

DEFINITION OF BACTERICIDAL PROPERTIES OF THE DRUG «ORGASEPT»

Kovalenko V. L.*Institute of Veterinary Medicine of National Academy of Ukraine, Kyiv, Ukraine***Paliy A. P.***National Science Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkiv, Ukraine***Zagrebelnyi A. V.***National Research Institute for laboratory diagnostics and veterinary-sanitary examination, Kyiv, Ukraine***Kunitsky V. A.***ООО «NPP «Bristol-Farm», Kyiv, Ukraine***Balyu Yu. P.***Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine***Kolomiets Yu. V.***National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine*

To disinfect the equipment at meat processing plants prompted us to apply a disinfectant, which contains lactic acid and metal nanoparticles. One of the main advantages of these components is a rapid penetration into the midst of pigment and organic contaminants and their dissolution. So needless disinfectant, detergent composition by Argentum nanoparticles enhances the action of acid and increases its bactericidal effect. Disinfection equipment can be carried out in the hot and cold water. The aim of the work was to study the bactericidal effect of different concentrations of the drug based on benzalkonium chloride, silver nanoparticles and lactic acid in *S. aureus* for the decontamination of equipment at a meat processing plant.

To study took germicide «Orgasept» based benzalkonium chloride, metal nanoparticles Argentum and lactic acid based on existing techniques.

The studies found that the action «Orgasept» preparation mechanism is based on dehydration of microbial cells directed transport of particles to the cell surface to form areas of local abnormally high concentration of biological inactivating agent to the surface to form «local breakdown» zones, which leads to the destruction of biospraying microorganisms.

The bactericidal action «Orgasept» with respect to *S. aureus* stronger bactericidal effect of carbolic acid in 4,6 times, and its bactericidal activity in the presence of a protein decreases 0.714 times.

Preparation «Orgasept» exhibits bactericidal activity against *S. aureus* at a concentration of 0.05% at 10 min exposure.

Presented as part of the means «Orgasept» active compounds are promising basis for the development of effective antibacterial agents. It is planned to conduct studies of the fungicidal properties of the disinfectant.

Keywords: disinfection, microorganism, biosafety, drug «Orgasept», *S. aureus*, concentration, exposure

УДК: 619:618-555.3

ПОРІВНЯЛЬНІ МОНИТОРИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРОЗІВ БДЖІЛ ШЛЯХОМ ЕПІЗООТОЛОГІЧНОГО ОБСТЕЖЕННЯ ТА БІОЛОГІЧНОЇ ПРОБИ

Маслій І. Г., Нємкова С. М., Десятникова О. В.*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: matmas@ukr.net***Матковська С. Г.***Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків, Україна*

Проведено дослідження вірозів бджіл шляхом порівняння методів епізootологічного обстеження, а також постановки біологічної проби і ПЛР. Встановлено, що вірусні хвороби імаго бджіл за різних еко-географічних умов реєструються наприкінці весни, влітку та на початку осені за умови тривалих беззяткових періодів, похолодань або сильної спеки, а також недотримання ветеринарно-санітарних правил утримання сімей бджіл з такими клінічними ознаками: ураження нервової системи (тремтіння кінцівок та крил), а також почорніння, затвердіння черевця, втрата на ньому волосків. За умови

ураження розплоду вірусом SBV реєстрували утворення мішечку з рідиною та подальшим почорнінням і утворенням кірочки. Позитивними виявились 178 з 1496 проб. Встановлено, що позитивними у ПЛР виявились 38 % із досліджених позитивних проб (67). Серед них вірус гострого паралічу бджіл виявлено у 16,5 % випадків, хронічний – 34,3 %, деформації крила – 13,4 %, мішечкуватого розплоду – 35,8 %. У процесі постановки біопроби діагноз підтверджено на гострий і хронічний вірусний параліч. При цьому відтворити клінічну картину деформації крил та загибелі розплоду не вдалося.

