

На правах рукописи

НОВИКОВА ОКСАНА БОРИСОВНА

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫХ И
УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ВЫДЕЛЯЕМЫХ ОТ ПТИЦ**

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и ИММУНОЛОГИЯ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации

на соискание учёной степени

кандидата ветеринарных наук



Санкт-Петербург

2004

Работа выполнена в отделе микробиологии Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства

Научный руководитель - доктор ветеринарных наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Борисенкова Адель Наумовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Калишин Николай Михайлович

кандидат ветеринарных наук
Персов Аркадий Семёнович

Ведущая организация - Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии
им. Я.Р.Коваленко

Защита состоится «1» мая 2004 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГОУ ВПО «Санкт-
Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (196084,
Санкт-Петербург, Черниговская ул., д. 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО
«Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины».

Автореферат разослан «31» мая 2004 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

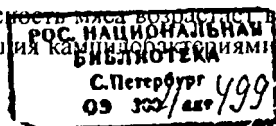
О.В.Узюмова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Птицеводство - наиболее наукоёмкая и динамичная отрасль мирового и отечественного сельского хозяйства. За последние 20 лет среднегодовой прирост яиц в мире составил 4,4%, а мяса птицы - 5,2%. По расчётам специалистов в 2022 году по удельному весу мясо птицы будет занимать первое место среди всех видов животных (Фисинин В.И., 2004). В условиях экономической реформы, в агроценозах повышается риск возникновения и распространения инфекционных, и, в частности, бактериальных болезней птиц. Наличие их в хозяйстве негативно сказывается не только на эпизоотической ситуации, но и на экономике предприятия. Возбудители бактериальных болезней в отдельности или в ассоциации оказывают существенное влияние на падёж птицы при остром или подостром течении заболевания (пастереллёз, колибактериоз, стафилококкоз и другие). При хронических, вялотекущих болезнях бактериальной этиологии отмечают неравномерный или низкий прирост массы бройлеров, повышенную чувствительность птицы к стрессам, снижение яйценоскости и выводимости цыплят, ухудшение биологических качеств эмбрионов, низкую конверсию корма, снижение поствакцинального противовирусного иммунитета (Борисенкова А.Н., 2001).

Бактериальные болезни птиц следует рассматривать в двух аспектах - с позиции опасности для сельскохозяйственной птицы, т.е. в аспекте противоэпизоотической защиты и предотвращения экономических потерь как основного показателя эффективности птицеводства, и с позиции возможности заболевания людей, т.е. в аспекте противоэпидемиологической защиты, защиты здоровья людей (Борисенкова А.Н., 1998). Имеется достаточно широкий спектр микроорганизмов, персистирующих в организме кур в основном в кишечнике, не вызывающих клинического заболевания их, но эпидемиологически опасных. Птицы могут быть носителями многих зоопатогенных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Особое внимание должно быть обращено на то, что сельскохозяйственные птицы могут являться носителями эпидемиологически опасной кишечной микрофлоры, ведущими представителями которой являются *Salmonella enteritidis* и *Campylobacter jejuni*. При нарушении санитарных правил получения птицеводческой продукции происходит контаминация её, что может в конечном итоге привести к заболеванию людей, и особенно детей (Максимова З.Н., 1987; Козак С.С., Гусев А.А., Лищук А.П., Берлова Г.А., 1992; Борисенкова А.Н., 1995; Waldroup A.I., 1996; Кафтырева Л.А., 1999 и др.). Одним из таких заболеваний является кампилобактериоз.

Возбудитель кампилобактериоза является комменсалом желудочно-кишечного тракта птиц. Это определяет бессимптомное течение инфекции и возможность реализации населению контаминированной птицеводческой продукции кур без ограничения, что способствует распространению кампилобактериоза. Эпидемиологическая опасность мяса возрастает в связи с тем, что даже незначительная его контаминация кампилобактериями (4 К.О.Е. на



1 г мяса) может быть опасной для человека (Черкасский Б.Л., Минаев В.И., 1993).

В этой связи изучение спектра микроорганизмов, выделяемых от разных видов и кроссов сельскохозяйственной птицы в хозяйствах различного технологического направления, усовершенствование методов контроля и профилактики бактериальной инфицированности птиц является объективной необходимостью.

Цель работы. Целью настоящих исследований явилось изучение спектра микрофлоры, выделяемой от разных видов птиц на птицефабриках различного технологического направления и усовершенствование методов контроля эпидемиологически опасных и условно-патогенных микроорганизмов - возбудителей бактериальных болезней.

Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

- выделить, идентифицировать и выявить доминирующие виды микроорганизмов от птиц разных видов и возрастов на птицефабриках различного технологического направления и изучить их вирулентные свойства;
- освоить и модифицировать методы лабораторной диагностики кампилобактериоза птиц, изучить уровень инфицированности кур кампилобактериями на различных птицефабриках и определить удельный вес кампилобактерий в спектре микрофлоры, выделяемой с помётом птиц;
- изучить микрофлору, выделяемую в смывах с тушек кур и воде из ванн охлаждения на различных технологических этапах процесса уоя;
- определить эффективность препарата энрофлоксацина отечественного производства в отношении микроорганизмов, выделяемых от птиц;
- усовершенствовать методы контроля эпидемиологически опасных и условно-патогенных микроорганизмов, выделяемых от птиц.

Научная новизна. Изучен спектр эпидемиологически опасной и условно-патогенной микрофлоры, выделяемой от кур яичных и бройлерных пород, индеек, гусей. Из различных объектов выделены микроорганизмы 19-ти видов. Впервые от птиц выделены культуры микроаэрофильного стрептококка, относящегося к роду *Melissococcus*. Установлена идентичность микрофлоры, выделяемой из трупов цыплят и кур и групповых проб помёта.

Предложена ускоренная схема идентификации энтеробактерий, выделяемых от птиц.

Изучены вирулентные свойства 46 микроорганизмов 8-ми видов, выделенных из помёта и трупов птиц на модели интраорбитального заражения цыплят первых дней жизни и на модели внутривенного заражения цыплят и кур. Впервые получены данные по вирулентности культур *Citrobacter freundii*.

Модифицирована методика выделения кампилобактерий из помёта птиц, внутренних органов, смывов с тушек и ванн охлаждения. Впервые в качестве компонента среды для выделения кампилобактерий использована кровь нового биологического объекта - птицы.

Впервые-выявлен-удельный вес кампилобактерий на фоне микрофлоры, выделяемой из помёта кур.^{1 i}

Проведены бактериологические исследования смывов с тушек кур на различных технологических этапах процесса убоя и проб воды из ванн охлаждения, установлена идентичность микрофлоры, выделяемой из групповых проб помёта птиц и в убойном цехе птицефабрики.

Для снижения бактериальной инфицированности птиц эпидемиологически опасной и условно-патогенной микрофлорой показана эффективность препарата отечественного производства из группы энрофлоксацинов.

Предложен прижизненный метод контроля инфицированности птиц бактериальной микрофлорой с использованием исследований мазков из трахеи и групповых проб помёта.

Практическая значимость. Предложенные методы исследования мазков из трахеи и групповых проб помёта можно рекомендовать как эффективные прижизненные способы контроля птицы на наличие патогенных и опасных для человека микроорганизмов, что позволяет выработать дальнейшую стратегию проведения оптимальных мероприятий при выращивании и убое птицы с целью снижения контаминации тушек на выходе готовой продукции. Разработанные «Методические рекомендации по выделению кампилобактерий и другой кишечной микрофлоры из групповых проб помёта птиц» могут быть использованы в работе врачами-бактериологами лабораторий птицефабрик и бактериологических отделов ветеринарных лабораторий.

Основные положения, выносимые на защиту:

- спектр микрофлоры, выделяемой от птиц разных видов и возрастов в птицеводствах различного технологического направления;
- прижизненный метод контроля инфицированности птиц бактериальной микрофлорой с использованием исследований мазков из трахеи и групповых проб помёта;
- модифицированный метод выделения кампилобактерий и уровень инфицированности ими птиц.

Апробация работы. Основные положения и результаты исследований заслушаны на заседаниях Методических Советов отделов микробиологии и паразитологии ВНИВИП (2000-2004 гг.); Учёных Советов ВНИВИП (2000-2004 гг.); на Городской научно-практической конференции эпидемиологов, микробиологов, педиатров, санитарных и ветеринарных врачей «Проблема диагностики кампилобактериоза, проявления эпидемического и эпизоотического процессов, профилактика» (Санкт-Петербург, 2001 г.); на Международной конференции-выставке «Птицеводство: мировой и отечественный опыт» (Зеленоград, 2002 г.); на Научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ (Санкт-Петербург, 2002 г.); на X и XII Московских Международных ветеринарных конгрессах (Москва, 2002, 2004 гг.); на Всероссийской конференции молодых учёных и аспирантов по птицеводству (Сергиев Посад, 2002 г.); на Конференции национального комитета по сотрудничеству птицеводов России с Всемирной научной ассоциацией по птицеводству (Зеленоград, 2003 г.); на IV Украинской конференции по птицеводству с международным участием «Птицеводство» (Алушта, 2003 г.); на второй международной между-

