пар праймерів з одночасною ампліфікацією декількох фрагментів [28].

Отже, метод ПЛР здатний ідентифікувати ДНК або РНК мікроорганізмів, які важко піддаються культивуванню. Чутливість цього методу наближається до 10 клітин у відібраній пробі.

Основою серологічної діагностики є метод ІФА який призначений для виявлення специфічних антитіл до збудників різної етіології у сироватці крові тварин. Антиген який адсорбований в лунках планшету, зв'язується зі специфічними антитілами, які присутні в сироватці крові, в результаті чого формується комплекс антиген-антитіло. Отриманий імунний комплекс виявляється кон'югатом, фермент якого, після додавання субстрату, викликає розпад субстрат-індикаторного розчину і утворення розчинного забарвленого продукту. При цьому інтенсивність забарвлення розчину в лунці пропорційна вмісту антитіл в досліджуваному матеріалі [17].

Метод ІФА має ряд переваг так і недоліків. Переваги методу базуються на високій чутливості, проводиться за короткі терміни, специфічний. До недоліків відносять виникаючі неспецифічні крос-реакції, виявляє не самого збудника а вторинні ознаки інфекційного процесу. ІФА можна вважати високотехнологічним методом яким дає можливість диференціювати хворих свиней від тих які були вакциновані [17].

Для виявлення антитіл до збудників респіраторної патології було створено комерційні тест-системи різних виробників такі як:

- для *Influenza A*:
  1. ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species («ID vet» Франція);
  2. Swinecheck MP® SIV («Biovet» Канада);
  3. Swinecheck® H1N1 («Biovet» Канада);
  4. IDEXX Swine Influenza Virus Ab Test («IDEXX» США);
- для *PRRS*:
  1. BIO-T KIT® PRRSV – SDRP («Biosellal» Франція);
  2. Swinecheck MP® PRRSV («Biovet» Канада);
  3. ID Screen® PRRS Indirect («ID vet» Франція);

4. IDEXX PRRS X3 Ab Test (Outside the U.S.) («IDEXX» США);
  5. INgezim PRRS 2.0 («Ingenasa» Іспанія).
- для *Circovirus types II*:
    1. Swinecheck MP® PCV2 («Biovet» Канада);
    2. INgezim Circo IgG («Ingenasa» Іспанія);
    3. The two ELISA test kits are: SERELISA® PCV2 Ab («Synbiotics» США).
  - для Ауєскі:
    1. ID Screen® Aujeszky gB Competition («ID vet» Франція);
    2. Pseudorabies Virus (PRV)/Aujeszky's Disease (ADV) («IDEXX» США);
    3. SVANOVIR® PRV gB-Ab («Svanova» Швеція);
    4. AD Ab ELISA 480 («TEST\_LINE» Чехія).
  - для класичної чуми свиней:
    1. ID Screen® Classical Swine Fever E2 Competition («ID vet» Франція);
    2. IDEXX CSFV Ab Test («IDEXX» США).
  - для АПП 1-12:
    1. ID Screen® APP Screening Indirect (serotypes 1 through 12) («ID vet» Франція);
    2. IDEXX APP-ApxIV Ab Test («IDEXX» США);
    3. Swinecheck® APP 2 («Biovet» Канада);
    4. Swinecheck® APP 3, 6, 8, 15 («Biovet» Канада);
    5. INgezim APP MIX («Ingenasa» Іспанія).
  - для *Mycoplasma hyopneumoniae*:
    1. ID Screen® Mycoplasma hyopneumoniae Competition («ID vet» Франція);
    2. IDEXX M. hyo Ab Test («IDEXX» США).

Таким чином, метод ІФА є специфічним, чутливим і високотехнологічним, та дозволяє діагностувати захворювання за наявністю у сироватці крові антитіл до антигенів збуднику інфекційної патології.

Отже, для точної діагностики інфекційних хвороб тварин найбільш ефективним є комплексне застосування ПЛР та ІФА, оскільки саме поєднання цих методів, з метою вирішення діагностичних завдань, надає найбільш ефективний результат [31].

## 2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Матеріали і методи дослідження

Дипломна робота виконана в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету за науково-технічним договором, умовою якого є: «Результати проведених лабораторних аналізів та інша інформація про замовника, отримана виконавцем у зв'язку з виконанням ним робіт за даним договором, є конфіденційною, виконавець не має права надавати такі відомості іншим особам без дозволу замовника», тому у роботі назва підприємства не вказується.

Матеріал для дослідження відбирався у господарстві циклу опорос – відгодівля загальною чисельністю – більше 30000 голів.

Провівши аналіз анамнестичних даних було з'ясовано, що група свиней кількістю 600 голів була переведена у сектор відгодівлі на 90-95 добу життя. Після переведення тваринам з профілактичною метою 14 діб з кормом згодовували антибіотики. Через 14 діб після припинення згодовування антибіотиків, із 120 доби життя свиней, було виявлено високу добову смертність – 2,7 % та захворюваність – більше 3,8 %. У деяких свиней спостерігалась підвищення температури тіла, відмова від корму, тяжке дихання, черевний тип дихання, свині приймають позу сидячої собаки. Хворих свиней лікували цефалоспоринами.

Матеріалом для індикації збудника респіраторної патології методами ПЛР і класичної бактеріології були легені та лімфатичні вузли від свиней групи відгодівлі, які загинули з яскраво вираженими клінічними ознаками респіраторної патології у віці 120, 135, 150 діб життя. З кожної вікової групи відбирали по 3 органо – комплекси ( легені, серце, середостінні лімфатичні вузли). Які були доставлені в лабораторію впродовж доби. Було проведено

патологоанатомічний огляд, бактеріологічний посів на живильних середовищах та ПЛР дослідження з використанням комерційних тест-систем виробництва Biosellal (Франція) та Exopol (Іспанія).

#### *Патологоанатомічний огляд органокомплексів*

Методика патологоанатомічного огляду складається з наступних характеристик:

1. Визначення об'єму легень по характеру країв (притуплені краї – об'єм збільшений; загострені краї – об'єм зменшений). Збільшення об'єму легень відбувається внаслідок розвитку застійної гіперемії, яка несе за собою набряк легень і притупленість країв легень.

2. Форма органу здебільшого не змінюється, за виключенням лейкозних або пухлинних розростань.

3. Колір органу за патологічних змін неоднорідний: від темно – червоного наслідок застійної гіперемії і набряку до яскраво рожевого – ділянки компенсаторної емфіземи, яка виступає над поверхнею легень. Як правило спостерігається чергування різних ділянок, внаслідок розвитку компенсаторних механізмів. Під час огляду легень використовують «пробу на плавання», коли шматочки легень невеликого розміру кидають в прозору скляну посудину з водою. Якщо легені тонуть чи плавають в середніх шарах рідини це означає, що повітряність органу знижена.

4. Консистенція легень за набряку може бути тістувата за рахунок накопичення рідини, альвеоли частково або повністю западаються (дистолектази та ателектази). Ділянки пневмонії в легенях, наприклад при (*Mycoplasma hyopneumoniae* або гострій формі *Actinobacillus pleuropneumoniae*) вони схожі на печінку (щільні), внаслідок випотівання фібрину та еритроцитів і надає органу консистенцію печінки.

5. Поверхня на розрізі дає допоміжну інформацію щодо внутрішньої структури органу. За умови застійної гіперемії з поверхні розрізу стікає кров, а при червоній гепатизації – нагадує печінку, внаслідок просочування паренхіми фібрином та еритроцитами.

### *ПЛР дослідження*

Для ПЛР дослідження з біологічного матеріалу готували 10% суспензію, для цього: фрагменти легень та лімфатичні вузли поміщали в одноразові пробірки об'ємом 2 мл. які містили 1мл. фізіологічного розчину та три скляні кульки діаметром 2 мм. Пробірки з дослідним матеріалом поміщали в прилад для гомогенізації «FastPret-24». Після гомогенізації отриману рідину осаджували за допомогою високошвидкісної мікроцентрифуги «MiniSpin» при 13000 об/хв 2 хв. Для екстракції нуклеїнових кислот використовували 200 мкл. надосадової рідини.

Естракцію нуклеїнових кислот проводили за допомогою автоматизованої станції «KingFisher Duo» з використанням комерційного набору для екстракції нуклеїнових кислот «BioExtract SuperBall» (Франція) який оснований на магнітних часточках (додаток 2).

Набір призначений для очищення одно- і дволанцюгових молекул ДНК довжиною понад 100 нуклеотидів. Очищення на магнітних частинках дозволяє видалити інгібітори ПЛР, які можуть залишатися в зразку при виділенні ДНК іншими методами.

Принцип методу заснований на зв'язуванні ДНК з магнітними частками, які легко осідають у суспензії за допомогою магнітного поля.

Метод не вимагає фільтрації ДНК через сорбент методом центрифугування, що знижує ймовірність деструкції молекул ДНК. Отримана ДНК вільна від сторонніх домішок та може використовуватись у будь-яких молекулярних дослідженнях.

*Методика екстракції НК (нуклеїнових кислот) з біологічного матеріалу за допомогою системи виділення «kingfisher duo».*

1. Реактиви і розчини для екстракції НК:

Для проведення виділення НК з біологічного матеріалу потрібно такі реактиви:

Реактив №1 - LA Buffer (1 аліквота = 100 мкл);

Реактив №2 (2 шт.) - LB Buffer концентрований (1 аліквота = 400 мкл);



- Реактив №3 - Proteinase K (1 аліквота = 20 мкл);  
 Реактив №4 - RNA Carrier (1 аліквота = 1 мкл);  
 Реактив №5 - Magnetic Beads (SMB) (1 аліквота = 25 мкл);  
 Реактив №6 - W1 Buffer концентрований;  
 Реактив №7 - W2 Buffer концентрований;  
 Реактив №8 - EL Buffer.

Додаткові реагенти:

- Реактив №9 - Етанол (96-100%);  
 Реактив №10 - Ізопропанол (100%).

## 2. Підготовка реагентів перед початком роботи

Перед початком виділення НК готують дезактиваційний розчин для знешкодження відпрацьованого пластику. Для чого змішують 15 мл засобу універсального «Domestos» та 1,5 літри дистильованої води.

Перед початком роботи підготувати реагенти відповідно до (табл. 1):

*Таблиця 1*

### Підготовка реагентів

Реагент	Підготовка
RNA Carrier	До ліофілизованого RNA Carrier додати 310 мкл EL Buffer
LB Buffer	До концентрованого LB Buffer додати 40 мл ізопропанолу
Buffer W1	До концентрованого Buffer W1 200 мл етанолу
Buffer W2	До концентрованого Buffer W1 252 мл етанолу

## 3. Проведення виділення НК з біологічного матеріалу

3.1. Приготувати розчин для лізису «LAB-SMB-carrier». Для цього в окремій пробірці змішати реагенти відповідно до (табл. 2) (додаток 3).

Таблиця 2

## Підготовка реагентів для лізису

Реагент	Кількість зразків				
	1	5	10	12	24
LA Buffer	100 мкл	550 мкл	1,1 мл	1,32 мл	2,64 мл
LB Buffer (розведений)	400 мкл	2,2 мл	4,4 мл	5,28 мл	10,56 мл
Magnetic Beads	25 мкл	137,5 мкл	275 мкл	330 мкл	660 мкл
RNA Carrier	1 мкл	5,5 мкл	11 мкл	13,2 мкл	26,4 мкл
IPC, за необхідності	5 мкл	27,5 мкл	55 мкл	66 мкл	132 мкл

3.2. В ряд E 96-луночного планшету додати по 700 мкл W1 Buffer (розведеного етанолом).

3.3. В ряд F 96-луночного планшету додати по 700 мкл W2 Buffer (розведеного етанолом).

3.4. В ряд G 96-луночного планшету додати по 750 мкл етанолу.

3.5. В стрип для елюції (в кожен лунку) додати по 100 мкл EL Buffer.

3.6. В ряд A 96-луночного планшету додати по 20 мкл Proteinase K. Потім додати від 100 до 200 мкл досліджуваних зразків. Далі додати по 500 мкл приготовлений розчин для лізису «LAB-SMB-carrier».

3.7. Увімкнути прилад для виділення «kingfisher duo». Помістити у прилад 96-луночний планшет із зразками і реактивами та стрип для елюції. Вставити накінцівник для магнітної головки в ряд B 96-луночного планшету.

3.8. В меню приладу вибрати протокол виділення «BioExtract\_KF\_Duo», натиснути кнопку «START».

3.9. Після закінчення процедури виділення нуклеїнових кислот (приблизно 38 хвилин) перенести нуклеїнові кислоти у нові чисті пробірки.

Прилади та матеріали якими користувалися для виділення НК та приготування реакційних сумішей:

- холодильник/морозильна камера (+2 -8 °C/ -20°C);
- гомогенізації «FastPret-24»;

- мікроцентрифуга швидкісна “Eppendorf MiniSpin” - швидкість обертання ротору до 13400 об./хв.;
- центрифуга-шейкер – “Vortex”;
- термоблок з підігрівом верхньої кришки;
- мікродозатори перемінного об’єму (0,5-10 мкл. 10-20 мкл. 20-200 мкл. 100-1000 мкл.) “Biohit Proline”;
- одноразові накінцівники з аерозольними бар’єрами та пробірки типу “Eppendorf” ємністю 0,2 мл. 0,5мл. 1,5 мл.;
- штативи для пробірок та мікропробірок;
- ламінарна шафа;
- ПЛР бокс;
- електронні ваги;
- ємність з дезінфікуючим розчином для відходів;

Безпосередньо ПЛР-РЧ проводили з використанням комерційних тест-систем виробництва Biosellal (Франція) та Echorol (Іспанія). Приготування реакційних сумішей, ампліфікацію та облік результатів виконували відповідно до настанов (інструкцій) виробників.

Для діагностики РРСС та грипу типу А (РНК геномних патогенів) використовували тест-системи виробництва Biosellal, Франція. Які мають у своєму складі: позитивний контроль, негативний контроль, екзогенний внутрішній контроль, готова реакційна суміш. Ампліфікацію проводили за наступними температурними циклами (табл. 3).