Ключові слова: хвороби бджіл, ентомопатогенні віруси, епізоотологічне обстеження, біологічна проба, середня тривалість життя бджіл

Особливо небезпечні хвороби бджіл є загрозою для бджільництва, оскільки вони спричиняють ослаблення сили сімей і загальної продуктивності в цілому. Особливе місце серед заразної патології бджіл займають вірусні інфекції. За літературними даними [2] відомо, що близько двох десятків вірусів спричинюють захворювання бджіл, серед яких є такі, як віруси гострого та хронічного паралічу, мішечкуватого розплоду, деформації крила, нитковидний, кашмір-вірус та інші.

Основна роль у поширенні вірусів відводиться міграції самих комах. Важлива роль належить вірусифорам – комахам-переносникам ентомопатогенних вірусів. Наприклад, робочі бджоли, матки і трутни є хазяями для кліщів *Acaripis*, *Varroa*. Кліщі, в процесі живлення гемолімфою інфікованих бджіл, стають вірусифорними. Бджоли можуть залітати в чужі вулики і, таким чином, поширювати інфікованих кліщів між сім'ями і пасіками, і, як наслідок переносити віруси [1, 2]. У природі мають місце змішані інфекції сімей бджіл як з різними вірусами, так і патогенами іншої природи. Так, в першу чергу, потрібно відзначити наявність в гніздах бджіл грибів роду *Aspergillus*, патогенних як для комах, так і для тварин, птахів і людей. З бактеріальних агентів, що викликають захворювання у бджіл необхідно відзначити збудників хвороб розплоду: американського гнильця – *Paenibacillus larvae subs. larvae*, європейського – *Melissococcus pluton*, а також імаго бджіл – ентеробактерії [4, 5].

З описаних в даній час більше 20 різних вірусів, патогенних для медоносної бджоли більшість зберігаються в організмі комах, викликаючи безсимптомну інфекцію. Однак, в стресових ситуаціях, латентні віруси можуть уражати особини різних вікових стадій бджіл.

Різні віруси уражають різні стадії розвитку бджіл, наприклад, вірус мішечкуватого розплоду є патогенним для розплоду (личинки та лялечок), віруси гострого та хронічного паралічу, деформації крила уражають імаго бджіл [3, 5].

Діагностика вірусів доволі складна. По-перше, відсутність специфічних клінічних ознак. Такі клінічні прояви, як «розкрилиця», тремтіння крил та лапок, почорніння черевця та втрата волосків можуть виникати і за інших хвороб. По-друге, через складність культивування *in vitro*, внаслідок чого збудники мало вивчені. По-третє, перебіг захворювань у латентній формі не дає можливості вчасно поставити правильний діагноз [6, 7].

Світова практика свідчить про те, що у лабораторних умовах ідентифікувати ентомопатогенні віруси можна тільки за допомогою електронно-мікроскопічного дослідження або з використанням серологічних реакцій, наприклад імунодифузії, високо специфічних реакцій – ПЛР.

В Україні ці методи розроблені не достатньо. На сьогоднішній день попередній діагноз встановлюється за клінічними ознаками, позитивними результатами біологічної проби та результатами електронної мікроскопії.

Мета роботи – проведення порівняльних моніторингових досліджень вірусів бджіл шляхом епізоотологічного обстеження та біологічної проби.

Матеріали та методи. Дослідження щодо наявності ураження сімей бджіл ентомопатогенними вірусами проводили за загальноприйнятими в епізоотології методами (І. А. Бакуллов, А. Д. Третьяков, 1979, А. А. Сидорчук та ін., 2004). Застосовували епізоотологічний та клінічний методи досліджень [1].

Нами було досліджено 1 % сімей бджіл у господарствах, з якими були укладені договори. Обстежували усі бджолині сім'ї. Патологічний матеріал відбирали від тих сімей бджіл, у яких в процесі епізоотологічного обстеження реєстрували характерні клінічні ознаки, а саме «розкрилицю», тремтіння крил, втрату молодими бджолами волосків на черевці та його почорніння, втрату комахами рухомості та загибель коло льотка.

Таких бджіл, ще живими у кількості до 100–150 штук, збирали, консервували у розчині 50 % гліцерину та доставляли до лабораторії, де частину з них використовували для постановки біологічної проби, а частину – для полімеразно-ланцюгової реакції зі специфічними праймерами.