зовской научно-практической конференции аспирантов и соискателей «Предпосылки и эксперимент в науке» (Санкт-Петербург, 2004 г.); на Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина 2004: современные аспекты разработки, маркетинга и производства ветеринарных препаратов» (Феодосия, 2004 г.); на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей во ВНИВИП (2000-2004 гг.), региональном семинаре (Екатеринбург, 2003 г.), в Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории (Москва-Косино, 2004 г.) и на координационных совещаниях специалистов птицеводства во ВНИВИП (2000-2004 гг.).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, 1 сдана в печать.

Структура и объём работы. Диссертация изложена в одном томе на 168 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 12 таблицами, 5 диаграммами, 4 гистограммами, 4 фотографиями, 5 рисунками и 1 графиком, Список использованной литературы включает 211 источников, в том числе 79 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Исследования проводили с 2000 по 2004 год в отделе микробиологии Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП) в соответствии с программой НИР, в 30-ти птицеводствах различного технологического направления, в том числе птицефабрики по производству яйца - 20, птицефабрики по производству мяса бройлеров - 5, хозяйства по выращиванию гусей - 3, индейководческие птицефабрики - 2.

В лабораторных опытах для определения вирулентных свойств выделенных культур использован 121 цыпленок, в том числе 86 цыплят суточного возраста, 35 цыплят 60-120-дневного возраста.

В работе нами из различных объектов выделено и идентифицировано 1174 культуры 19-ти видов микроорганизмов. Объектами исследований были поражённые органы павших и вынужденно убитых птиц разных видов и возрастов, мазки из трахей клинически здоровых особей, групповые пробы помета, смывы с тушек и пробы воды из ванн охлаждения в убойных цехах птицефабрик

В работе для выделения и идентификации микроорганизмов были использованы общепринятые микробиологические методики с применением простых и дифференциально-диагностических питательных сред, биохимических тестов. Для идентификации энтеробактерий, выделяемых от птиц, нами предложена ускоренная схема. Для выделения кампилобактерий использовали среду, применяющуюся в медицинской практике, в нашей модифика-

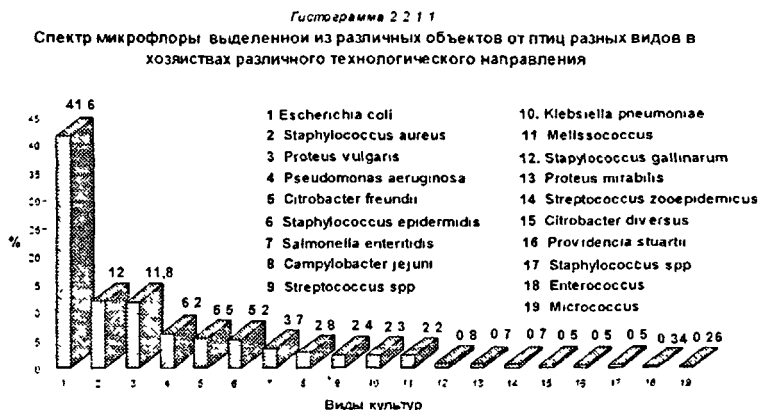
ции. Модификация заключалась в использовании крови новой биологической объекта - птицы (курицы)

Чувствительность выделенных штаммов различных культур к энрофлоксацину определяли двумя методами: методом серийных разведений и методом дисков, основанным на диффузии антибиотика в питательную среду

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Спектр микрофлоры, выделяемой от птиц в хозяйствах различного технологического направления

Спектр микрофлоры, выделяемой от птиц, достаточно широк и представлен 19-ю видами (гистограмма 2.2.1.1) Наибольший удельный вес приходится на кишечную палочку - 41,6% Значительный процент составляет кокковая микрофлора - 24,4%, протей - 12,5% и синегнойная палочка - 6,2% В 3,7-2,8% случаев были выделены культуры эпидемиологически опасных видов микроорганизмов - *Salmonella enteritidis* и *Campylobacter jejuni* соответственно.