Таблиця 3

### Температурні цикли в ампліфікації

Етап	Температура $^{\circ}\text{C}$	Час сек.	Кількість циклів
Зворотня транскрипція	50	1200	1
Активація полімерази	95	300	1
Денатурація	95	10	45
Відпал праймерів/Елонгація	60	45	

Облік результатів респіраторно-репродуктивного синдрому свиней проводили за такими барвниками:

FAM – РРСС європейський генотип;

VIC/HEX – американський генотип;

Su5 – екзогенний внутрішній контроль;

Облік результатів грипу типу А проводили за такими барвниками:

FAM - грипу типу А

VIC/HEX - екзогенний внутрішній контроль;

Su5 – ендogenousний внутрішній контроль.

Для виявлення інших патогенів (*Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus suis*, *Salmonella spp*, *Circovirus type 2*, *M. hyorhinis*, *H. pararasuis*, *P. multocida*, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*) використовували тест-системи Ехорол, Іспанія. Для кожного інфекційного агента окремий тест набір. Температурні цикли які використовуються в усіх наборах Ехорол (табл. 4).

Таблиця 4

#### Температурні цикли для тест-набору Ехорол

Етап	Температура $^{\circ}C$	Час сек.	Кількість циклів
Активація полімерази	95	300	1
Денатурація	95	15	45
Відпал праймерів/Елонгація	60	60	

Облік результатів у тест-системах Ехорол проводили за такими каналами детекції флуоресценції:

FAM – ДНК цільового мікроорганізму.

VIC/HEX - ендogenousний внутрішній контроль (ДНК клітин свиней).

Ампліфікацію та облік результатів проводили за допомогою приладу “BioRad CFX 96” США із встановленим відповідно програмним забезпеченням до нього.

Для того, щоб виключити можливу перехресну контамінацію під час проведення виділення ДНК та приготування реакційної суміші паралельно ставили негативний контрольний зразок з дистильованої води – НКЗ-В (негативний контрольний зразок виділення), НКЗ-РС (негативний контрольний зразок реакційної суміші), та позитивний контрольний зразок (ПКЗ).

Для підрахунку кількості геном-еквівалентів (г.с.) виявлених патогенів використовували калібрувальний графік, який будували за допомогою програмного забезпечення CFX 96 та стандартного контрольного зразку, що входить до складу наборів.

#### *Бактеріологічне дослідження*

Для вирощування збудників респіраторної патології бактеріальної етіології в умовах лабораторії, використовують прості та спеціальні поживні середовища такі як(додаток 1):

- М'ясо-пептоновий агар (МПА);
- Кров'яний агар;
- Шоколадний агар (за Френцісом);
- Середовище Ендо;
- Середовище Олькеницького;
- Середовище Сімонса;
- Лізиновий агар;

Перший етап бактеріального дослідження заключається в методиці приготування живильних середовищ. Так як бактерії під час росту потребують значну кількість азоту, вуглецю та водню для побудови власних білків. Джерелом водню і кисню виступає вода. А речовини тваринного походження виступають джерелом азоту (м'ясо яловиче, м'ясо-кісткова мука, риба). Для більш примхливих в рості мікроорганізмів до складу середовища використовують нативні субстрати ( цільну кров, сироватку крові, шматочки нирок, печінку, мозкову тканину).

Основою для приготування кров'яного агару є комерційний МПА (м'ясо-пептоновий агар), який випускається у виді порошку. Змішують 1 л. дистильованої води з 28 гр. порошкоподібної суміші МПА, до складу якої входить (пептичний перевар тваринної тканини – 5,0 г/л; натрію хлорид – 5,0 г/л; м'ясний екстракт – 1,50 г/л; дріжджовий екстракт 1,50 г/л; агар-агар – 15,00 г/л). Проварюємо на печі до повного розчинення. Потім розливаємо по скляним ємкостям, об'ємом 200 мл. і автоклавуємо 15 хв. за температури 121°C, з тиском в 1.5 МПа. Після автоклавування чекаємо поки температура суміші не знизиться до 50°C і додаємо цільну кров взяту від ВРХ або ДРХ, змішуємо і розливаємо по чашкам Петрі.

Для приготування шоколадного агару (за Френцісом) беремо 100 мл. МПА (м'ясо-пептоновий агар) у виді готової суміші поміщаємо в автоклав на 15 хв. Паралельно центрифугуємо кров взяту від ВРХ або ДРХ при 40 об/хв. на протязі 5 хв. Видаляємо сироватку крові а гемолізований осад виливаємо в гарячий МПА, добавляючи 1 мл. гемофільозного середовища (НАД 7,50 мг/500 мл; гематин 7,50 мг/500 мл.). Потім ретельно розмішуємо і розливаємо в одноразові стерильні чашки Петрі.

Приготування середовища Ендо. Беремо дистильовану воду додаємо 41,5 г. агару Ендо – готова порошкоподібна суміш до складу якої входить (пептичний перевар тваринної тканини – 10,0 г/л; лактоза – 10,00 г/л; калій гідрофосдат – 3,50 г/л; натрію сульфат – 2,50 г/л; фуксин основний – 0,50 г/л; агар-агар – 15,00 г/л) ставимо на електричну піч і готуємо до повного розчинення. Після розчинення розливаємо в скляні ємкості об'ємом 200 мл. і автоклавуємо 15 хв. за температури 121°C, з тиском в 1.5 МПа. Розливаємо в стерильні чашки Петрі та залишаємо на 10 хв. до повного охолодження.

Приготування середовища Олькеницького на якому виявляють біохімічні властивості культури. Готують за такою самою методикою як МПА і Ендо тільки пропорція порошкоподібної суміші 65,0 г. на 1000 мл. дистильованої води. До складу середовища Олькеницького входить ( пептон – 10,00 г/л; гідролізат казеїну – 10,00 г/л; дріжджовий екстракт – 3,00 г/л;

м'ясний екстракт – 3,00 г/л; лактоза – 10,00 г/л; сахароза – 10,00 г/л; глюкоза – 1,00 г/л; натрію хлорид – 5,00 г/л; заліза сульфат – 0,20 г/л; натрію тіосульфат – 0,30 г/л; феноловий червоний – 0,024 г/л; агар-агар – 12,00 г/л.

Приготування рідкого накопичувального живильного середовища СМБ (серцево-мозковий бульйон) (рис. 1). Беремо 1л. дистильованої води додаємо порошкоподібне середовище СМБ. Потім автоклавуємо при температурі 121°C, з тиском в 1.5 МПа. Після чекаємо певний час поки середовище охолоне і розливаємо по пластиковим пробіркам під певним кутом.



Рис. 1. Серцево-мозковий бульйон для накопичення мікроорганізмів

Другий етап – це відбір матеріалу. Для цього потрібно спиртівку, шпатель, пінцет, стерильні ватні палички (аплікатори). Інструменти фламбуємо над пальником і обробляємо 96% етиловим спиртом. Щоб знезаразити місце відбору, попередньо розігрітим шпателем, межу ураженої та не ураженої ділянки легень припікаємо. Фламбуємо ножниці і робимо розріз у місці припікання. Стерильним ватним аплікатором робимо мазок у місці розрізу, і робимо нативний мазок на живильних середовищах Ендо, кров'яному агарі і шоколадному агарі. До цього нативного мазка потрібно підсіяти *Staphylococcus aureus* (рис. 2), так як він гемолізує еритроцити біля

нього ростуть примхливі збудники такі як: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (рис. 3) та *Glasserella parasuis*.



Рис. 2. Зняття колонії *Staphylococcus aureus* та підсіву її на нативний мазок



Рис. 3. Ріст *Actinobacillus pleuropneumoniae* на кров'яному агарі з підсівом *Staphylococcus aureus*

Посіви на живильних середовищах ставимо у термостат на одну добу при температурі 37°C (рис. 4). Наступного дня аналізуємо фактичний ріст нативного мазку. З СМБ (серцево-мозкового бульйону) пересіваємо на середовища Ендо і кров'яний агар. Після накопичення робили вторинний



посів на трердих живильних середовищах і термостатували при температурі 37°C на добу. Потім посіви проглядали на наявність типових колоній, для збудників інфекцій проводили ізоляцію чистої культури. З колоній готували мазки та ставили культуру «Стрепто Т-16», фарбували за Грамом і ставили антибіотикограму.



Рис. 4. Термостат сухоповітряний ТВ-80-1

Ідентифікацію виділених культур проводили за біологічними властивостями бактерій: морфологією, культуральними та біохімічними властивостями за загально прийнятими у мікробіології методами.

Для визначення чутливості досліджуваних штамів до антибіотиків використовували метод дифузії в агар із застосуванням стандартних паперових дисків. Для посіву використовували легені трьох вікових груп 120; 135; 150 д.ж. З кожної вікової групи брали на дослідження по три комплекта легень і перевіряли на чутливість до антибіотиків.

Інтерпретцію результатів здійснювали як «чутлива» (Ч); «помірно чутлива» (ПЧ); «нечутлива» (НЧ); «не проводилась чутливість» (Н/П) (Табл. 5).

Таблиця 5

**Чутливість культур до антимікробних препаратів**

№	Антибіотик	Чутлива, мм	Помірно чутлива, мм	Резистентна, мм
1	Амоксицилін	18	17-15	14
2	Амоксициліну клавулановою кислотою <sup>3</sup>	20	-	19
3	Доксициклін	19	18-15	14
4	Енрофлоксацин	20	19-17	16
5	Лінкоміцин	24	23-20	19
6	Окситетрациклін	19	18-15	14
7	Тетрациклін	19	15-18	14
8	Тіамулін	21	20-14	13
9	Триметоприм	18	15-17	15
10	Сульфаметоксазол	18	15-17	15
11	Флорфенікол	20	19-17	16
12	Цефазолін	24	-	-
13	Ципрофлоксацин	21	20-16	15
14	Тилозин	22	23-25	26

Для контролю точності результатів на чутливість, паралельно з досліджуваним зразком використовували еталонні зразки. Якщо діаметр зони росту еталонного штаму виходить за межі допустимого, результат рахують недійсним і це в першу чергу залежить від якості самого середовища, якості використовуваного диску або порушення в етапності постановки. Вимірювання зони росту здійснюється лінійкою, точність повинна бути до 1 мм, включаючи розмір диску. Трапляються в зоні затримання росту і ріст чужорідних колоній, які свідчать про контамінацію середовища сторонньою мікрофлорою. Відповідно до мети роботи, потрібно було визначити чутливість виділених штамів до таких антибіотиків: амоксицилін, амоксицилін+клав. к-та, доксициклін, енрофлоксацин, лінкоміцин, окситетрациклін, тетрациклін, тилозин, тіамулін, триметоприм/сульфа, тулатроміцин, флорфенікол, цефтіофур, цефазолін, цефтіофур, ципрофлоксацин.

Спектр дослідження бактеріальних збудників: сім. *Enterobacteriaceae*: *p.Escherichia*, *p.Salmonella*, *p.Yersinia*, *p.Enterobacter*, *p.Proteus*, *p.Klebsiella* та ін.; *p.Proteus*, *p.Klebsiella* та ін.; *G. parasuis*; *Pasteurella multocida*; *Pseudomonas spp.*, *Trueperella spp.*; *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*; *Candida spp.* та ін.

## 2.2. Характеристика науково-дослідного центру

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету (далі НДЦ) створений за наказом ректора агроуніверситету № 1484 від 14 липня 2008 року, у відповідності з рішенням Вченої ради протокол № 8.

НДЦ відкритий на факультеті ветеринарної медицини на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин, за адресою м. Дніпро, Соборний р-н, вул. Мандриківська 276.

Провідний науковим співробітником центру є кандидат ветеринарних наук, Єсіна Елеонора Вячеславівна. Директором центру є кандидат ветеринарних наук, професор ДДАЕУ Масюк Д.М.

НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету атестований Державним науково-дослідним інститутом лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи на проведення робіт у сфері державного метрологічного контролю (свідоцтво про атестацію № 45-432/2015 від 30.12.2015 р), сертифікований Українським біологічним центром сертифікації на визначення вимірювальних можливостей (сертифікат № LB13/19 від 29.12.2019 р.) і акредитований Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок (атестат акредитації № 027/вир.лаб., від 11.08.2017 р.) для проведення аналітичних і випробувальних досліджень морфологічних та біохімічних

показників крові, фізико-хімічних показників сечі, хіміко-токсикологічних показників кормів, кормових добавок, патоморфологічних та бактеріологічних досліджень, визначення ГМО методом ПЛР. на проведення у сфері ветеринарної медицини та сільського господарства.

НДЦ створює можливості для вирішення питань які стосуються функціональної морфології і фізіології основних систем життєзабезпечення продуктивних тварин, ветеринарної біохімії, імунологічні та молекулярні методи дослідження, токсикологічний і хіміко-токсикологічний аналіз речовин біологічного походження; удосконалення системи оцінки якості та біологічної безпеки сільськогосподарської продукції на всіх етапах виробництва; розробка методів мінімізації впливу негативних факторів життєдіяльності людини на здоров'я продуктивних тварин і якісних показників для продуктів тваринного походження.

Основними завданнями НДЦ є: визначення морфофункціональних маркерів стану як життєзабезпечуючих систем для продуктивних тварин в умовах антропогенного тиску і інтенсивного використання; розробка сучасних методів діагностики захворювань тварин з використанням молекулярних методів (імунохімічний, імуногістохімічний і ПЛР-аналіз); удосконалення елементів технології вирощування, годування, імунопрофілактики та оцінки їх ефективності у продуктивних тварин та інших видів тварин; дослідження якості кормів, морфофункціонального стану тварин і показників біобезпеки для продуктів тваринного походження і розробка системи моніторингу екологічного моніторингу сільськогосподарського виробництва в промислових регіонах України; розробка ефективних методів профілактики і корекції порушень обміну речовин і стимуляції неспецифічної імунної відповіді та реакцій організму у тварин в екологічно небезпечних умовах під впливом інтенсивних антропогенних факторів; проведення науково-виробничих експериментів у господарствах Дніпропетровської області та інших регіонах України.

