

2. Наиболее предпочтительной для специфической профилактики смешанных вирусно-бактериальных респираторно-кишечных и генитальных инфекций крупного рогатого скота является комплексная (одновременная) иммунизация животных с использованием сочетаний различных инактивированных вирусных и бактериальных вакцин.

Список литературы

1. Труханов Б.Г. Ассоциированные вакцины. // М., Медицина. – С. 178-179. 2. Кадымов, Р.А., Сафаров, Ю.Б. Ассоциированная и комплексная вакцинация животных. // М., Колос. – 1974. – С. 29-52. 3. Иммунопрофилактика болезней животных. Перевод с нем. Н.Б.Черных // М., Колос. – 1981. – С. 136-144. 4. Сергеев, В.А. Вирусные вакцины. // К., Урожай. – 1993. – С. 174-214. 5. Иванов, В.С., Кузнецов, П.П., Школьников, Е.Э. Состояние и перспективы борьбы с бешенством животных и человека // Ветеринарная медицина. – № 2. – М., 2000. – С. 63-65. 6. Игнатов, П.Е. Иммуниет и инфекция. Возможности управления // М., Время. – 2002. – 350 с.

CHARACTERISTICS OF SPECIFIC PREVENTION OF MIXED VIRAL-AND-BACTERIOLOGICAL ENTERO-PNEUMO-GENITAL INFECTIONS OF CATTLE YOUNG GROWTH

Stetsenko V.I.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”,
Kharkov

Literary and own data concerning advantages and disadvantages of live and inactivated vaccines, that are used for specific prevention of mixed viral-and-bacterial entero-pneumo-genital infections of cattle, which are widespread in the farms of Ukraine during last years, are presented in the article.

УДК 619:636.154.3

МОНІТОРИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗРАЗКІВ РОЗПЛОДУ БДЖІЛ НА ГНІЛЬЦІ У ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

Ступак Л.П., Маслій І. Г.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У роботі наведені результати діагностичних досліджень зразків розплоду бджіл на гнільці, які надходили до лабораторії вивчення хвороб бджіл ННЦ «ІЕКВМ» з різних областей України. Патологічний матеріал досліджували згідно з затвердженими методами впродовж 2006 – 2008 років.

За результатами досліджень зразків патологічного матеріалу було встановлено, що кількість позитивних проб від загальної кількості досліджених коливалась за роками від 28,6 % (2007 рік) до 62,5 % (2008 рік). У 2006 році показник ураження сімей бджіл гнільцями становив 42 %.

*При вивченні видового складу збудників гнільців встановили, що в 2007 році була виділена найбільша кількість ізолятів збудника американського гнільцю бджіл *Paenibacillus larvae* (83 %), а в 2006 та 2008 роках – приблизно однакова, відповідно 53,8 % та 40 %.*

Також з'ясували, що гнільцеві хвороби розплоду бджіл можуть перебігати як у вигляді моноінфекцій, так і змішаних форм.

Великих збитків бджільництву завдають хвороби бджіл, серед яких значне місце посідають бактеріальні хвороби розплоду. Медова продуктивність сімей хворих на гнільці, знижується на 20-80 %, а в деяких випадках сім'ї гинуть.

До бактеріальних хвороб розплоду бджіл відносяться американський, європейський гнільці та парагнилець. Найбільш чутливий до ураження бджолиний розплід 3-х добового віку. При захворюваннях розплід стає строкатий, у комірках стільників знаходяться яйця, личинки різного віку (здорові, хворі та загиблі) і лялечки, що перетворилися на гнилісну масу або кірочки [1, 2].

Особливістю хвороб медоносних бджіл є те, що у випадку захворювання одної особини бджолої сім'ї швидко уражаються й інші, тому перебіг захворювання ускладнюється. Крім того, ураження бджолої сім'ї може відбуватися у разі зальоту бджіл і трутнів з одних сімей в інші, бджолої крадіжках меду, продажу бджолої сім'ї і маток з пасік господарств і районів, неблагополучних щодо заразних захворювань, а також у період кочівлі [3, 4].

Успіх боротьби з хворобами бджіл залежить від знань біології розвитку бджолої сім'ї, правильної діагностики захворювань, усунення причин їх виникнення, проведення профілактики, швидкої організації заходів щодо ліквідації захворювання й оздоровлення на пасіках [5].

Матеріали і методи. Робота виконувалась у лабораторії вивчення хвороб бджіл ННЦ «ІЕКВМ» у 2006-2008 роках. Досліджували зразки розплоду бджіл на наявність збудників бактеріальних хвороб, який надходив з пасік різних областей України (щодо запитів виробників). Для дослідження використовували матеріал від хворих і підозрюваних у захворюванні сімей.