Из 20-ти хозяйств по производству яйца выделено 435 культур микроорганизмов 17-ти видов, доминирующими из которых являются *Escherichia coli* (38,2%), *Staphylococcus aureus* (8,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (8%) и *Proteus vulgaris* (7,8%) Из 5-ти хозяйств по производству мяса бройлеров выделено 617 культур 15-ти видов микроорганизмов, из которых наибольший процент выделения приходится на *Escherichia coli* (47%), *Staphylococcus aureus* (14,4%), *Proteus vulgaris* (13,5%) и *Staphylococcus epidermidis* (7%). Из двух хозяйств по производству мяса индеек выделено 74 культуры 6-ти видов микроорганизмов, наибольший процент которых также приходится на *Escherichia coli* (39,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (21,6%), *Staphylococcus aureus* (14,4%) и *Citrobacter freundii* (13,5%) Из трех хозяйств по выращиванию гусей выделено 48 культур 6-ти видов микроорганизмов, ведущими яв-

ляются *Proteus vulgaris* (43,75%), *Pseudomonas aeruginosa* (39,58%) и *Escherichia coli* (6,25%). Из полученных нами результатов исследований видно, что, независимо от специализации хозяйств, доминирующими видами микроорганизмов являются *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Однако процентное соотношение различно и обусловлено различной эпизоотической ситуацией в исследуемых хозяйствах.

2.2.1.1 Микрофлора, выделяемая из трупов птиц

Нами были проведены бактериологические исследования трупов птиц разных видов и возрастов на птицефабриках различного технологического направления и патологического материала, поступившего из птицевладельцев различных областей для проведения бактериологических экспертиз. Всего исследовано 298 трупов павших и вынужденно убитых птиц из 24-х птицефабрик. Высевы делали из крови сердца, лёгких, печени, желчного пузыря, селезёнки, яичников, желтка, перитонеальной жидкости, глаз, синусов, носового экссудата, суставов, подошв лапок. Всего был сделан 651 высев из разных органов и выделено 677 культур 16-ти видов микроорганизмов. Доминирующими видами являются *Escherichia coli*, удельный вес которой составляет 44,3%, *Staphylococcus aureus* - 14,3% и *Proteus vulgaris* - 11,7%. Также из органов были выделены эпидемиологически опасные виды *Salmonella enteritidis* (4,7%) и *Campylobacter jejuni* (1,33%).

Культуры *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* выделяли из многих органов, что свидетельствует о генерализованности инфекционного процесса. Культуры *Klebsiella pneumoniae* были выделены из лёгких и носового экссудата, культуры *Campylobacter jejuni* - из печени, *Streptococcus zooepidemicus* - из суставов и подошв лапок, что указывает на органотропность этих видов микроорганизмов.

2.2.1.2 Микрофлора, выделяемая из мазков с трахеи

В работе впервые использован прижизненный метод контроля бактериальной инфицированности птиц: бактериологическое исследование мазков из трахеи. Мазки брали с верхней части трахеи стерильными ватными палочками. Первоначально этот метод предложен для мониторинга на микоплазмоз, посевы делали на транспортную среду для микоплазм. Далее пробы пересеивали на мясо-пептонный бульон и исследовали по общепринятым микробиологическим методикам. Всего было исследовано 134 мазка из трахеи клинически здоровых взрослых птиц (100-300-дневного возраста) из 5-ти птицефабрик: 4-х по производству яйца и одной по производству мяса бройлеров. Из 134 мазков с трахеи в 36 пробах (26,9%) выделены микроорганизмы 4-х видов. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus*

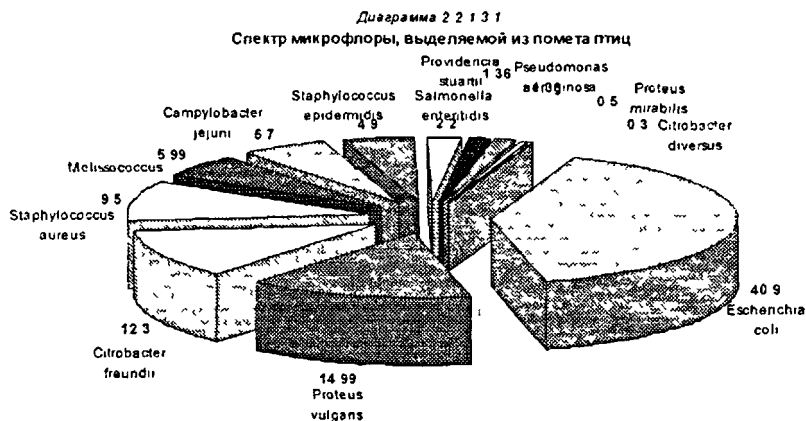
cus spp Доминирующим видом является *Stieptococcus* spp. удельный вес которого составляет 66,1%. что указывает на его органотропность