НДЦ працює (на основі відповідних угод) зі структурними підрозділами Міністерства аграрної політики України, науково-дослідними установами Української академії аграрних наук та може здійснювати спільну науково-виробничу діяльність з провідними підприємствами України у галузі тваринництва (на основі господарчих договорів) на створення науково-технічної продукції.

Центр працює у тісній творчій співпраці (на основі відповідних договорів) зі структурними підрозділами Міністерства аграрної політики України, науково-дослідними установами Української академії аграрних наук та може здійснювати спільну науково-виробничу діяльність з провідними підприємствами України у галузі тваринництва (на основі господарчих договорів) на створення науково-технічної продукції.

Наразі науково-дослідний центр виконує понад 400 видів різноманітних досліджень, які дають змогу провести діагностику хвороб тварин різної етіології, аналіз рослинної та тваринної продукції від початкових стадій її отримання до готового продукту.

Працівники науково-дослідного центру надають консультативні послуги як великим сільськогосподарським підприємствам, так і дрібним приватним фахівцям агропромислового комплексу. Спеціалісти беруть активну участь у розробці та оцінці технологій виробництва сільськогосподарської та харчової продукції. Приймають активну участь у конференціях державного та міжнародного значення. Здобутий досвід стосовно діагностики, лікування та профілактики хвороб тварин, якісної і безпечної продукції передають практикуючим спеціалістам.

Науково-дослідні роботи НДЦ виконуються:

науковими працівниками, технічним і допоміжним персоналом науково-дослідного центру, а також працівниками із числа навчально-допоміжного персоналу університету, співвиконавцями з інших вузів і організацій у порядку виконання договірних робіт;

професорсько-викладацьким складом, претендентами на здобуття вченого ступеня та аспірантами, що працюють над дисертаціями, які відповідають науковому профілю НДЦ;

магістрами і студентами під час виконання курсових, дипломних та інших дослідницьких робіт.

Науково-дослідний центр включає в собі наступні відділи:

- інформаційно аналітичний;
- імунохімічний та молекулярно-генетичний;
- фізіології, біохімії та хіміко-токсикології;
- бактеріології та біотехнології;
- морфологічний.

Кожен з вищенаведених відділів оснащений сучасними приладами, необхідними для вирішення вище перерахованих завдань.

Відділ фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу складається з лабораторії клінічної біохімії та лабораторії хіміко-токсикології, які оснащені сучасним обладнанням (КФК-3, спектрофотометри «Спектрофотометр 2000» і «Spectrometer T 60 U», атомно-абсорбційний спектрофотометр Selmi - 115 FCM, Флюорат 02 – 2М, мікроскоп Olympus CH 20, концентратор центрифужного типу «Eppendorf Plus», газовий хроматограф «Цветхром-500», два рідинні хроматографи «Agilent Technologies 1260 Infinity», роторний випарювач РИ 2, автоматичними біохімічними «Biochem 200» і «Miura 200», та гематологічними аналізаторами, тощо.), завдяки якому проводяться морфологічні та біохімічні дослідження крові та сечі, у біологічних субстратах визначається вміст сирого протеїну, клітковини, жиру, мінеральних речовин, вітамінів, амінокислот, мікотоксинів, пестицидів, тощо.

Відділ морфологічних досліджень застосовує методи гістології та імуногістохімії для діагностики хвороб тварин та визначення їх імунного статусу, займається мікроструктурним аналізом кормів, м'яса та м'ясних продуктів для встановлення їх якості та відповідності вимогам нормативних

документів. Цей відділ забезпечений: термостатами ТМ – 80 на 37°C, та 56 °C, санними мікротомами МС 2, ротаційним мікротом МРС, мікротомом-кріостатом, мікроскопами: МБС 10, Olympus CH 20 та CX 41, Leica DM1000 та ін.

У відділі бактеріології та біотехнології за допомогою класичних бактеріологічних методів проводиться діагностика інфекційних хвороб тварин, культивуються, індикуються та ідентифікуються мікроорганізми з подальшим встановленням їх чутливості до різних антибіотиків, здійснюється контроль за ефективністю дезінфекції, проводяться ветеринарно-санітарні дослідження кормів, води, харчових продуктів, тощо. Цей відділ обладнаний наступним устаткуванням: термостати ТС-80 та ТСО-80, шафа ламінарна II класу біобезпеки «ШЛВ-2а», стерилізатор ВК-75, автоклав «Нарсо», ваги електронні лабораторні PS 210 та ін.

Відділ імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень у своєму складі містить лабораторію імунохімії та лабораторію ПЛР-діагностики.

Лабораторія ПЛР-діагностики складається з двох умовних зон – “чистої” і “брудної”.

До “Брудної” зони відносяться:

- кімната прийому та реєстрації матеріалу;
- приміщення для первинної обробки біологічного матеріалу;
- кімната для виділення нуклеїнових кислот;
- кімната для детекції результатів ампліфікації методом горизонтального електрофорезу;
- кімната утилізації продуктів ампліфікації.

“Чиста” зона включає в себе:

- кімнату приготування реакційних сумішей;
- кімнату проведення ПЛР-ампліфікації та детекції результатів.

Робочі приміщення молекулярно-генетичного аналізу є не прохідними, розташовані в окремих кімнатах і побудовані за принципом боксів та перед боксів.

Для повного виключення обміну повітря між приміщеннями “брудної” зони та іншими приміщеннями, ПЛР-лабораторія обладнана припливно-витяжною вентиляцією, яка є окремою для “чистої” та “брудної” зон.

ПЛР-лабораторія обладнана водопроводом, каналізацією, забезпечена електрикою і опалюванням відповідно до чинного законодавства України. Усі приміщення лабораторії забезпечені достатнім природним і штучним освітленням. В передбоксі кожної робочої кімнати встановлена раковина для миття рук.

У приміщенні прийому, реєстрації, розбору і первинної обробки матеріалу проводять попередню пробопідготовку (сортування, маркування, центрифугування та інше), зберігання і первинну інактивацію залишків біологічного матеріалу дезінфекційними засобами. Тут же проводять прийом і обробку проб для дослідження іншими методами (бактеріологічним, імунологічним, імунохімічними, імуногістохімічними, тощо) з урахуванням виділеного, окремо обладнаного, робочого місця для пробопідготовки до ПЛР-аналізу.

Усі маніпуляції, що супроводжуються ризиком утворення аерозолів (струшування, центрифугування тощо), при обробці матеріалу виконуються у ламінарному боксі II класу безпеки.

Зона виділення нуклеїнових кислот розташована в окремій кімнаті. Вона оснащена наступним обладнанням: морозильною камерою для зберігання виділених НК (-18-2 °C); холодильною камерою для зберігання робочих розчинів які використовуються у виділенні НК (+6 -2 °C); ламінарним боксом II класу біобезпеки, що обладнаний HEPA-фільтром (H-13) для забезпечення очищення повітря з ефективністю 99,95% для частинок розміром 0,3 мкм; термостатом з твердотільним термоблоком “циклотемп-303” місткістю 32 на місця; низько швидкісною мікроцентрифугою-шейкером “ЦиклоТемп-901” з двома роторами 3 та 4-го типу, місткість яких розрахована на 24 та 12 мікропробірок відповідно; високо швидкісною



мікроцентрифугою “MiniSprin” фірми Eppendorf місткістю до 24 мікропробірок, яка надає до 13400 обертів за одну хвилину; набором мікродозаторів з перемінним об’ємом та штативом для них; набором наконечників з фільтром для мікродозаторів; одноразовими пробірками типу Eppendorf об’ємом 1,5 мл; гумовими перчатками, тощо.

Кімната приготування реакційних сумішей оснащена морозильною і холодоильною камерами; боксами абактеріального повітряного середовища для приготування реакційних сумішей та внесення зразків НК у реакційну суміш; мікроцентрифугою-шейкером “ЦиклоТемп-901”; мікроцентрифугою “ЦиклоТемп-903”; набором мікродозаторів з перемінним об’ємом та штативом для них, тощо.

В кімнаті проведення ПЛР-ампліфікації та детекції результатів розміщені такі прилади: пристрої для виявлення специфічної послідовності нуклеїнових кислот “CFX 96 BioRad” та “АНК-32”; персональні комп’ютера з лазерним принтером для обробки та отримання результатів ампліфікації.

Кімната утилізації продуктів ампліфікації – автоклавна, є спільною для всіх відділів НДЦ. Вона оснащена автоклавом для проведення знезараження робочого одягу та утилізації продуктів ампліфікації загальним об’ємом 65 л.

Всі перелічені вище прилади технічно справні, мають технічний паспорт і робочу інструкцію з експлуатації.

Стіни та підлога кожного боксу відділення молекулярно-генетичного аналізу вкриті кахлем, що забезпечує потрібні умови для проведення ретельної дезінфекції приміщень.

Таким чином, лабораторії НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК ДДАЕУ оснащені згідно сучасних вимог, мають необхідне обладнання та сертифіковані на проведення відповідних досліджень.

## 2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз

### 2.3.1. Патологоанатомічні зміни у легенях за респіраторної патології свиней

Проведені нами дослідження щодо співставлення патоморфологічних ознак за легеневої патології та результатів ПЛР-дослідження та бактеріальної діагностики дозволили охарактеризувати типові макроскопічні ознаки, що були виявлені при огляді легень. Враховуючи вплив асоціації інфекцій, була очевидною пістрявість патологоанатомічної картини, в якій все ж таки спостерігалися певні ознаки присутності тих чи інших збудників.

Так, при патологоанатомічному огляді легень свиней 120 діб життя (рис. 5) привертала увагу темно-червоні, щільні, округлі вогнища діаметром 4 – 5 см, що контрастували з іншою поверхнею легень і характеризували гостроту протікання процесу, обумовлену, імовірно, дією *A. pleuropneumoniae*.

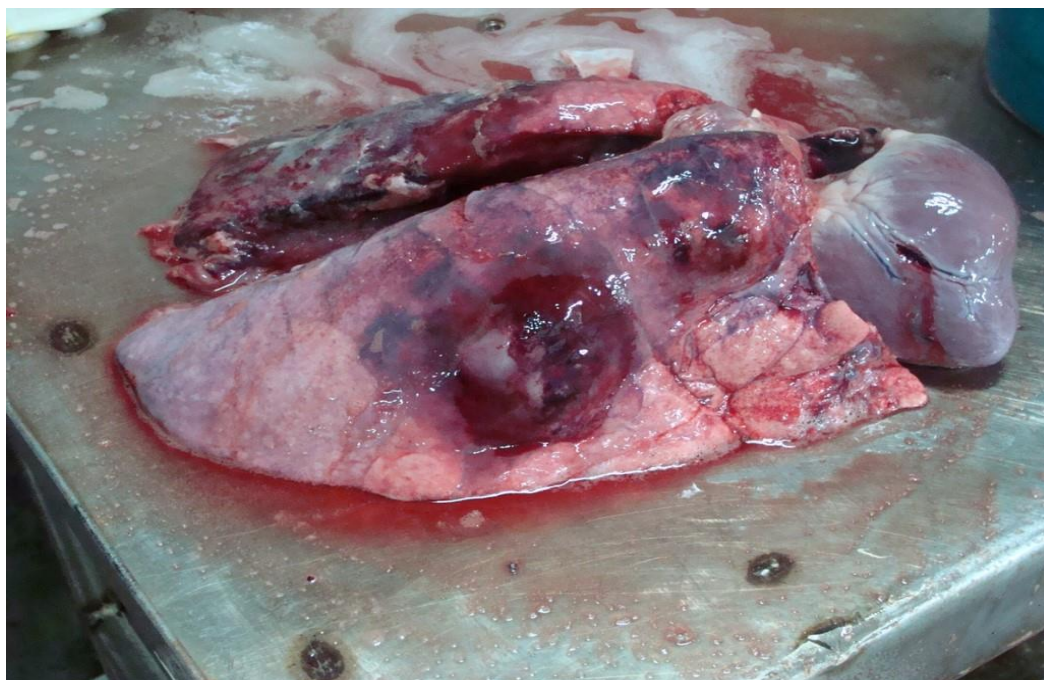


Рис. 5. Серозно-фібринозний плеврит у легенях свиней віком 120 діб  
ЖИТТЯ

Поверхня розрізу темно-червона, досить щільна і скоріше нагадує печінку, ніж легені – червона гепатизація легень. На поверхні розрізу в таких ділянках виступала кров з великих судин.

Колір решти поверхні легень був неоднорідний: від темно-червоного (ділянки застійної гіперемії і набряку) до рожевого (ділянки компенсаторної емфіземи). Консистенція органу варіювала від тістуватої – в місцях набряку, до повітряної внаслідок розриву паренхіми. Дані зміни зазвичай зустрічаються при настанні смерті за гіпоксичним генезом від інтоксикації, у тому числі і, як ускладнення пневмоній.

Привернув увагу стан вісцерального листка легеневої плеври, яка місцями була каламутною і непрозорою, що можна охарактеризувати як серозно-фібринозний плеврит, який також є характерною ознакою присутності *A. pleuropneumoniae* або *S. suis*

При патологоанатомічному огляді легень свиней віком 135 діб життя виявлено двобічну серозно-фібринозну пневмонію і плеврит (рис. 6).



Рис. 6. Двобічна серозно-фібринозна пневмонія з серозно-фібринозним плевритом у свиней віком 135 діб життя

У даному віці спостерігається сукупний токсигенний вплив асоціації респіраторних збудників як на паренхіму легень, так і на організм свиней в цілому. Патологічні ділянки займають обсяг від декількох часточок до цілих часток, у них видні стовщені міжчасточкові перегородки, просочені кров'ю, паренхіма темно-червона. Прилягаюча плевра стовщена за рахунок набряку й вкрита тонкими плівками й нитками фібрину. З поверхні й на розрізі така легеня пофарбована в темно-червоний колір. Уражені частки легень мають щільну консистенцію й строкате фарбування (мармуровість), де чергуються ділянки темно-червоного, червоно-жовтого й сіро-жовтого кольору, міжчасточкові перегородки стовщені. Такі зміни є характерними для коінфекцій, які за часту у цьому віці можуть бути представлені асоціативним впливом на організм *Circovirus type 2*, *A. pleuropneumoniae*, *S. suis*, *G. parasuis*, та різними видами мікоплазм (*M. spp*) [37].