Для біологічної проби у чотири ентомологічні садки із клінічно здорових сімей відбирали по (50–100) однодобових бджіл і формували дослідні та контрольні групи. Для отримання бджіл одного віку із здорових сімей брали стільники з запечатаним розплодом (бджоли на виході) та витримували в термостаті за температури (32±1) °C протягом 5 діб. Молодих бджіл струшували у ентомологічні садки по (50–100) особин.

З уражених бджіл готували суспензію: 50 особин розтирали із стерильним піском у ступці, до суміші додавали дистильовану воду у співвідношенні 1:4, центрифугували за 8000 об/хв. впродовж (15–20) хв, надосадову рідину фільтрували через пластину фільтра Зейтца. Одержаний фільтрат використовували для зараження бджіл у ентомологічних садках. Дослідним особинам фільтрат вводили у гемоціль у дозі 0,002 см³ із мікрошрица (перша дослідна група), а також згодовували з 50 % розчином цукрового сиропу у співвідношенні 1:4 (друга дослідна група). Також ставили контролю: перший – бджолам у гемоціль вводили фільтрат суспензії із здорових бджіл, другий – згодовували 50 % розчин чистого цукрового сиропу. Ентомологічні садки витримували у термостаті за температури (32±1) °C протягом 15 діб. У подальшому бджоли в усіх садках отримували 50 % розчин чистого цукрового сиропу. За бджолами вели спостереження і визначали кількість загиблих та наявність характерних клінічних ознак. Кількість останніх враховували до тих пір, доки у садках не залишились половина попередньо узятих у дослід бджіл.

Тривалість життя бджіл розраховували за формулою Смірнова А. М. і Стройкова С. А. (1977):

$$T_{ж} = (a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n) / N, \quad (1.1)$$

де: $T_{ж}$ – тривалість життя бджіл,

a_1, a_2, a_3, a_n – кількість живих бджіл після 1, 2, n днів після введення фільтрату та згодовування корму,

N – кількість бджіл на початку досліджу.

Результати досліджень. Патологічний матеріал із сімей бджіл відбирали наприкінці весни, влітку та на початку осені, а також за умови тривалих безвзяткових періодів, похолодань ат сильної спеки. У процесі епізоотологічного обстеження у бджіл із хворих сімей реєстрували такі характерні клінічні ознаки, як «розкрилицю», тремтіння і наявність недорозвинутих крил, втрату молодими бджолами волосків на черевці та його затвердіння і почорніння, втрату комахами рухомості та загибель коло льотка. Загіблі личинки мали вигляд мішечка з рідиною, спочатку жовто-коричневого кольору, а згодом перетворювались у чорні човноподібної форми кірочки, що легко виймалися з комірок.

Всього було досліджено 1496 проб патологічного матеріалу із 17 областей України. З них було відібрано 178 проб з ознаками вірозов та досліджено у ПЛР з відповідними праймерами до вірусів гострого і хронічного паралічу, деформації крила та мішечкуватого розплоду. У період 2011–2015 рр. в процесі постановки біологічної проби було використано 67 проб патологічного матеріалу (тих, що за результатами ПЛР були позитивними). Результати епізоотологічного моніторингу наведені у таблиці 1.

Таблиця 1 – Динаміка досліджених на вірусні хвороби бджіл

Роки	2011	2012	2013	2014	2015	Всього за 2011–2015 рр./ %
Всього досліджено:	27	36	38	47	30	178 / 100
У т. ч.: Гострий параліч	2	–	3	5	1	11 / 16,5
Хронічний параліч	6	1	11	5	–	23 / 34,3
деформації крила	–	3	4	2	–	9 / 13,4
Мішечкуватий розплід	–	1	5	12	6	24 / 35,8
Всього позитивних	8	5	23	24	7	67 / 38

Аналізуючи дані таблиці 1 необхідно зазначити, що найменшу кількість позитивних випадків захворювання бджіл на вірози реєстрували у 2012 році (5), найбільшу у 2014 році (24). За визначення питомої ваги кожного із досліджуваних вірусів встановлено, що найпоширенішими були збудники мішечкуватого розплоду та хронічного паралічу – 35,8 % та 34,3 % від загальної кількості позитивних випадків відповідно. Хворобу деформації крила та гострий вірусний параліч реєстрували у 13,4 % та 16,4 % пробах відповідно.