Из результатов полученных нами в исследованиях видно, что почти 30% птицы являются носителями условно патогенных микроорганизмов селитко-токсического действия. Выделение из трахеи таких видов микроорганизмов как *Pseudomonas aerugmosa* и *Eschericlua coh* указывает на дыхательные пути как одни из возможных ворот инфекции, вызываемой этими возбудителями

2.2.1.3 Микрофлора, выделяемая из помёта птиц

Параллельно с бактериологическими исследованиями трупов в отдельных хозяйствах были проведены бактериологические исследования групповых проб помета. Вся птица была клинически здорова.

Всего была исследована 181 групповая проба помета от двух видов птиц (курица и индейка) разного возраста из 9-ти хозяйств различного технологического направления, в том числе хозяйства по производству} яйца - 4, хозяйства по производству мяса бройлеров - 4 и 1 индейководческая птицефабрика. Всего из помета выделено 367 культур 12-ти видов микроорганизмов (диаграмма 2 2 13 1). Доминирующими являются *Escherichia coli*, удельный вес которой составил 40,9%, *Pioteus vulgaus* - 14,99%. *Citibacteri fieundii* - 12,3% и *Staph)lococcus aureus* - 9.5%



Из 4-х птицефабрик по производству} яйца из 56-ти проб выделено 109 культур 9-ти видов микроорганизмов, из 4-х по производству мяса бройлеров из 115-ти проб - 225 культур 10-ти видов, из индейководческой из 10-ти проб - 33 культуры 4-х видов. Доминирующими видами как в хозяйствах по производству яйца, так и по производству} мяса бройлеров и индеек явились *Eschenchia coli*, кокковая микрофлора, микроорганизмы родов *Pioteus* и *Citrobacteи*

Следует отметить, что из групповых проб помёта были выделены и эпидемиологически опасные виды микроорганизмов *Campylobacter jejuni* (5,7%) и *Salmonella enteritidis* (2,2%), которые выделяются как в хозяйствах по производству яйца (15,6% и 1,8% соответственно), так и мяса бройлеров (1,7% и 2,75%).

Нами установлено, что у цыплят раннего возраста (до 10 суток) видовой состав микрофлоры представлен 1-3-мя видами микроорганизмов. У цыплят более старшего возраста спектр выделяемой с помётом микрофлоры представлен большим количеством видов (4-6), в том числе высоким процентом выделения протей, как и у маленьких цыплят. Выделение большого количества протей указывает на нарушение нормального микробиоценоза кишечника цыплят.

Спектр микрофлоры, выделяемой из помёта, в каждом отдельном хозяйстве, был различен и зависел от эпизоотической ситуации на данной птицефабрике.

Полученные данные позволяют утверждать, что микроорганизмы, выделяемые из групповых проб помёта, в большинстве случаев идентичны выделяемым из трупов: 10 нозологических единиц микроорганизмов в одних и тех же хозяйствах выделяются как из помёта, так и из трупов цыплят и кур. Следовательно, метод исследования групповых проб помёта можно использовать как эффективный прижизненный метод контроля живой птицы на носительство зоопатогенных и эпидемиологически опасных микроорганизмов. Это позволяет выработать дальнейшую стратегию проведения оптимальных мероприятий при выращивании и убойе птицы с целью снижения контаминации тушек на выходе готовой продукции, что особенно актуально для хозяйств по производству мяса бройлеров.

2.2.2 Изучение вирулентных свойств культур микроорганизмов, выделенных из помёта и трупов птиц

Вирулентные свойства были изучены на моделях интраорбитального заражения суточных и внутривенного заражения 60-дневных цыплят у 46 культур 8 видов, в том числе *Escherichia coli* - 17 культур, *Salmonella enteritidis* - 3 культуры, *Citrobacter freundii* - 2 культуры, *Providencia stuartii* - 2 культуры, *Proteus* - 6 культур, *Escherichia coli*+*Proteus* - 5 культур, *Pseudomonas aeruginosa* - 4 культуры, *Staphylococcus aureus* - 3 культуры, *Enterococcus* - 4 культуры. При этом 22 культуры были выделены из внутренних органов трупов птиц (сердце, лёгкие, печень, глаза), 24 культуры - из групповых проб помёта.