Діагностичні дослідження патологічного матеріалу проводили згідно з затвердженими методами («Методичні вказівки по диференційній діагностиці інфекційних хвороб бджіл», затвержені ДДВМ МінАПК 27.12.1991) [6].

Кожний зразок патологічного матеріалу досліджували за такою схемою:

- а) зовнішній (візуальний) огляд стільників;
- б) приготування, забарвлення та мікроскопія мазків з нативного матеріалу;
- в) приготування діагностичного змиву з комірок, що містили загиблих личинок;
- г) висів змиву на поживні середовища;
- д) вивчення культурально—морфологічних, біохімічних властивостей збудників.

З кожного зразка стільника з ураженим розплодом робили змив, краплину якого наносили на предметне скло для мікроскопії патологічного матеріалу.

У разі виявлення свіжо загиблих личинок чи гнилісної маси у комірках, з них готували по 4-5 тонких нативних мазка на предметному склі. За наявності сухих кірочок від загиблих личинок їх попередньо розмочували стерильним фізіологічним розчином протягом 30 хвилин, заливаючи його в комірку. Після витримки, ретельно перемішували вміст комірки пастерівською піпеткою та петлею наносили на поверхню предметного скла.

Два мазки від кожного зразка патологічного матеріалу, без попередньої фіксації фарбували 2 % водним розчином нігрозину або розчином туші за методом Бурі.

Інші 2-3 мазки фіксували над полум'ям газової горілки, один мазок фарбували 2 % спиртово-водним розчином фуксину Циля протягом 1,5-2 хв. і 1-2 мазка — за методом Грама. Після виготовлення мазки висушували, мікроскопіювали в імерсійній системі, об'єктив х90, окуляр х7.

Для виділення чистої культури з патологічного матеріалу готували діагностичний змив. У кожному зразку патологічного матеріалу виявляли комірки з ураженим розплодом чи залишками загиблих личинок. У підібрані 15–20 комірок піпеткою заливали стерильний фізіологічний розчин. Через 20-30 хвилин (якщо матеріал не-свіжий, то через 1-2 години) після ретельного перемішування розчину в комірках пастерівською піпеткою змиви переносили у стерильну пробірку та ділили на три однакові частини.

Для інактивації банальної мікрофлори та спор грибів матеріал в одній пробірці нагрівали до 70 °С протягом 3-4 хвилин. Другу пробірку зі змивом прогрівали на водній бані за температури (96-98) °С, протягом 3-5 хвилин. Третю частину змиву не прогрівали.

Підготовані змиви висівали на живильні середовища:

а) змив, прогрітий до 70 °С, висівали на м'ясопептонний агар і бульйон (рН 7,2-7,4) для виділення *Paenibacillus alvei* і на середовище Томашеца для виділення збудника парагнільцю *Paenibacillus paraalvei*;

б) матеріал, прогрітий за 96 °С, — для виділення збудника американського гнільцю — *Paenibacillus larvae* висівали на спеціальні поживні середовища: середовище Томашеца й агар Уілліса-Гоббза з рН 6,9-7,0;

в) непрогрітій змив — для виділення збудників європейського гнильцю *Melisococcus pluton* і *Streptococcus apis* висівали на середовище Черепова.

Для виділення чистих культур збудників гнильцевих хвороб, особливо *Paenibacillus larvae*, висівали на поверхню поживного середовища достатню кількість суспензії гнилісної маси загиблих личинок. Посіви вирощували у термостаті за температури 35–37 °С. З колоній, що виростили, робили мазки, забарвлювали орієнтовними методами та за методом Грама. Виділені культури для встановлення видової належності вивчали за характерними культуральними ознаками: величина, форма, структура та поверхня колоній, консистенція, колір і наявність пігменту, протеолітична активність на середовищі.

Дослідження біохімічних властивостей виділених культур збудників гнильцевих хвороб проводили лише у випадках отримання сумнівних результатів за попередніх мікроскопічних, бактеріологічних досліджень. Біохімічний тест, який використовували як диференційний діагностичний — це каталазний. У культури *Paenibacillus larvae* та *Melisococcus pluton* цей тест був негативним, у — *Paenibacillus alvei* та *Paenibacillus paraalvei* — позитивним.

Результати досліджень.

За результатами мікроскопії нативних мазків з хворих личинок, які ще не втрапили форми, виявляли збудника американського гнильцю — палички *Paenibacillus larvae*, що розташовані ланцюжками та забарвлені за методом Грама позитивно. У комірка, де загиблі личинки перетворились на гнилісну масу або висохли та утворили кірочки за допомогою мікроскопії знаходили мілкі спори у вигляді маленьких овальних тілець, розміром (1,2–1,8) x (0,6–0,8) мкм з нечіткими контурами, які розташовувались центрально в уривках паличок.