За патологоанатомічного огляду легень від свиней віком 150 діб життя виявлено нашарування плівок фібрину на поверхні легень та виражену обширну червону гепатизацію і геморагічне просочування в органі, що є характерним проявом дії на організм *P. multocida* (рис. 7).



Рис. 7. Відкладання фібрину та геморагічне просочування паренхіми легень у свиней віком 150 діб життя

Яка обумовлює різке загострення перебігу процесу респіраторної патології та призводить до майже тотального просочування паренхіми легень фібрином та кров'ю. Нащо вказує стікання з поверхні розрізу змінених ділянок органу темно-червоної незгорнутої кров.

Отже, патологоанатомічні зміни за респіраторної патології у свиней на відгодівлі можуть варіювати в залежності від набору збудників, рівня резистентності тварин, особливостей мікроклімату тваринницьких приміщень та проведених превентивних заходів. Переважання в патологоанатомічній картині фібринозно-геморагічного компонента буде інформувати про гострий і важкий перебіг процесу та присутність *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* та *P. multocida*.

Обмежені ущільнені ділянки темно-червоного кольору по периферії легень – типова ознака за мікоплазмозу. Розміри уражених ділянок при цьому характеризують інтенсивністю інфекційного процесу. Цирковірусна інфекція має переважно мікроскопічні прояви в органах імунного захисту, причому найінтенсивніше вони виражені після зараження тварини. Патологоанатомічна картина при гемофільозному полісерозиті характеризується фібринозним полісерозитом органів грудної порожнини.

### **2.3.2. Визначення етіології легеневої патології у свиней інфекційного генезу за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції**

За результатами ПЛР дослідження легень від різних вікових груп свиней встановлено, що респіраторна патологія у тварин викликана асоційованою інфекцією (табл. 6).

Так, у свиней віком 120 д.ж виявлено *Circovirus type 2* в коінфекції з *A. pleuropneumoniae*. У наступній віковій групі, а саме 135 д.ж спостерігається розширення спектру мікроорганізмів патогенами постійно циркулюючими в господарстві. Аналогічна ситуація спостерігається і у віковій групі 150 д.ж.

Таблиця 6.

Результати ПЛР діагностики збудників респіраторної патології  
( $M \pm m$ , Ct, n=3)

№	Патоген	Вік тварин, діб		
		120	135	150
1	<i>Influenza type A Virus</i>	-	-	-
2	<i>PRRS Virus</i>	-	-	-
3	<i>Circovirus type 2</i>	25,21 $\pm$ 0,18	37,53 $\pm$ 0,26	34,41 $\pm$ 0,21
4	<i>A. pleuropneumoniae</i>	16,65 $\pm$ 0,24	31,52 $\pm$ 0,26	28,22 $\pm$ 0,23
5	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	37,58 $\pm$ 0,25	-
6	<i>P. multocida</i>	-	-	37,23 $\pm$ 0,19
7	<i>G. parasuis</i>	-	31,53 $\pm$ 0,27	34,54 $\pm$ 0,25
8	<i>B. bronchiseptica</i>	-	-	-
9	<i>M. hyorhinis</i>	-	34,45 $\pm$ 0,21	31,19 $\pm$ 0,22
10	<i>A. suis</i>	-	-	-
11	<i>Salmonella spp</i>	-	-	-
12	Генотипування <i>A. pleuropneumoniae</i>	8 серотип	8 серотип	8 серотип

Також проводилося генотипування збудника *A. pleuropneumoniae*, за результатами дослідження всіх вікових груп було виявлено 8 серотип.

Отже, етіологічними чинниками легеневої патології у свиней віком 120 діб життя є *Circovirus type 2*; *A. pleuropneumoniae*, у 135 денних свиней *Circovirus type 2*; *A. pleuropneumoniae*; *M. hyopneumoniae*; *G. parasuis*; *M. hyorhinis*, у 150 добових тварин *Circovirus type 2*; *A. pleuropneumoniae*; *P. multocida*; *G. parasuis*; *M. hyorhinis*.

Порівнюючи кількісне співвідношення вмісту геном еквівалентів (г.е) *Circovirus type 2* до *A. pleuropneumoniae* в легенях загиблих свиней встановлено, що концентрація ДНК *Circovirus type 2* коливається у межах  $1,85 \times 10^6$  г.е. 1 грам досліджуваного матеріалу, а кількість ДНК *A. pleuropneumoniae* є на 3 порядки більшою та складає  $2,65 \times 10^9$  г.е. у 1 грамі досліджуваного матеріалу (рис. 8).

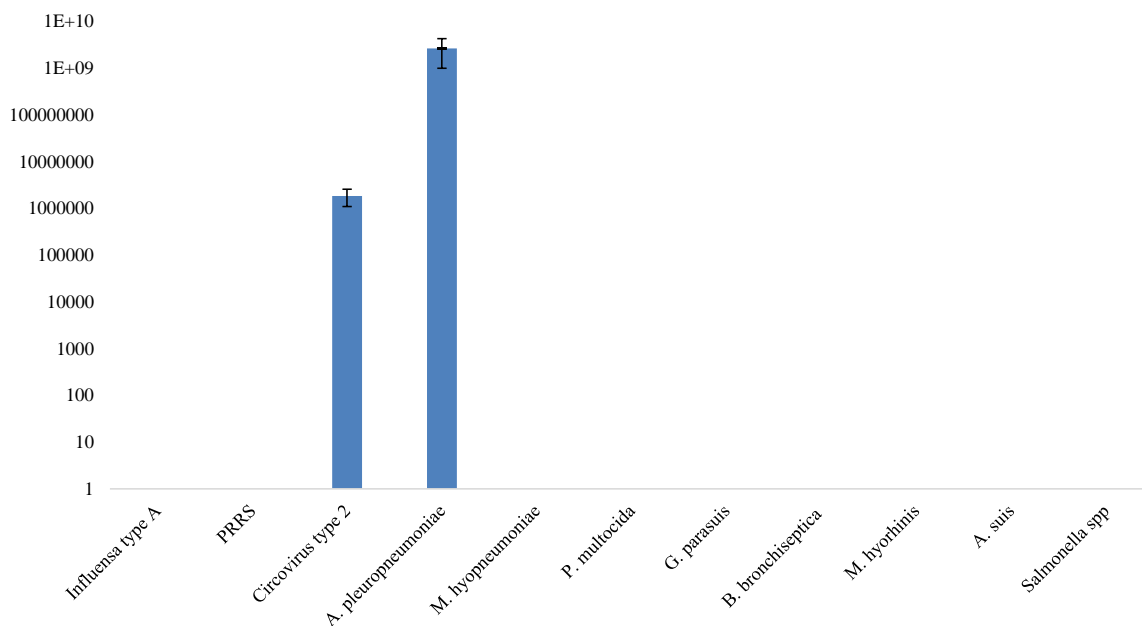


Рис. 8. Кількість геном-еквівалентів нуклеїнових кислот збудників респіраторної патології у легенях свиней віком 120 діб життя ( $M \pm m$ , г.-е.,  $n=3$ )

Як видно з рисунку 9, у легенях свиней віком 135 д.ж. найбільше міститься *A. pleuropneumoniae*, кількість якого складає  $1,85 \times 10^6$  г.е. у 1 г. матеріалу.

Також у легенях свиней цієї вікової групи виявлено ДНК *G. parasuis*, кількість якого є меншою за *A. pleuropneumoniae* на 2 порядки.

Одночасно з цим у легеневій тканині загиблих свиней виявлено ще ряд мікроорганізмів – *Circovirus type 2*; *M. hyorhynidis*; *M. hyorhynidis*, кількість яких не перевищували  $9,33 \times 10^4$  г.е., та становила відповідно *Circovirus type 2* -  $9,33 \times 10^4$  г.е., *M. hyorhynidis* -  $1,77 \times 10^3$  г.е. і *M. hyorhynidis* -  $2,38 \times 10^2$  г.е. у 1 грамі матеріалу.

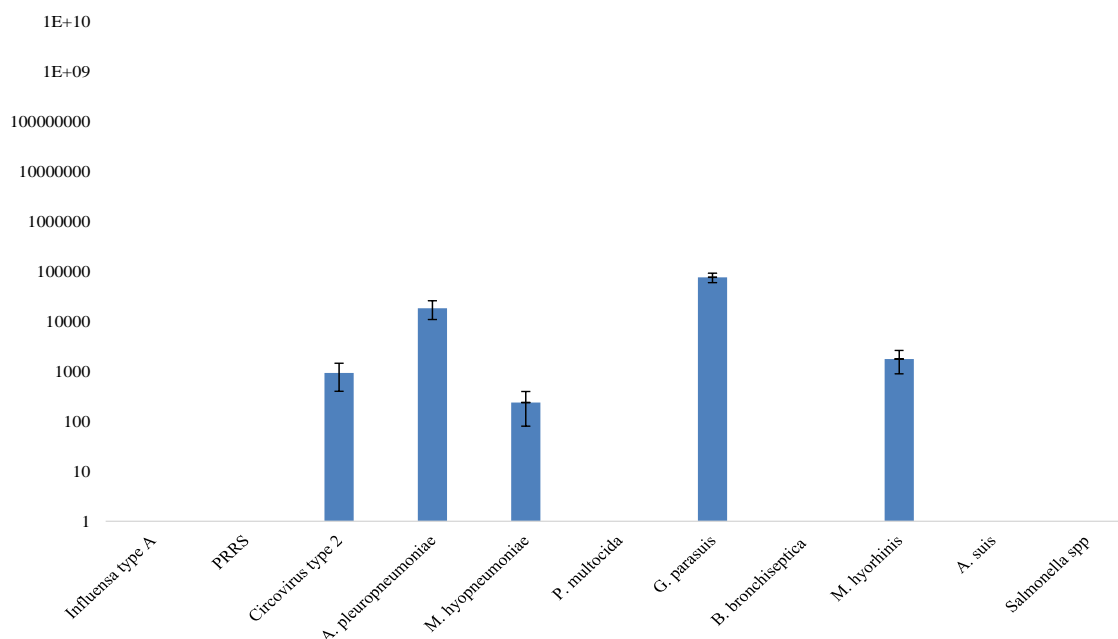


Рис. 9. Кількість геном-еквівалентів нуклеїнових кислот збудників респіраторної патології у легенях свиней віком 135 діб життя ( $M \pm m$ , г.-е.,  $n=3$ )

Як видно з рисунку 10, у легенях свиней віком 150 д.ж. найбільше міститься *A. pleuropneumoniae*, кількість якого складає  $2,03 \times 10^7$  г.е. у 1 г. матеріалу.

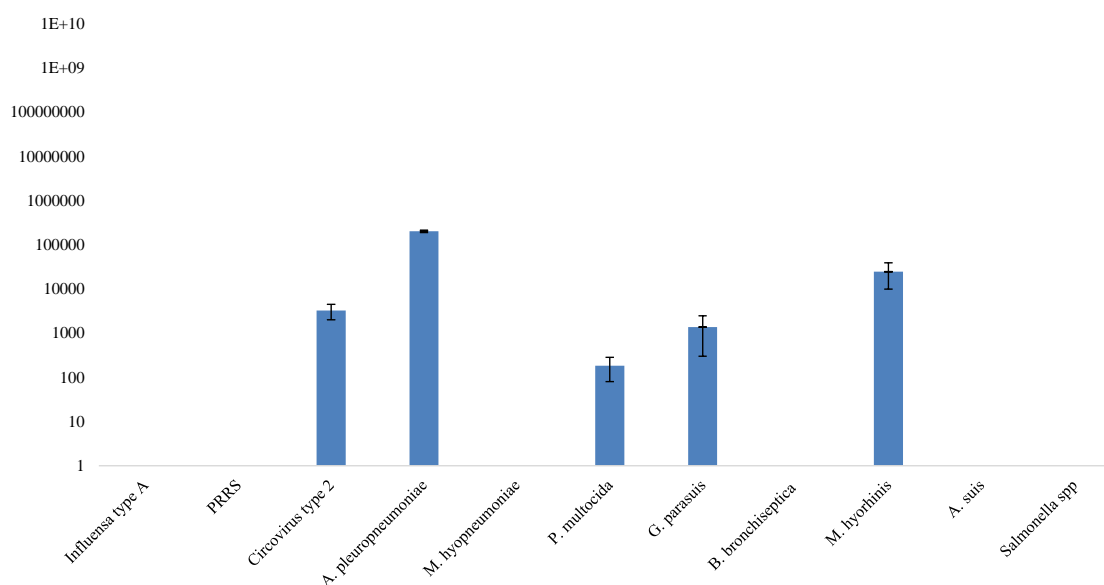


Рис 10. Кількість геном-еквівалентів нуклеїнових кислот збудників респіраторної патології у легенях свиней віком 150 діб життя ( $M \pm m$ , г.-е.,  $n=3$ )



Також у легенях свиней цієї вікової групи виявлено ДНК *Circovirus type 2*, кількість якого є меншою за *A. pleuropneumoniae* на 2 порядки.

Одночасно з цим у легеневій тканині загиблих свиней виявлено ще ряд мікроорганізмів – *M. hyorhinis*, *G. parasuis*, *P. multocida* кількість яких не перевищували  $2,46 \times 10^4$  г.е., та становила відповідно *M. hyorhinis* -  $2,46 \times 10^4$  г.е., *G. parasuis* -  $1,38 \times 10^3$  г.е. і *P. multocida* -  $1,83 \times 10^2$  г.е. у 1 грамі матеріалу.

Отже, основною інфекційною патологією серед досліджуваних тварин є коінфекція мікроорганізмів *A. pleuropneumoniae* та *Circovirus type 2*. З віком відбувається прогресія захворювання, що обумовлено ускладненням патологічного процесу у легенях мікроорганізмами *M. hyorhinis*, *G. parasuis*, *P. multocida* та *M. hyorhinis*.

### **2.3.3. Визначення чутливості ідентифікованих мікроорганізмів до різних антибактеріальних препаратів**

У результаті проведених бактеріологічних досліджень шляхом культивування мікроорганізмів на поживних середовищах встановлено, що у всіх зразках патологічного матеріалу від свиней на відгодівлі виділено культуру *Actinobacillus pleuropneumoniae*, а у легенях свиней 135 добового віку ще і *Streptococcus suis*.