Из 24-х культур, выделенных из помёта, 13 (6 *Escherichia coli*, 4 *Proteus vulgaris*, 3 *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris*) при интраорбитальном и 3 (2 *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*) при внутривенном заражении были вирулентны и вызывали гибель цыплят в течение 1-5 суток, на вскрытии отмечали признаки острого сепсиса - серозный перикардит, катаральную пневмонию, геморрагический энтерит; 2 (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* + *Proteus*

vulgaris) при интраорбитальном и 1 (*Escherichia coli*) при внутривенном были слабовирулентны и вызывали заболевание цыплят, при убое их через 10 суток из всех внутренних органов были выделены культуры исходного заражающего штамма; 5 (2 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris*) были авирулентны и не вызывали гибели цыплят или заболевания цыплят.

Из 22-х культур, выделенных из внутренних органов, 7 при интраорбитальном заражении (2 *Escherichia coli*, 3 *Salmonella enteritidis*, 2 *Pseudomonas aeruginosa*) и 7 при внутривенном заражении (3 *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, 2 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) были вирулентны и вызывали гибель цыплят в течение 1-5 суток, на вскрытии отмечали признаки острого сепсиса - серозный перикардит, катаральную пневмонию, геморрагический энтерит; 4 (2 *Proteus vulgaris*, 2 *Staphylococcus aureus*) при интраорбитальном заражении были слабовирулентны и вызывали заболевание цыплят, при убое их через 10 суток из всех внутренних органов были выделены культуры исходного заражающего штамма; 4 (*Enterococcus*) были авирулентны и не вызывали гибели или заболевания цыплят.

Из результатов проведённых исследований видно, что все культуры, причём даже одного и того же вида, имеют различную степень вирулентности: встречаются как вирулентные, так и слабовирулентные и авирулентные штаммы. Вирулентные и слабовирулентные штаммы как патогенных, так и условно патогенных микроорганизмов вызывают или гибель цыплят в первые несколько суток, или заболевание, вследствие которого птица отстаёт в росте и развитии.

2.2.3 Выделение кампилобактерий из различных объектов

2.2.3.1 Освоение и модификация методики выделения кампилобактерий

При отработке методики выделения кампилобактерий применяли методику, используемую в медицине, руководствуясь «Инструкцией по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза» (1989). В качестве транспортной среды использовали физиологический раствор, в качестве питательной среды для выращивания кампилобактерий - плотную среду - кровяно-угольный эритроцит-агар с добавлением антибиотиков и пирувата натрия (смесь Бушера). Для создания микроаэрофильных условий (в атмосфере из 85% N_2 , 10% CO_2 и 5% O_2) использовали эксикатор с плотно притертой крышкой со сжиганием в нём кислорода. Посевы культивировали в термостате при температуре 42°C в течение 48-72 часов. По истечении этого времени проводили визуальную оценку выросших колоний и микроскопию при окрашивании по Граму. Исследуемые микроорганизмы при микроскопии представляли собой грамотрицательные, спиральноизогнутые палочки шириной 0,2-0,5 мкм и длиной 0,5-0,8 мкм, образовывали один или несколько витков, чаще имели вид запятой, буквы S или крыльев летящей чайки, спор и капсул не образовывали. После изучения морфологических свойств для дальнейшей родовой дифференциации проводили тесты на способность к продукции цитохромоксидазы и каталазы, температурный тест, тест на спо-

способность к росту на среде Ресселя. Культуры были каталазо- и оксидазоположительные, не росли на среде Ресселя. Таким образом, выделенные культуры по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам соответствовали признакам рода *Campylobacter*.

Для определения вида кампилобактерий использовали тест на способность быстро гидролизовать гиппурат натрия, который позволяет дифференцировать термофильные кампилобактерий различного происхождения на два вида - *C.jejuni* и *C.coli*. Исследуемые культуры обладали способностью гидролизовать гиппурат натрия, таким образом, выделенные культуры были отнесены к виду *Campylobacter jejuni*.

В методике, применяемой в медицине, в качестве одного из компонентов среды для выделения кампилобактерий используется кровь человека. В связи с тем, что объект наших исследований птица, кровь человека была нами заменена на кровь родственного биологического объекта - курицы в том же объёме (соотношении). Было проведено исследование внутренних органов (печени) трупов кур из птицефабрики по производству яйца. Среда с кровью птицы показала себя эффективной для выделения кампилобактерий. Из всех 9-ти проб печени были выделены культуры *Campylobacter jejuni*.