У випадку мікроскопії нативних мазків із нещодавно загиблих личинок виділяли ланцетоподібні коки *Melisococcus pluton*, які в мазках розташовувались поодинокі чи попарно, ланцюжками або у вигляді характерних «розеток». Із тіла личинок з кислим запахом виділили коки *Streptococcus apis*, які розташовувались короткими ланцюжками, спор не утворювали, за методом Грама забарвлювались позитивно. У нативних мазках із застарілих загиблих личинок (із гнилісної маси та кірочок), як правило, виявляли спори *Paenibacillus alvei*, які у паличках розташовувались центрально, за розміром перевищували їх товщину, утворюючи в мазках ряди у вигляді «частоколу».

Видимий ріст збудників гнильцевих хвороб спостерігали через (24–72) год., у двох ізолятів — через 5 дів. Ріст культури *Paenibacillus larvae* на середовищі Уїлліса-Гоббза з'являвся через (48–72) год. у вигляді ніжних, дещо випуклих колоній, розміром (1–3) мм у діаметрі. Всі ізоляти проявили протеолітичну активність, за каталазним тестом були негативними.

Приблизно 60 % виділених ізолятів за первинного посіву на поживні середовища утворювали оранжевий пігмент.

На середовищі Черепова культура *Melisococcus pluton* утворювала мілкі, круглі, випуклі непрозорі колонії діаметром (1–1,6) мм, культура *Streptococcus apis* через 24 год. на агарі утворювала мілкі, прозорі колонії, які легко знімалися бактеріологічною петлею, тест на каталазу — негативний.

Через добу на МПА з'являвся ріст *Paenibacillus alvei*, у вигляді колоній неправильної форми («роги оленя») сіро-жовтого кольору, на МПБ спостерігали рівномірне помутніння бульйону та на (3–5) добу на його поверхні утворювалась сірувата не стабільна плівочка зі слабким кільцем навколо стінки пробірки, тест на каталазу — позитивний.

У процесі лабораторних досліджень патологічного матеріалу, а саме зразків розплоду, меду та загиблих личинок) було виділено збудників гнильцевих хвороб. Результати досліджень наведені в таблиці 1.

Так, кількість позитивних проб від загальної кількості досліджених коливалась по роках від 28,6 % (2007 рік) до 62,5 % (2008 рік). Найбільше культур *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Melisococcus pluton*, *Streptococcus apis* було виділено зі зразків розплоду, але збудників гнильців також виділяли з меду та загиблих личинок.

Результати вивчення видового складу збудників гнильців наведено у таблиці 2.

Таблиця 1 – Результати дослідження патологічного матеріалу

Роки	2006	2007	2008
Всього досліджено зразків	31	42	24
%	100	100	100
Із них: позитивних	13	12	15
%	42	28,6	62,5
негативних	18	30	9
%	58	71,4	37,5

Таблиця 2 – Видовий склад збудників гнильців, виділених з патологічного матеріалу

Збудники хвороб	Назва хвороби та кількість вилучених культур					
	2006		2007		2008	
	всього	%	всього	%	всього	%
Всього виділено культур	13	100	12	100	15	100
В т.ч.:	Американський гнилець					
<i>Paenibacillus larvae</i>	7	53,8	10	83,0	6	40,0
	Європейський гнилець					
<i>Melisococcus pluton</i>	1	7,7	1	8,5	6	40
<i>Paenibacillus alvei</i>	5	38,5	1	8,5	2	13,3
<i>Streptococcus apis</i>	–		–	–	1	6,7

Аналізуючи дані таблиці 2 бачимо, що в 2006 та 2008 роках була виділена приблизно однакова кількість ізолятів збудника американського гнильцю бджіл *Paenibacillus larvae*, відповідно 53,8 % та 40 %, а в 2007 році – найбільша (83 %).

Разом з збудником американського гнильцю з досліджуваного патологічного матеріалу вилучали значну кількість ізолятів європейського гнильцю, основних збудників якого є декілька. У різні роки превалював один з них. Так, у 2006 році було виділено більше ізолятів *Paenibacillus alvei* (5 культур), а в 2008 – *Melisococcus pluton* (6 культур). У 2007 році реєстрували незначну кількість зазначених ізолятів, відповідно по одній культурі *Melisococcus pluton* та *Paenibacillus alvei*.

Враховуючи те, що за літературними даними, а також за нашими попередніми результатами досліджень [7,8] встановлено, що гнильці в сучасних умовах найчастіше перебігають у прихованій формі, або без наявності характерних клінічних ознак, ми проводили диференційну діагностику гнильцевих хвороб. Результати досліджень наведені в таблиці 3.