Дослідження ізольованих культур на чутливість до антибіотиків вказують на наявність культур резистентних до окремих антибактеріальних препаратів. Так, у ізольованих культур *A. pleuropneumoniae* з легень свиней віком 120 діб життя зона затримка росту до амоксициліну становить 20 мм, до амоксициліну з клавулановою кислотою – 25 мм, доксицикліну – 19 мм, енрофлоксацину – 25 мм, окситетрациклін – 17 мм, тетрацикліну – 23 мм, тилозин – 25 мм, тіамуліну – 20 мм, триметоприму та сульфаметоксазолу – 20 мм, флорфеніколу – 25 мм, цефтіофуру – 26 мм (рис. 11).

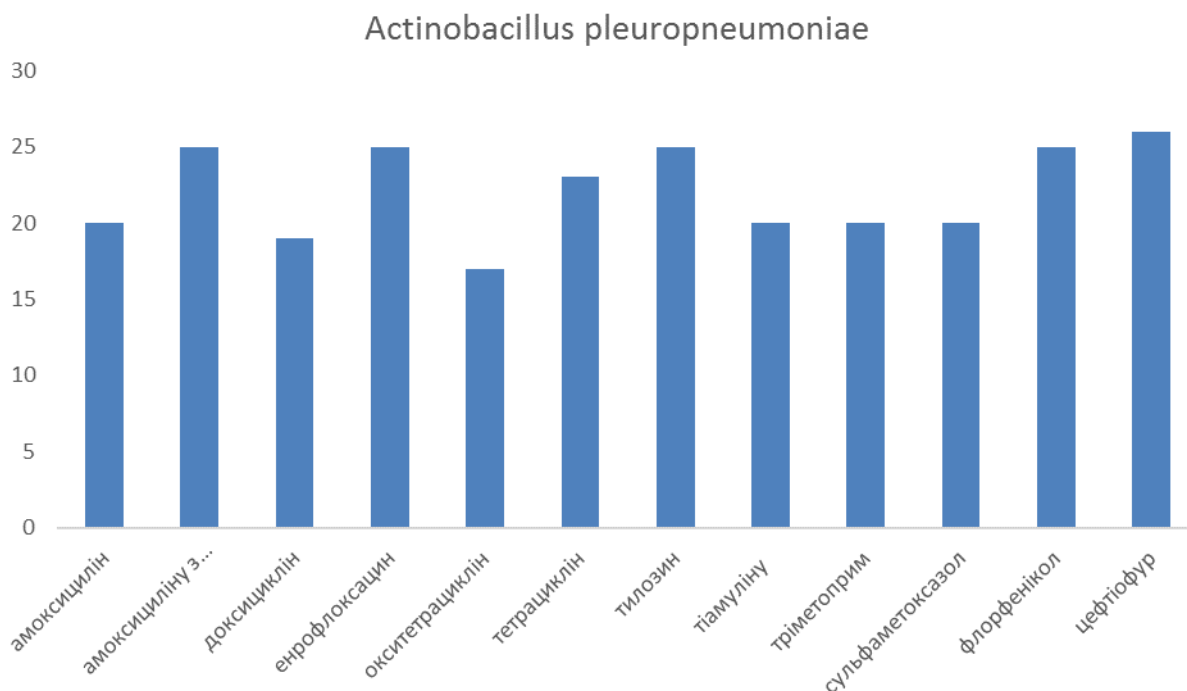


Рис. 11. Зони затримки росту культур *A. pleuropneumoniae* ізольованих з легень свиней 120 добового віку.

Таким чином, ізольована культура *A. pleuropneumoniae* є чутливою до амоксицилін, амоксициліну з клавулановою кислотою, доксицикліну, енрофлоксацину, тетрацикліну, лінкоміцину, тіамуліну, триметоприму та сульфаметоксазолу, флорфеніколу і цефтіофуру, а до окситетрацикліну і тилозину є помірно чутливою (табл. 7).

У ізольованих культур *A. pleuropneumoniae* з легень свиней віком 135 діб життя зона затримка росту до амоксициліну становить 30 мм, до амоксициліну з клавулановою кислотою – 37 мм, доксицикліну – 14 мм, енрофлоксацину – 30 мм, лінкоміцин – 30 мм, окситетрациклін – 14 мм, тетрацикліну – 14 мм, тилозин – 22 мм, тіамуліну – 30 мм, триметоприму та сульфаметоксазолу – 15 мм, флорфеніколу – 26 мм, цефтіофуру – 35 мм, цефазоліну – 35 мм. (рис. 12).

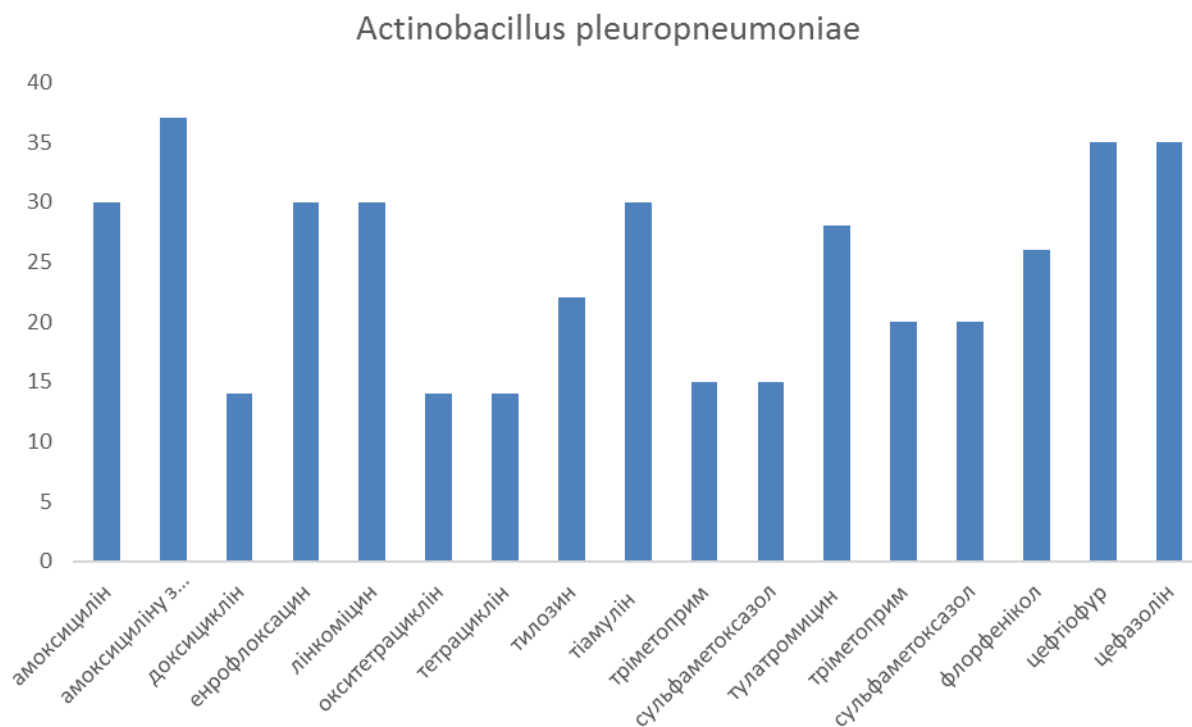


Рис. 12. Зони затримки росту культур *A. pleuropneumoniae* ізольованих з легень свиней 135 добового віку.

Таким чином, ізольована культура *A. pleuropneumoniae* з легень від свиней 135 добового віку є чутливою до амоксициліну, амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, лінкоміцину, тіамуліну, флорфеніколу, цефтіофуру, цефазоліну, тулатроміцин і не чутливими до доксицикліну, окситетрацикліну, тетрацикліну, триметоприму та сульфаметоксазолу.

Таблиця 7

## Результати бактеріологічної діагностики збудників респіраторної патології

№ п/п	Вікова група	Культура	Амоксицилін	Амоксицилін+кла в. к-та	Доксициклін	Енрофлоксацин	Лінкоміцин	Окситетрациклін	Тетрациклін	Тилозин	Тіамулін	Трімепроприм/Сул ьфа	Тулатроміцин	Флорфенікол	Цефазолін	Цефтіофур	Ципрофлоксацин
№ 1	120 д.ж	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	ПЧ	Ч	ПЧ	Ч	Ч	Н/П	Ч	Н/П	Ч	Н/П
№ 2			Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	ПЧ	Ч	ПЧ	Ч	Ч	Н/П	Ч	Н/П	Ч	Н/П
№ 3			Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	ПЧ	Ч	ПЧ	Ч	Ч	Н/П	Ч	Н/П	Ч	Н/П
№ 4	135 д.ж	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Ч	Ч	НЧ	Ч	Ч	НЧ	НЧ	Н/П	Ч	НЧ	Ч	Ч	Ч	Ч	Н/П
№ 5			Ч	Ч	НЧ	Ч	Ч	НЧ	НЧ	Н/П	Ч	НЧ	Ч	Ч	Ч	Ч	Н/П
№ 6			Ч	Ч	НЧ	Ч	Ч	НЧ	НЧ	Н/П	Ч	НЧ	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
№ 4	135 д.ж	<i>Streptococcus suis</i>	Ч	Ч	ПЧ	Ч	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	Ч	НЧ	Н/П	Ч	Ч	Ч	Ч
№ 5			Ч	Ч	ПЧ	Ч	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	Ч	НЧ	Н/П	Ч	Ч	Ч	Ч
№ 6			Ч	Ч	ПЧ	Ч	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	Ч	НЧ	Н/П	Ч	Ч	Ч	Ч
№ 7	150 д.ж	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Ч	Ч	Ч	Ч	НЧ	Ч	Ч	Н/П	Ч	Ч	Ч	Ч	Н/П	Н/П	Н/П
№ 8			Ч	Ч	Ч	Ч	НЧ	Ч	Ч	Н/П	Ч	Ч	Ч	Ч	Н/П	Н/П	Н/П
№ 9			Ч	Ч	Ч	Ч	НЧ	Ч	Ч	Н/П	Ч	Ч	Ч	Ч	Н/П	Н/П	Н/П

Примітка: Ч - чутлива; Пч - помірно чутлива; Нч – нечутлива; Н/П – не проводилась чутливість

У ізольованих культур *Streptococcus suis* з легень свиней віком 135 діб життя зона затримка росту до амоксициліну становить – 26 мм, до амоксициліну з клавулановою кислотою – 37 мм, доксицикліну – 13 мм, енрофлоксацину – 26 мм, лінкоміцину – 19 мм, окситетрациклін – 14 мм, тетрацикліну – 14 мм, тилозин – 22 мм, тіамуліну – 29 мм, тріметоприму та сульфаметоксазолу – 15 мм, флорфеніколу – 25 мм, цефтіофуру – 35 мм, цефазоліну – 35 мм, ципрофлоксацину – 36 мм. (рис. 13).

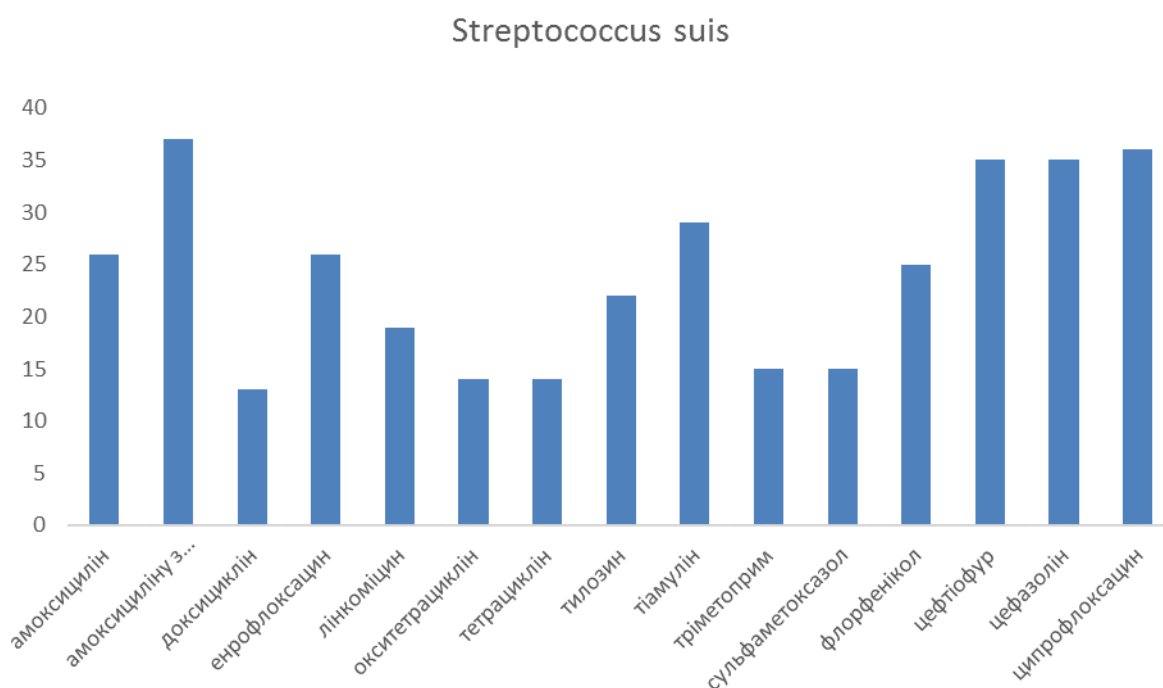


Рис. 13. Зони затримки росту культур *Streptococcus suis* ізольованих з легень свиней 135 добового віку.

Таким чином, ізольована з легень свиней віком 135 діб життя культура *Streptococcus suis* є чутливою до амоксициліну, амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, тіамуліну, флорфеніколу, цефтіофуру, цефазоліну, ципрофлоксацин, помірно чутливий до доксицикліну та не чутливою до окситетрацикліну, лінкоміцину тетрацикліну, тилозину, тріметоприму та сульфаметоксазолу.