Также на среде для выделения кампилобактерий при тех же условиях культивирования впервые нами были выделены культуры микроаэрофильного стрептококка, относящегося к роду *Melissococcus*.

2.2.3.2. Выделение кампилобактерий из помёта кур

При использовании вышеизложенной методики с целью выделения кампилобактерий были проведены исследования групповых проб помёта на птицефабриках различного технологического направления. На яичной птицефабрике было исследовано 30 групповых проб помёта от взрослых кур 500-дневного возраста. На бройлерной птицефабрике исследовано 40 групповых проб помёта 5-ти залов одного птичника (по 8 проб из каждого зала) от цыплят 31-дневного возраста.

В результате исследований на яичной птицефабрике от кур 500-дневного возраста из 30 групповых проб помёта было выделено 17 культур кампилобактерий, что составило 57% от общего количества проб. На бройлерной птицефабрике от цыплят 31-дневного возраста из 40 групповых проб помёта кампилобактерий были выделены в 4-х пробах, что составило 10% от общего числа проб.

Также на птицефабрике по производству яйца при исследовании из 30 групповых проб помёта было выделено 22 культуры (73,3%) *Melissococcus*, относящихся к зоопатогенным микроорганизмам, удельный вес которых составил 5,99%.

Для выявления удельного веса кампилобактерий нами проведено изучение спектра патогенной и условно-патогенной микрофлоры, выделяемой из помёта от птиц. Удельный вес кампилобактерий на фоне микрофлоры, выде-

ляемой из групповых проб помета птиц на птицефабрике по производству) яйца составил 24,6% по производству мяса бройлеров - 4 7°

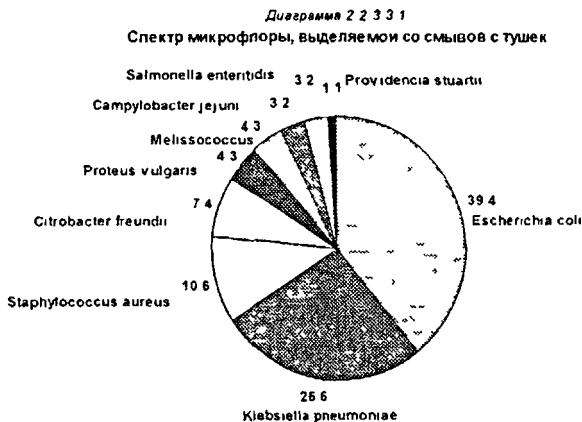
Выделение кампилобактерии из гр>пшпы\ проб помета подтверждает факт носительства кампилобактерий у птиц

2.2.3.3 Выделение кампилобактерии со смывов с тушек и воды из ванн охлаждения в убойных цехах птицефабрик

Учитывая, что из трупов и помета кур выделен достаточно широкий спектр патогенной и условно-патогенной микрофлоры, было целесообразно изучить микрофлору выделяемую из смывов с тушек на разных технологических этапах процесса убоя, в том числе и на выходе готовой продукции, и проб воды из ванн охлаждения, так как инфицированность птицы данными микроорганизмами увеличивает риск обсеменения ими тушек кур при убое

Всего было исследовано 52 смыва с тушек и 28 проб воды из ванн охлаждения на двух птицефабриках очной по производству яйца и одной по производству мяса бройлеров

Из смывов с тушек и воды из ванн охлаждения выделены микроорганизмы 9-ти видов (диаграмма 2 2 3 3 1). наибольший удельный вес из которых у *Eschenchia coli* - 39,4%, *Klebsiella pneumoniae* - 26,6% *Staphylococcus aiuens* - 10,6% Также выделены эпидемиологически опасные виды - *Salmonella eiitentidis* и *Camp>lobacter jejuni* - по 3,2% каждого



Из смывов с тушек в убойном цехе птицефабрике по производству яйца из 20-ти проб выделено 39 микроорганизмов 6-ти видов. Наибольший процент выделения приходится на *Eschenchia coli* удельный вес которой составил 43,6%, и *Klebsiella pneumoniae* - 33,3%. Также были выделены культуры эпидемиологически опасного вида *Campylobacter jejuni* - 7,7%. Из 20-ти проб воды из ванн охлаждения той же птицефабрики было выделено 16 микроорганизмов 3-х видов, наибольший процент из которых приходится на

Klebsiella pneumoniae - 56,25% Также были выделены культуры эпидемиологически опасного вида *Salmonella enteritidis* -18,75%.