Результати досліджень методом біологічної проби узагальнені та представлені у таблицях 2 та 3 в залежності від наявності певного вірусу.

Таблиця 2 – Узагальнені результати біологічної проби за діагностики гострого паралічу у бджіл

Групи	Загибель бджіл по добах (шт.)															Тривалість життя
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
I	0	3	3	9	8	20	7	–	–	–	–	–	–	–	–	4,2
	0	3	5	9	12	15	6	–	–	–	–	–	–	–	–	3,98
	0	0	3	7	11	22	4	3	–	–	–	–	–	–	–	4,52
Середня тривалість життя бджіл																4,2
II	0	0	2	5	5	6	7	7	10	8	–	–	–	–	–	6,24
	0	0	0	7	5	8	7	7	6	5	5	–	–	–	–	6,3
	0	0	0	6	8	6	6	8	10	6	–	–	–	–	–	6,12
Середня тривалість життя бджіл																6,22

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	2	2	14,44
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	2	3	13,36
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	3	3	14,42
Середня тривалість життя бджіл																14,07
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	14,68
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	14,62
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	14,72
Середня тривалість життя бджіл																14,67

У 11 випадках загибель дослідних бджіл з характерними ознаками гострого перебігу захворювання відбулась на 4–6 добу. Із даних таблиці 2 видно, що початок загибелі бджіл у групах I та II реєстрували уже з 2–4 доби спостереження. У випадку зараження бджіл у гемоціль повна загибель спостерігалась до 7–8 доби. Середня тривалість життя бджіл складала 4,2 доби. Більш тривалишим виявилось життя бджіл за умови зараження їх цим же матеріалом тільки шляхом згодовування його з цукровим сиропом. Повністю бджоли загинули на 10–11 добу. Середня тривалість життя складала 6,22 доби. Це підтверджує припущення щодо наявності збудника гострого вірусного паралічу у цих зразках патологічного матеріалу.

Таблиця 3 – Узагальнені результати біологічної проби за діагностики хронічного паралічу у бджіл

Групи	Загибель бджіл по добах (шт.)															Тривалість життя
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
I	0	0	0	7	5	6	7	7	10	8	–	–	–	–	–	6,28
	0	0	0	3	5	8	7	7	11	4	5	–	–	–	–	6,68
	0	0	0	0	2	4	8	13	10	13		–	–	–	–	7,28
Середня тривалість життя бджіл																6,75
II	0	0	0	0	0	4	6	10	12	8	9	1	–	–	–	7,9
	0	0	0	0	0	6	6	8	10	6	12	2	–	–	–	7,68
	0	0	0	0	0	3	8	11	10	7	4	4	3	–	–	8,06
Середня тривалість життя бджіл																7,88
III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	3	2	2	14,20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	3	2	3	14,28
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	3	14,34
Середня тривалість життя бджіл																14,27
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	14,70
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4	14,66
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	14,78
Середня тривалість життя бджіл																14,71

У 23 випадках реєстрували характерні клінічні ознаки хронічного вірусного паралічу у загиблих бджіл на 7–9 добу після зараження (табл. 3). Середня тривалість життя складала у першій групі 6,75 діб, другій – 7,88. Бджоли третьої та четвертої груп в усіх дослідках частково залишались живими до кінця досліді (строку спостереження – 15 діб). Середня тривалість життя бджіл у третій групі складала (14,07–14,27), у четвертій – (14,67–14,71) відповідно. Результати дослідження свідчать про можливу наявність у цих зразках вірусу хронічного паралічу.

Відтворити у експериментальних умовах клінічну картину недорозвинутих крил (9) та загибелі розплоду (24) не вдалося. Тривалість життя бджіл при цьому ніяк не відрізнялась від тих, що були у контролі. Це підтверджує літературні дані про латентний перебіг більшості вірусних інфекцій.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Встановлено, що вірусні хвороби імаго бджіл за різних еко-географічних умов реєструються наприкінці весни, влітку та на початку осені за умови тривалих безвзяткових періодів, похолодань або сильної спеки, а також недотримання ветеринарно-санітарних правил утримання сімей бджіл з такими клінічними ознаками:

ураження нервової системи (тремтіння кінцівок та крил), а також почорніння, затвердіння черевця, втрата на ньому волосків. За умови ураження розплоду вірусом SBV реєстрували утворення мішечку з рідиною з подальшим почорнінням та утворенням кірочки. Позитивними виявились 178 з 1496 проб. Встановлено, що позитивними у ПЛР виявились 38 % із досліджених позитивних проб (67). Серед них вірус гострого паралічу бджіл виявлено у 16,5 % випадків, хронічний – 34,3 %, деформації крила – 13,4 %, мішечкуватого розплоду – 35,8 %. У процесі постановки біопроби діагноз підтверджено на гострий і хронічний вірусний параліч. Відтворити клінічну картину деформації крил та загибелі розплоду не вдалося.

Перспективами подальших досліджень є розробка вітчизняних тест-систем для діагностики у ПЛР та вивчення генетичної варіабельності ентомопатогенних вірусів, що циркулюють на території України.

Список літератури

1. Бакулов, И. А. Руководство по общей эпизоотологии [Текст] / И. А. Бакулов, А. Д. Третьяков. – М.: Колос, 1979. – 424 с.
2. Брус В. А. Клещи – носители патогенных возбудителей медоносных пчёл / В. А. Брус, К. Ж. Хакет, Х. Шимануки // Апиакта: Междунар. техн. Журнал по экономике и пчеловодной информации. – Бухарест: Апиомондия, 1991. – Т. XXVI, № 4. – С. 116–120.
3. Гробов О. Ф. Вирозы пчёл / О. Ф. Гробов, Ю. М. Батуев, Н. В. Кузьмичева, Е. В. Сичанок // Пчеловодство, №№ 7, 8, 9, 10.
4. Кох В. Вирусные заболевания медоносных пчёл с учётом их связи с варроатозом / В. Кох // Апиакта: Междунар. техн. Журнал по экономике и пчеловодной информации. – Бухарест: Апиомондия, 1989. – Т. XXIV, № 4. – С. 109–115.
5. Маслий И.Г. Клещ *Varroa destructor* и инфекционные болезни медоносной пчелы *Apis mellifera* L. / И. Г. Маслий, С. Н. Немкова, О. В. Свиридов // *Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.* – Х., 2005. – Т. I, Вып. 85. – С. 753 – 756.
6. Маслий И. Г. Проблемы взаимоотношений пчёл и энтомопатогенных вирусов / И. Г. Маслий // *Живые объекты в условиях антропогенного процесса. Материалы X Международной научно-практической конференции.* г. Белгород, 15–18 сентября 2008 г. – Белгород: ИПЦ «ПОЛИТЕРРА», 2008. – С. 125.
7. Allen, M. The incidence and world distribution of honey bee viruses / M. Allen, B. Ball // *Bee World*, 1996. – № 77, P. 141–162.

COMPARATIVE STUDY MONITORING OF VIRUSES BY BEES EPIZOOTIC EXAMINATION AND BIOLOGICAL SAMPLE

Masliy I. G., Nyemkova S. M., Desiatnikova O. V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Matkovskaya S. G.

Kharkiv State Veterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

A study by comparing viroziv bees epizootic examination methods, as well as setting a biological sample and PCR. Established that viral disease of adult bees in different eco-geographical conditions recorded in late spring, summer and early autumn, provided bezvz'yatkovyh long periods, cold spells or extreme heat, and failure veterinary and sanitary regulations keeping bee families with clinical signs: nervous system (shaking limbs and wings) and blackening, hardening of the abdomen, loss of hair on it. With the defeat of the brood virus SBV registered education bag with liquid and further blackening and the formation of crusts. 178 proved positive with 1496 samples. Found that proved positive in PCR doslidzhenyhpозytyvnyh 38% of samples (67). Amongthem acute paralysis virus are bees were found in 16.5% of cases, chronic - 34.3%, deformation wings - 13.4%, saccular brood - 35.8%. In the process of setting bioassay confirmed diagnosis of acute and chronic viral paralysis. This vidvtoryty clinical picture of deformation of the wings and the death of brood failed.

Keywords: *bee diseases, entomopathogenic viruses, epizootic survey, biological sample, the average life of bees*