У ізольованих культур *A. pleuropneumoniae* з легень свиней віком 150 діб життя зона затримка росту до амоксициліну становить – 25 мм, до

амоксициліну з клавулановою кислотою – 30 мм, доксицикліну – 20 мм, енрофлоксацину – 30 мм, лінкоміцин – 19 мм, окситетрациклін – 18 мм, тетрацикліну – 21 мм, тіамуліну – 25 мм, тріметоприму та сульфаметоксазолу – 18 мм, флорфеніколу – 26 мм, тулатроміцин – 26 мм. (рис. 14).

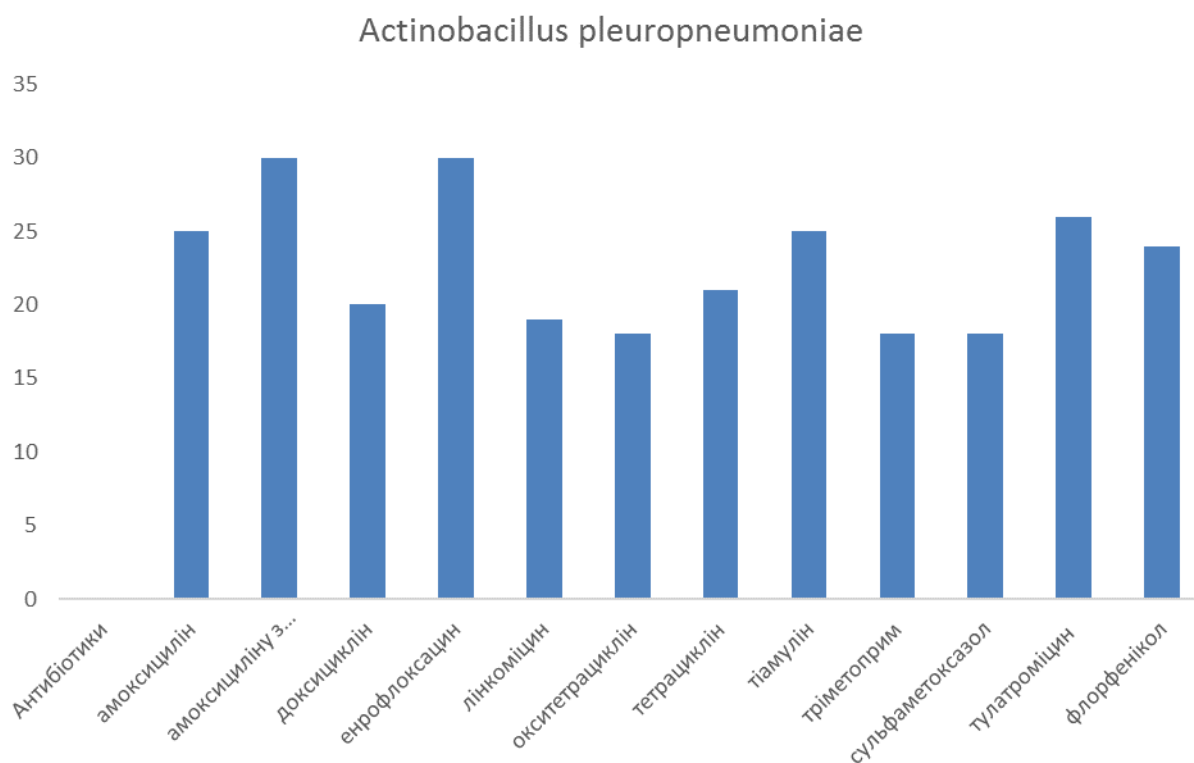


Рис. 14. Зони затримки росту культур *A. pleuropneumoniae* ізольованих з легень свиней 150 добового віку.

Таким чином, ізольована культура *A. pleuropneumoniae* є чутливою до амоксициліну, амоксициліну з клавулановою кислотою, доксицикліну, енрофлоксацину, окситетрацикліну, тіамуліну, тулатроміцину, тетрацикліну, тріметоприму та сульфаметоксазолу, флорфеніколу і не чутливий до лінкоміцину.

Отже, більшість ізольованих з легень відгодівельних свиней культур *A. pleuropneumoniae* є мультирезистентними до широкого спектру антибактеріальних препаратів, але всі вони зберігають чутливість до амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, тіамуліну і флорфеніколу.

Культура *S. suis* також є мультирезистентною до 50 % досліджуваних антибактеріальних препаратів та одночасно чутливою до дії амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, тіамуліну, флорфеніколу, цефазоліну, цефтіофуру і ципрофлоксацину.

Можна припустити, що така полірезистентність до антибіотиків викликана необґрунтованим їх використанням або в організмі хворих тварин уже циркулюють резистентні штами мікроорганізмів.

#### **2.3.4. Розрахунок економічної ефективності застосування ПЛР та бактеріологічного досліджень**

Проводили дослідження для виявлення збудників респіраторної патології у патологічному матеріалі від свиней методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі та бактеріологічним методом згідно поставленої мети даної дипломної роботи. Тому, відповідно, було розраховано економічну ефективність від проведеного заходу [18].

Формування тарифу за ветеринарну послугу (дослідження) в науково-дослідному центрі включає наступні показники:

1. Вартість одиниці часу лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії), виходячи із середньомісячного рівня оплати праці.
2. Вартість електроенергії, витраченої на роботу.
3. Вартість витратних матеріалів та амортизаційні відрахування від використання приладів;
4. Відрахування в центр зайнятості, медичне страхування та пенсійний фонд.

Виходячи з вище перелічених пунктів, проведемо розрахунок затрат на проведення одного дослідження.

### 2.4.1. Ветеринарні витрати на заробітну платню:

Відповідальним працівником за проведення ПЛР-дослідження в науково-дослідному центрі є молодший науковий співробітник, середньомісячна оплата праці якого становить 4723 грн.

$$4723 : 21 = 224,90 \text{ ( 1 людина \ день)}$$

$$224,90 : 7 = 32,12 \text{ ( 1 людина \ година)}$$

$$32,12 : 60 = 0,53 \text{ (1 людина \ хвилинка)}$$

Враховуємо, що середня кількість робочих днів за календарний місяць складає 21 день, кількість годин робочого дня становить 7 годин, кількість годин, що необхідна для проведення одного ПЛР-дослідження в середньому становить 4 години. Отже всього на аналіз було витрачено 240 хвилин. Розраховуємо вартість одиниці часу для проведення одного ПЛР-дослідження:  $4723/21/7/60 \times 240 = 128,52$  грн.

Вартість витраченої електроенергії на роботу термостату, 4 центрифуг, ламінарних боксів, ампліфікатору та витрати на освітлення під час проведення одного ПЛР-дослідження в середньому складають 10 грн.

Витрати на амортизацію приладів, необхідних для проведення ПЛР-досліджень, розраховуються в залежності від їх загальної вартості, що складає 1 120 000 грн, строку 5 років, часу використання при проведенні досліджень (4 год.), та кількості зразків, що можуть одночасно досліджуватися за умови повної завантаженості приладу (96 зразків). Амортизаційні витрати складають:  $1120000/5/12/21/7/60 \times 240/96 = 5,29$  грн.

Загальна вартість податкових відрахувань становить 36,2% та складає:  $(4723 \times 36,2/100)/21 = 81,42$  грн.

Панель «Респіраторна патологія свині включає в себе 11 захворювання» і 10 різних комерційних тест наборів.



## 2.4.2. Ветеринарні витрати на проведення ПЛР діагностики

Таблиця. 8

### Перелік матеріалів витрачених на проведення діагностичних досліджень

Найменування реактиву	Ціна за упаковку, грн.	Витрата для аналізу	Ціна за аналіз, грн.
1	2	3	4
Тест система Influenza A на 100 тестів	18000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	2160
Тест система PRRS на 100 тестів	18000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	2160
Тест система Circovirus type 2 на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440
Тест система A. Pleuropneumoniae на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440
Тест система M. hyorheumoniae на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440
Тест система P. Multocida на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440
Тест система G. parasuis на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440
Тест система B. bronchiseptica на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440
Тест система M. hyorhinis на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440
Тест система A. Suis на 100 тестів	12000	9 дослідних зразків 3 контрольних зразки	1440

Продовження таблиці 8

1	2	3	4
Набір для виділення НК на магнітних часточках, 50 тестів	3750	9 дослідних зразків та 1 контрольний зразок	750
Наконечники на 1000 мкл	203 грн. 1000 шт	960 шт.	194,88
Наконечники на 200 мкл	142 грн. 1000 шт	960 шт.	142
Наконечники на 10 мкл	110 грн. 1000 шт	240 шт.	440
Пробірки 1,5 мл	284 грн. 500 шт	240 шт.	1136
Пробірки 0,2 мл	960 грн. 1000 шт	240 шт.	3840
<b>Всього</b>			22342,88

Як видно з даних представлених в (табл. 7), ми бачимо що ветеринарні затрати на проведення ПЛР аналізу становлять 22342,88грн.

$$V_{\text{заг}} = (128,52+10+5,29+81,42+22342,88)/12 = 1880,68 \text{ грн.}$$

За проведеними розрахунками, собівартість ПЛР-дослідження одного зразку коштує 1880,68 грн.

В лабораторії одне дослідження коштує 2080 грн.

Згідно отриманих даних, чистий прибуток від виконаної роботи становить:  $2080 - 1880,68 = 199,32$  грн.

Отже, згідно проведених розрахунків, економічна ефективність застосування методу ПЛР для комплексної діагностики респіраторної патології у свиней складає 199,32 грн за дослідження однієї проби.

### 2.4.3 Ветеринарні витрати на проведення бактеріального дослідження

Відповідальним працівником за проведення бактеріологічного дослідження в науково-дослідному центрі є молодший науковий

співробітник, середньомісячна оплата праці якого становить 4723 грн. Кількість годин, що необхідна для проведення одного бактеріологічного дослідження в середньому становить 5 годин. Отже всього на аналіз було витрачено 300 хвилин. Розраховуємо вартість одиниці часу для проведення одного бактеріологічного дослідження:  $4723/21/7/60 \times 300 = 160,65$  грн.

Вартість витраченої електроенергії на роботу термостату, одної центрифуги, ламінарних боксів, холодильника, парового стерилізатора та витрати на освітлення під час проведення одного бактеріологічного дослідження в середньому складають 15 грн.

Витрати на амортизацію приладів, необхідних для проведення бактеріологічних досліджень, розраховуються в залежності від їх загальної вартості, що складає 188 000 грн, строку 5 років, часу використання при проведенні досліджень (в середньому 5 год.).

Амортизаційні витрати складають:  $188\ 000/5/12/21/7/60 \times 300/100 = 1,06$  грн.

Як видно з даних представлених в (табл. 9), ми бачимо що ветеринарні затрати на проведення бактеріологічного дослідження становлять 852,55.

$$V_{\text{заг}} = (160,65 + 15 + 1,06 + 81,42 + 852,55) / 3 = 370,22$$

За проведеними розрахунками, собівартість бактеріологічного дослідження одного зразку коштує 370,22 грн.

В лабораторії одне дослідження коштує 480 грн.

Згідно отриманих даних, чистий прибуток від виконаної роботи становить:  $480 - 370,22 = 109,78$  грн.

Таблиця 9

**Перелік матеріалів витрачених на проведення діагностичних досліджень**

<b>Найменування реактиву</b>	<b>Ціна за упаковку, грн.</b>	<b>Витрата для аналізу</b>	<b>Ціна за аналіз, грн.</b>
Чашка Петри EximLab 90мм (10 шт/уп)	66	15 шт.	99,00
М'ясо-пептонний агар у виді сухої речовини (500 гр.)	2200	28 гр.	123,2
Ендо агар, у виді сухої речовини (500 гр.)	2200	41,5 гр.	182,6
Шоколадний агар ( в склад входить МПА у виді сухої речовини) – 500 гр.	2200	28 гр.	123,2
Кров'яний агар ( в склад входить МПА у виді сухої речовини) – 500 гр.	2200	28 гр.	123,2
Серцево-мозковий бульйон у виді сухої речовини (500 гр.)	2200	41,5 гр.	182,6
Диски на визначення чутливості до антибіотиків (500шт.)	960	36 шт.	18,75
<b>Всього</b>			<b>852,55</b>

Отже, згідно проведених розрахунків, економічна ефективність культивування мікроорганізмів на поживних середовищах для діагностики респіраторної патології у свиней складає 109,78 грн за дослідження однієї проби.

### **3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ**

#### **3.1. Аналіз стану охорони праці в умовах НДЦ**

Дипломна робота виконана на базі Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету. Охорона праці в НДЦ забезпечується відповідно до наказу Держнаглядохоронпраці 20.04.99 N 67, затвердженого і зареєстрованого Міністерством юстиції України від 11 жовтня 1999 р. за N 695/3988 [7].

Відповідно цього наказу до роботи у відділах НДЦ допускаються особи, що досягли 18-річного віку, пройшли попередній медичний огляд, відповідну спеціальну підготовку і детально ознайомились з правилами роботи з культурами бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів, з інфікованим або підозрілим на інфікованість матеріалом, з хімічними речовинами, а також навчені експлуатації лабораторного обладнання [7].

При прийнятті на роботу та протягом трудової діяльності всі працівники науково – дослідного центру мають санітарну книжку, яка фіксує плановий медичний огляд. Якщо було спричинено шкоду здоров'ю, наказ ДНАОП 0.05-1.02-93. зобов'язує відшкодування.

Тривалість робочого часу працівників лабораторії встановлюється згідно з Кодексом законів про працю України (322-08) та списком виробництв, цехів, професій і посад із шкідливими умовами праці, робота в яких дає право на додаткову відпустку й скорочений робочий день.

Всі працівники лабораторії повинні проходити інструктаж, ознайомлюються з діючим законом про охорону праці: Закон України «Про охорону праці», Закон України «Про загальнообов'язкове державне соціальне страхування від нещасних випадків на виробництві та професійне страхування на випадок інвалідності» перевіряє знання правил, положень та інструкцій щодо захисту праці в порядку і часу, встановлених для певних

робочих місць. Навчання на робочому місці організується Департаментом охорони праці установи з метою навчити співробітників правильному і безпечному виконанню своїх завдань для себе і навколишнього середовища. Відповідальність за організацію навчання і перевірки знань про безпеку роботи в дослідницькому центрі несуть завідувачі відділів.