Таблиця 3 – Диференційна діагностика гнильцевих хвороб розплоду бджіл

Роки		2006	2007	2008	
Моноінфекції	Американський гнилець	культури	5	9	6
		досл. зразки	5	9	6
	Європейський гнилець	культури	5	1	7
		досл. зразки	5	1	7
Змішані форми гнильців	культури	5	6+1*	4	
	досл. зразки	3	2	2	

* – асоціація з *Ascospaera apis*

Як видно з таблиці 3, гнильцеві хвороби розплоду бджіл можуть перебігати у вигляді як моноінфекцій, так і змішаних форм. Так, у 2006 році було виділено 5 культур різних збудників гнильців з трьох зразків патологічного матеріалу. З двох зразків розплоду одночасно було отримано дві культури *Paenibacillus alvei*, а також одну – *Paenibacillus larvae*. Ще з одного зразку було виділено відразу два збудники європейського гнильцю: *Melisococcus pluton* та *Paenibacillus alvei*. У 2007 році спостерігали два випадки змішаного перебігу гнильцевих хвороб: з трьох зразків патологічного

матеріалу виділили одну культуру *Paenibacillus larvae* й одну – *Paenibacillus alvei* та з двох зразків розплоду отримали два ізоляти *Paenibacillus larvae* й один – *Melisococcus pluton*, а також одну асоціацію *Paenibacillus larvae* з *Ascospaera apis*. У 2008 році реестрували змішану форму американського гнильцю з європейським, а також асоціацію *Melisococcus pluton* і *Paenibacillus alvei*.

Висновки. 1. Різноманіття видів збудників інфекційних захворювань, що уражали розплід бджіл, спричиняло змішані форми перебігу хвороб. Наведені дані свідчать про високі показники захворюваності бджіл як моно-, так і змішаними формами прояву інфекційних хвороб.

2. Остаточний діагноз можна встановити тільки у лабораторних умовах. Тому патологічний матеріал з пасік усіх форм власності необхідно своєчасно направляти для досліджень, це дозволить виявити хворі сім'ї на ранніх стадіях захворювання та попередити ураження здорових сімей.

Перспектива подальших досліджень. Враховуючи вищезазначене, перспективою подальших досліджень буде розробка сучасних методів диференційної діагностики збудників гнильців.

Список літератури

1. Гробов, О. Ф. Болезни и вредители медоносных пчел / О.Ф.Гробов, А.М. Смирнов, Е.Т. Попов. – М.: Агропромиздат, 1987 – С. 19 – 35. 2. Piccini, C., Antunez, K., Zunino, P. An approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora // J.apic.Res 2004; – Vol. 33, N 3, – P. 101 – 104. 3. Goodwin, M. American foulbrood control: the New Zealand approach // Bee World, 2005; – T86, N 2 – P. 44 – 45. 4. Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on *Paenibacillus larvae* spore loads / Del Hoyo M.L.; Basualdo M.; Lorenzo A. и др. // J.apic.Res., 2001; – Vol. 40, N 2, – P. 65 – 69. 5. Руденко, Е. В. Опыт организации ветеринарных мероприятий в крупных пчеловодческих хозяйствах / Е. В. Руденко, О. В. Свиридов, Н. В. Темный. // Міжвідомчий тематичний науковий збірник – Харків, 2002 – С. 521-530. 6. Методичні вказівки по диференційній діагностиці інфекційних хвороб бджіл, затверджені ДДВМ МінаПК 27.12.1991. 7. Руденко, Є.В. Змішані хвороби бджіл / Є.В. Руденко, І. Г. Маслій // Матеріали / 5-й міжвузовський конгрес паразитологів України, 29-30 октября 1997, Луганск, 1998. – С. 154-155. 8. Руденко, Є.В. Змішані хвороби бджіл / Є.В. Руденко І. Г. Маслій, С. М. Немкова // Матеріали наук.-практ. Конф. Паразитологів, м. Київ 3-5 листопада 1999. – С. 150-154 (НАУ).

MONITORING INVESTIGATIONS OF THE BEE BROOD SAMPLES ON THE FOUL BROODS IN LABORATORY CONDITIONS

Stupak L.P., Masliy I.G.

NSC “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv

Results of diagnostic investigations of bee brood samples concerning foul broods, which were received by the Laboratory of bee diseases of the NSC “IECVM” are presented in the paper. Pathological material was investigated according to approved methods. As a result of conducted investigations of pathological material there was determined, that the number of positive samples from total number was from 28,6 % (2007) to 62,5 % (2008.). There was also determined that foul broods may occur both as monoinfections and as mixed forms of course.