Під час початкового навчання на роботі пояснюються основні вимоги безпеки під час і після роботи. Факти про проведення інструктивного навчання фіксується в реєстраційному журналі робочого місця.

Повне інструктування проводиться через шість місяців після попереднього. Його мета – підтримання рівня знань з техніки безпеки напровадження робіт.

Фінансування з охорони праці здійснюється керівництвом Дніпровського державного аграрно-економічного університету, а саме:

- Реалізація національних, галузевих і регіональних програм щодо поліпшення безпеки, здоров'я і умов праці для запобігання нещасних випадків і професійних захворювань, а також для фінансування профілактичних заходів з охорони праці.

- Позаплановий інструктаж проводиться при зміні правил безпеки або коли співробітники порушують інструкції з техніки безпеки щодо охорони праці.

Планування організаційно-технічних заходів в галузі охорони праці – це одна з провідних функцій в управлінні охорони праці. Фактичний стан охорони праці та прогнози на майбутнє повинні бути визначені до планування. Завдяки планам покращуються умови праці, санітарно-оздоровчі заходи; створюються кращі умови для роботи на виробництві.

Так як працівники мають безпосередній контакт із матеріалами і речовинами, а також приладами, що не є безпечними для здоров'я життєдіяльності людини, для нормальної роботи в науково-дослідному центрі враховують ряд важливих аспектів: стан виробничих умов;

організаційно-технічні заходи; протипожежну безпеку; характеристику речовин і обладнання; вплив на довкілля.

Вимоги до приміщень відділів НДЦ:

- 1) Приміщення повинно бути забезпечене приточно – витяжною вентиляцією.
- 2) Освітлення приміщень повинно бути рівномірним, і відповідати санітарним нормам. Не повинно бути яскравих джерел світла спрямованих в зону роботи приладів.
- 3) Необхідно дотримуватись чистоти.
- 4) Підлога та стіни приміщення, а також робоча поверхня меблів повинні бути гладкими і легко піддаватись прибиранню та очищенню.
- 5) Місце для підготовки зразків повинне бути відокремлене від місця знаходження аналітичних приладів.

Кожному співробітнику у відділах, в яких проводиться дослідження, призначається певна посада і робоче місце. Перед входом у відділ працівник повинен надягти спеціальний одяг - халат, медичну шапочку або білу хустку, рукавички і спеціальне взуття на вході в бактеріологічне або молекулярно-генетичне відділення.

Матеріал, що надходить для дослідження у відділи НДЦ, вноситься через окремий, передбачений для цього, вхід. Його приймає відповідальний працівник, який проходить інструктаж із безпеки праці. В кімнаті розбору матеріалу він розподіляє і передає матеріал для працівників відповідних відділів, які будуть проводити його дослідження.

У кожному передбоксі та боксі відділів НДЦ розташовані бактерицидні лампи, які вмикаються за межами опромінюваної зони на 1-2 години за 30 хв. до початку роботи та після. Двері боксу та передбоксіка повинні бути надійно закриті під час роботи. У цей час заборонено залишати бокс, та входити іншим співробітникам лабораторії.

Після закінчення роботи в боксі працівник прибирає робоче місце: проводить дезінфекцію робочої поверхні ламінарного та ПЛР боксу, столу,

кювети та ін. приладів. Проводить вологе прибирання боксу, після чого обробляє підлогу, стіни й меблі дезрозчином. Приміщення прибирається раз на тиждень гарячою водою з милом, дезінфекційними засобами і витирається.

В кінці робочого дня забруднений матеріал кожен день поміщають в термостат або шафу, який потім герметично закривають.

Відпрацьований та непотрібний матеріал знезаражують шляхом автоклавування у автоклаві. До експлуатації автоклаву допускаються працівники, пройшли попередній медичний огляд, навчання за відповідною програмою, атестовані і мають посвідчення на право обслуговування автоклавів.

### **3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів**

Працівники мають безпосередній контакт із матеріалами і речовинами, а також приладами, що не є безпечними для здоров'я і життєдіяльності людини, тому для нормальної роботи в науково-дослідному центрі враховують ряд таких аспектів: стан виробничих умов; організаційно-технічні заходи; протипожежну безпеку; характеристику речовин і обладнання; вплив їх на довкілля.

Вимоги до приміщень відділів НДЦ:

- 1) Забезпечення приміщень приточно – витяжною вентиляцією.
- 2) Освітлення приміщення повинно бути рівномірним, і відповідати санітарним нормам. Не має бути яскравих джерел світла спрямованих в зону роботи приладів.
- 3) У приміщеннях необхідно дотримуватись чистоти.
- 4) Підлога та стіни приміщення, а також робоча поверхня меблів повині бути гладкими і легко піддаватись прибиранню та очищенню.
- 5) Місце для підготовки зразків повинне бути відокремлене від місця знахоження аналітичних приладів.



Кожному співробітнику у відділах, в яких проводиться дослідження, призначається певна посада і робоче місце. Перед входом у відділ працівник повинен надягти спеціальний одяг - халат, медичну шапочку або білу хустку, рукавички і спеціальне взуття на вході в бактеріологічне або молекулярно-генетичне відділення.

Матеріал, що надходить для дослідження у відділи НДЦ, вноситься через окремий, передбачений для цього, вхід. Його приймає відповідальний працівник, який проходить інструктаж із безпеки праці. В кімнаті розбору матеріалу він підготовлює, розподіляє і передає матеріал працівникам відповідних відділів, які будуть проводити його дослідження.

У кожному передбоксі та боксі відділів НДЦ розташовані бактерицидні лампи, які вмикаються за межами опромінюваної зони на 1-2 години за 30 хв. до початку роботи та після. Двері боксу та передбоксіка повинні бути надійно закриті під час роботи. У цей час заборонено залишати бокс, та входити інші співробітникам лабораторії.

Після закінчення роботи в боксі працівник прибирає робоче місце: проводить дезінфекцію робочої поверхні ламінарного та ПЛР боксу, столу, кювети та ін. приладів. Проводить вологе прибирання боксу, після чого обробляє підлогу, стіни й меблі дезрозчином. Приміщення прибирається раз на тиждень гарячою водою з милом, дезінфекційними засобами і витирається.

В кінці робочого дня забруднений матеріал кожен день поміщають в термостат або шафу, який потім герметично закривають.

Відпрацьований та непотрібний матеріал знезаражують шляхом автоклавування у автоклаві. До експлуатації автоклаву допускаються працівники, пройшли попередній медичний огляд, навчання за відповідною програмою, атестовані і мають посвідчення на право обслуговування автоклавів.

### 3.3. Пожежна безпека

Пожежна безпека в науково-дослідному центрі забезпечується шляхом проведення організаційних, технічних та інших заходів відповідно до «Правил пожежної безпеки в Україні». [8].

Для уникнення виникнення пожежі, виконуються наступні правила протипожежної безпеки:

- регулярно перевіряють справність електроприладів та електроустаткування; ізоляція електропроводів;
- забороняється паління у виробничих приміщеннях;
- не допускається перегрів приладів;
- проходи до щитків і виходу з центру не загороджуються;

У коридорі науково-дослідного центру розташований щит з набором протипожежного інвентарю: вогнегасники, відра з піском та пожежний гідрант. Вогнегасники також розташовані в приміщеннях, де проводяться роботи з вогненебезпечними або вибуховими речовинами і небезпечними в пожежному відношенні нагрівальними приладами.

Відповідальність за пожежну безпеку покладена на завідуючого науково-дослідним центром біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрного університету – Масюка Дмитра Миколайовича.

Метою його є – підтримання рівня знань з техніки безпеки та проведенні робіт.

## ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо визначення особливостей диференціальної діагностики респіраторної патології свиней, що підтверджується наступними висновками:

1. Патологоанатомічні зміни у легенях за респіраторної патології у свиней на відгодівлі є різноманітними, та у більшості випадків залежать від спектру збудників, що викликають патологічний процес. Переважання у патологоанатомічній картині фібринозно-геморагічного запалення вказує на гострий і важкий перебіг захворювання індукованого мікроорганізмами *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* та *P. multocida*. Обмежені ущільнені ділянки темно-червоного кольору по периферії легень – типова ознака за мікоплазмозу, а розміри уражених ділянок характеризують інтенсивність інфекційного процесу. Патолого-анатомічна картина за ураження *G. parasuis* характеризується фібринозним полісерозитом органів грудної порожнини.

2. За результатами ПЛР дослідження встановлено, що основними етіологічними чинниками інфекційної патології серед досліджуваних тварин є коінфекція мікроорганізмів *Circovirus type 2* та *A. pleuropneumoniae* 8 серотипу. З віком відбувається прогресія захворювання, що обумовлено ускладненням патологічного процесу у легенях мікроорганізмами *M. hyopneumoniae*, *G. parasuis*, *P. multocida* та *M. hyorhinis*.

3. За бактеріологічного дослідження з'ясовано, що більшість ізольованих культур *A. pleuropneumoniae* є мультирезистентними до широкого спектру антибактеріальних препаратів, але всі вони є чутливими до амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, тіамуліну і флорфеніколу. Ізольована від свиней 135 добового віку культура *S. suis* також є мультирезистентною до 50 % досліджуваних антибактеріальних препаратів та одночасно чутливою до дії амоксициліну з клавулановою кислотою, енрофлоксацину, тіамуліну, флорфеніколу, цефазоліну, цефтіофуру і ципрофлоксацину.

4. Економічна ефективність застосування методу ПЛР для комплексної діагностики респіраторної патології у свиней складає 199,32 грн за дослідження, а культивування мікроорганізмів на поживних середовищах із визначенням чутливості ізольованих мікроорганізмів до антибактеріальних складає 109,78 грн за дослідження.

### **ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Для діагностики респіраторної патології у свиней на відгодівлі виробництву рекомендовано проводити систематичний патологоанатомічний огляд уражених легень та комплексне лабораторне їх дослідження методами ПЛР та культивування на поживних середовищах.

Для формування ефективної схеми лікувально-профілактичних заходів щодо респіраторної патології у свиней рекомендовано проводити визначення чутливості ідентифікованих мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гандзюк М.П., Желібо Є.П., Халімовський М.О. Основи охорони праці: Підручник. 4-е вид. / За ред. М.П. Гандзюка. – К.: Каравела, 2008. – С. 384.
2. Джефф Л. Касвелл, Курт Дж. Уильямс, в Касвелл, Курт Дж. Уильямс, в Jubb, Кеннеди и Палмер Патология домашних животных: Том 2 (шестое издание), 2016, 309 ст..
3. Корицкая М.А. Иммунобиологические свойства вакцинного штамма КС вируса классической чумы свиней: автореф. дис. на соиск уч. степени канд. биол. наук: спец. 16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эки-зоотология, микология с микотоксикологией и иммунология / Корицкая М.А. – ФГУ ВДНКИ: Москва, 2005.– С. 24.
4. Макаров В.В. Классическая чума свиней – особенности эпизоотического процесса и проблемы на современном этапе / В.В. Макаров, С.И. Джупина, А.А. Коломыщев // Аграрная Россия: научно-производственный журнал. –2010. – № 3. – С. 42–48.
5. Малярец, П.В. Классическая чума свиней / П.В. Малярец, Е.В. Гусева, Т.А. Ануфриева. – Владимир: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных, 2010. – 58 с
6. Методическое пособие разработано ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии (А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина, Д.В. Федосов, А.С. Стребков, С.В. Сычев, Ю.Н. Алехин, А.И. Никулин). Ст. 8.
7. Методичні рекомендації до виконання і захисту дипломних робіт освітньо-кваліфікаційних рівнів «Бакалавр» і «Магістр» ветеринарної медицини / Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет. – 2015.– 60 с.
8. Наказ Держнаглядохоронпраці «Про правила охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини» (офіційне видання) № 67 від

- 20.04.1999 р. // Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11 жовтня 1999 р. за N 695/3988.
9. Орлянкин, Б.Г. Актуальные ветеринарные проблемы в промышленном свиноводстве / Б.Г. Орлянкин // VI Международный ветеринарный конгресс. – Россия. - 2016.
  10. Стегній Б. Т. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях : наук.-метод. посіб. / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська ; ред. Б. Т. Стегній, А. П. Герілович. — Х. : НТМТ, 2010. — 227 с
  11. Федоренко В. О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В. О. Федоренко, Б. О. Остащ, М. В. Гончар, Ю. В. Ребець. — Л. : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. — 277 с
  12. Application of recombinase polymerase amplification in the detection of *Pseudomonas aeruginosa* Jin XJ, Gong YL, Yang L, Mo BH, Peng YZ, He P, Zhao JN, Li XL. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2018 Apr 20;34(4):233-239.
  13. Bossé, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Simon K., J., & Langford, P. R. (2012). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, 4(2), 225-235. doi: 10.1016/s1286-4579(01)01534- 9.
  14. Cai, X., Chen, H., Blackall, P.J., Yin, Z., Wang, L., Liu, Z., Jin, M., 2015. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Veterinary Microbiology* 111, 231–236.
  15. Chanter N. Streptococci and enterococci as animal pathogens. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 2015 p. 100–109.
  16. Chiers K . Contagious pleuropneumonia control. *Pig progress, special (respiratory diseases)*. 2012, 22-23.
  17. ELISA Plested JS, Coull PA, Gidney MA. ELISA. *Методы Мол Мед* . 2013; 71: 243-261. DOI: 10.1385 / 1-59259-321-6: 243

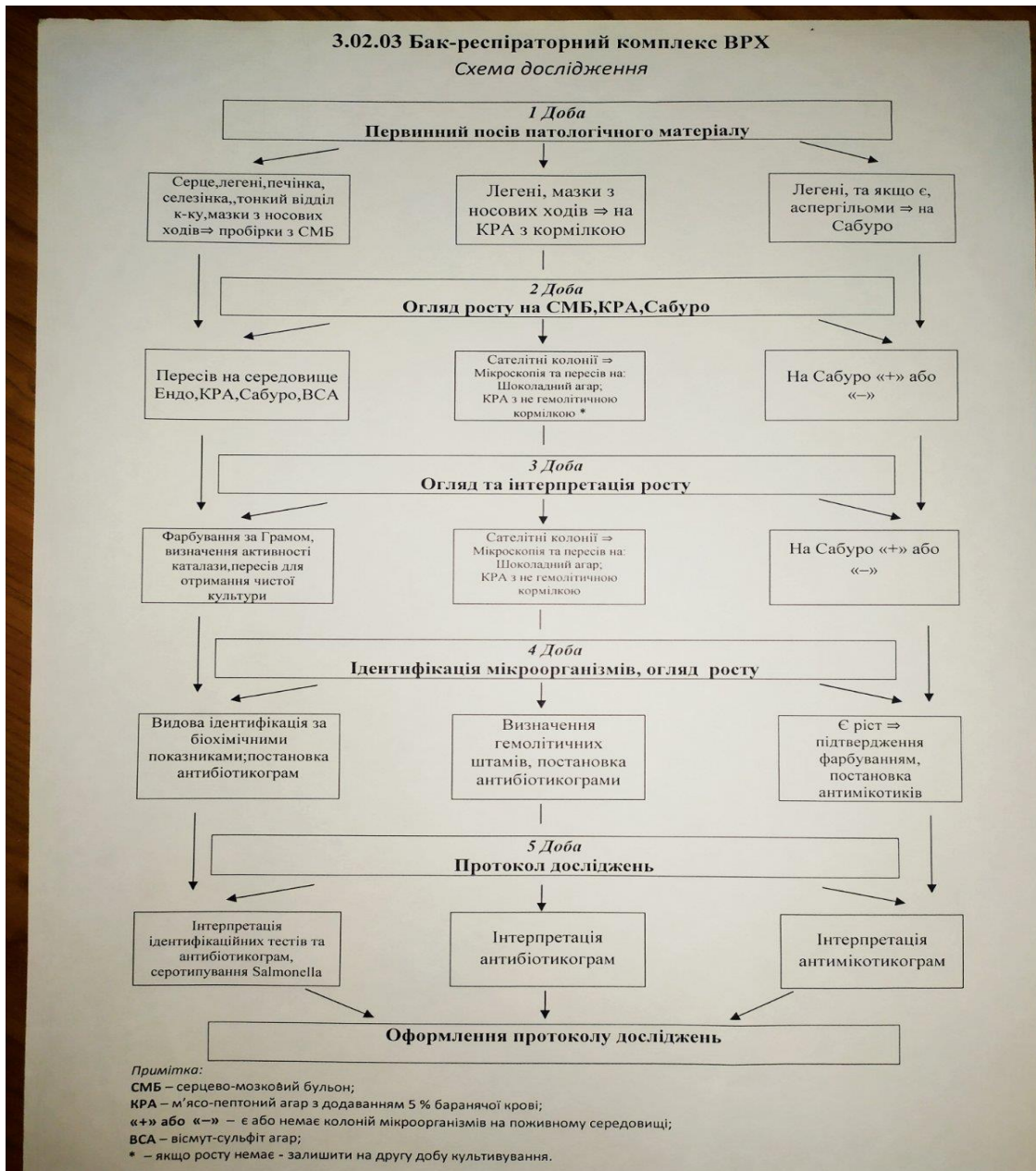
- 18.Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2014. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J Virol.* 78:13440- 13446.
- 19.Huang, L.P., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Guo, L.J., Liu, C.M., 2011. Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. *BMC Microbiol.* 11, 188.
- 20.Hendrikus Jan Wisselink *Streptococcus suis* infections in pigs: use of virulence-associated markers in diagnostics and vaccines / - [S.l.] : [s.n.], 2011 - Tekst. Proefschrift Universiteit Utrecht.
- 21.Honnold C . Porcine respiratory disease complex. <http://www.ces.purdue.edu/pork/health/caryhonnold.html>.
- 22.lena Klochko Salmonellosis Updated: Oct 08, 2015 Medscape. Infectious Diseases Sections. Bacterial Infections / Chief Editor: Michael Stuart Bronze.
- 23.Inverse Polymerase Chain Reaction (PCR). Green MR, Sambrook J. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019 Feb 1;2019(2).
- 24.Kawaoka, Y., Neumann, G., 2012. Influenza viruses: an introduction. *Methods Mol. Biol.* 865, 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-621-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-621-0_1).
- 25.Kume, K., Nakai, T., & Sawata, A. (2014). Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. *Jap. J. Vet. Sci.*, 46(5), 641-647.
- 26.Motovski A. Enzootic (mycoplasmal) pneumonia of pigs. *VM News*, 2013,11-12,8,10.
- 27.Motovski A . Enzootic (mycoplasmal) pneumonia of swine. *Veterinarna Sbirka* ,2014, 7-8, 8-9.
- 28.Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. Hawkins SF, Guest PC. *Methods Mol Biol.* 2017; 1546:125-133.
- 29.PATON, D.J. (2018).InManual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Pro-ducts for Lists A and B Diseases, Vol. 1, B53.Paris.

30. Patrick T. Redig, Luis Cruz-Martinez, in Redig, Luis Cruz-Martinez, in Handbook of Avian Medicine (Second Edition), 2009.
31. QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY BK, CARTER GR 2014: Clinical Veterinary Microbiology. Mosby 684.
32. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). Bachman J. Methods Enzymol. 2013 ;530: 67-74.
33. Susan L. Brockmeier (2014) Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine Vet Microbiol 2004 Mar 26;99(1):75-8.
34. Susan L. Brockmeier (2014) Virulence, Transmission, and Heterologous Protection of Four Isolates of *Haemophilus parasuis* Clin Vaccine Immunol. 2013 Sep; 20(9): 1466–1472.
35. Thacker E.L., Thanawongnuwech R. Porcine respiratory disease complex (PRDC). Thai J Vet Med, 2002, 32, 126-134
36. Xie F, Li G, Zhou L, et al. Attenuated *Actinobacillus pleuropneumoniae* double-deletion mutant S-8 $\Delta$ clpP/apxIIC confers protection against homologous or heterologous strain challenge. BMC Vet Res. 2017;13(1):14. Published 2017 Jan 6.
37. Worthington, 2018 Newport Laboratories/ MN. All rights reserved. POR-0995-NPL0618 / st. 40

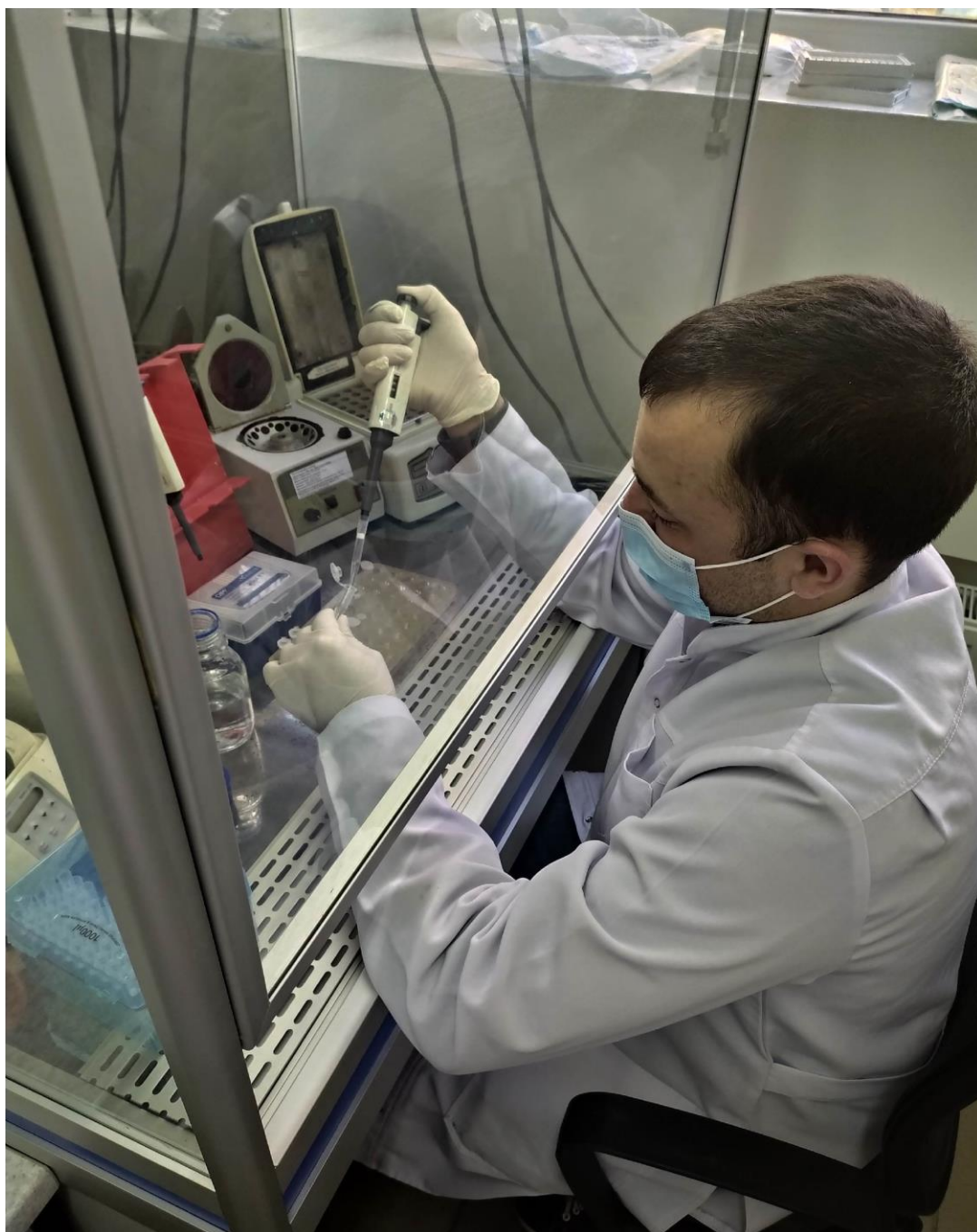


# Додатки

## Додаток 1.



## Додаток 2



## Додаток 3



УДК 61-619

## ОСОБЛИВОСТІ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОЇ ДІАГНОСТИКИ РЕСПІРАТОРНОЇ ПАТОЛОГІЇ СВИНЕЙ ЗА ДОПОМОГОЮ СУЧАСНИХ ЛАБОРАТОРНИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ

Гаман О.С., магістрант, Масюк Д.М., к. вет. н, професор., Кокарев А.В., к. вет. н  
[alexandr.haman@i.ua](mailto:alexandr.haman@i.ua)

Дніпровський державний аграрно-економічний університет,  
 м. Дніпро, Україна

**Вступ (актуальність).** Однією з найбільш розповсюджених проблем у свинарстві є респіраторні хвороби, які займають провідне місце у загальній патології тварин і завдають значних економічних збитків, обумовлюючи зниження їх продуктивності, загибель, вимушений забій і витрати на проведення лікувальних, оздоровчих і профілактичних заходів. З огляду на це актуальним є своєчасна діагностика респіраторної патології з метою ідентифікації домінуючого у патологічному процесі мікроорганізму та визначення їх чутливості до антибактеріальних препаратів.

**Мета роботи** полягає у визначенні особливостей диференціальної діагностики респіраторної патології свиней за допомогою сучасних лабораторних молекулярно-генетичних методів.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведені на свинях групи відгодівлі. Для дослідження було відібрано по три зразка легень від свиней загинувших на 120, 135, 150 добу життя. Було проведено патологоанатомічний огляд біологічного матеріалу та ПЛР дослідження з використанням комерційних тест-систем виробництва Biosella (Франція) та Exorol (Іспанія).

**Результати.** У результаті проведених досліджень було встановлено, що патологоанатомічні зміни за респіраторної патології у свиней на відгодівлі можуть варіювати в залежності від набору збудників, рівня резистентності тварин, особливостей мікроклімату тваринницьких приміщень та проведених превентивних заходів. Переважання в патологоанатомічній картині фібринозно-геморагічного компоненту буде інформувати про гострий і важкий перебіг процесу та присутність *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* та *P. multocida*. Обмежені ущільнені ділянки темно-червоного кольору по периферії легень – типова ознака за мікоплазму. Розміри уражених ділянок при цьому характеризують інтенсивністю інфекційного процесу. Цирковірусна інфекція має переважно мікроскопічні прояви в органах імунного захисту, причому найінтенсивніше вони виражені після зараження тварини. Патологоанатомічна картина при гемофільозному полісерозиті характеризується фібринозним полісерозитом органів грудної порожнини.

Дослідження ПЛР вказують на наявність у легенях тварин 120 доби життя генетичного матеріалу *Circovirus type 2* –  $1,85 \times 10^6 \pm 2,36 \times 10^3$  г.е та *A. pleuropneumoniae* –  $2,65 \times 10^9 \pm 1,14 \times 10^4$  г.е. У свиней 135 добового віку виявлено генетичний матеріал *Circovirus type 2* –  $9,33 \times 10^4$  г.е, *A. pleuropneumoniae* –  $1,85 \times 10^6$  г.е, *G. parasuis* –  $7,65 \times 10^4$  г.е, *M. hyorhinis* –  $1,77 \times 10^3$  г.е, *M. hyorhinis* –  $2,38 \times 10^2$  г.е. У свиней 150 добового віку виявлено генетичний матеріал *Circovirus type 2* –  $3,25 \times 10^5$  г.е, *A. pleuropneumoniae* –  $2,03 \times 10^7$  г.е, *G. parasuis* –  $1,38 \times 10^3$  г.е, *M. hyorhinis* –  $2,46 \times 10^4$  г.е, та *P. multocida* –  $1,83 \times 10^2$ .

### Висновки

Основною інфекційною патологією серед досліджуваних тварин є коінфекція мікроорганізмів *Circovirus type 2* та *A. pleuropneumoniae* 8 серотипу, що у синергії значно посилюють свій патогенний вплив на організм свиней. З часом у патологічному процесі відбувається збільшення різноманіття мікроорганізмів завдяки колонізації у легеневої тканини *M. hyorhinis*, *G. parasuis*, *P. multocida* та *M. Hyorhinis*, що ускладнює перебіг респіраторної патології.