На бройлерной птицефабрике из 40 проб, взятых в убойном цехе на различных этапах технологического процесса убоя и воды из ванны охлаждения выделено 39 культур 6-ти видов микроорганизмов. Наибольший процент выделения приходится на *Escherichia coli* - 41% и *Staphylococcus aureus* - 25,6%

Наибольший процент - 35,9% - и количество видов (6) микроорганизмов выделено на втором этапе наших исследований - после потрошения. Это, вероятно, связано с тем, что при потрошении микроорганизмы из кишечника птицы (через клоаку или разрывы кишечника при ручном потрошении) попадают на поверхность тушки. После выхода из ванны охлаждения обсемененность тушки несколько снижается (17,9%), и наименьшая обсемененность на последнем этапе - выходе готовой продукции (10,3%).

Выделение кампилобактерий из смывов с тушек отмечено нами только на одной птицефабрике - по производству яйца. В ваннах охлаждения кампилобактерии выделены не были, так как пробы были взяты в начале технологического процесса при охлаждении не более 5% убойных кур.

На второй птицефабрике (по производству мяса бройлеров) кампилобактерии были выделены только из групповых проб помёта. Ни из смывов с тушек, ни из ванн охлаждения кампилобактерии выделены не были. Вероятно, это связано, с одной стороны, с уровнем ветеринарно-санитарных условий в убойном цехе, с другой стороны, возможно, это обусловлено меньшим наличием кампилобактерий в кишечнике птицы. Об этом свидетельствует количественная разница в выделении кампилобактерий из групповых проб помёта. Если на одной птицефабрике - 57%, то другой - 10%, т.е. в 5,7 раза меньше. На птицефабрике, где кампилобактерии в групповых пробах помета выделены в 57% случаев, возбудитель был выделен и из смывов с тушек.

Выделение условно-патогенной, а также эпидемиологически опасной микрофлоры (сальмонелл и кампилобактерий) при наших исследованиях в ваннах охлаждения и на выходе готовой продукции доказывают существование перекрёстной контаминации доброкачественной продукции в ваннах охлаждения, куда данные микроорганизмы попадают из помёта птиц. Полученные данные указывают на то, что присутствие зоопатогенных микроорганизмов в кишечнике птиц, выделяемых из помёта, увеличивает риск обсеменения ими тушек при убое.

2.2.4 Испытание препаратов неспецифической защиты для снижения инфицированности птицы кишечной микрофлорой

2.2.4.1 Определение чувствительности выделенных культур к энрофлоксацину отечественного производства

С целью поиска препаратов неспецифической защиты, эффективных при бактериальных болезнях птиц, нами была испытана эффективность препарата из группы фторхинолонов - энрофлоксацина отечественного произ-

водства (группа компаний ВПК) в отношении микроорганизмов, выделяемых от птиц.

В работе было использовано 60 культур 9-ти видов микроорганизмов, в том числе *Escherichia coli* - 22 культуры, *Salmonella enteritidis* - 6 культур, *Citrobacter freundii* - 7 культур, *Klebsiella pneumoniae* - 7 культур, *Providencia stuartii* - 1 культура, *Pseudomonas aeruginosa* - 1 культура, *Proteus vulgaris* - 9 культур, *Staphylococcus aureus* - 5 культур, *Streptococcus zooepidemicus* - 2 культуры, выделенных из поражённых органов трупов павших и вынужденно вынужденно убитых птиц, из групповых проб помёта от живых кур, от здоровых кур (смывы с тушек в убойном цехе), а также музейные культуры, хранящиеся в отделе института.

При определении чувствительности к энрофлоксацину методом дисков 13 культур микроорганизмов (25,49%) имели зону задержки от 25 до 35 мм, 19 культур (37,25%) имели зону задержки 18-24 мм. Наибольшая зона задержки выявлена у *Klebsiella pneumoniae* - 35 мм, 24-26 мм у *Streptococcus zooepidemicus* и музейных штаммов *Escherichia coli* и *Salmonella enteritidis*.

13 культур (25,49%) имели зону задержки 14-16 мм. Это культуры энтеропатогенной микрофлоры, выделенной в основном из групповых проб помёта цыплят и кур. 6 культур (11,77%) имели зону задержки 11-13 мм. При вычислении % результатов чувствительности протей были исключены.

Средние статистические данные по видам микроорганизмов получены путём математической обработки данных. С этой целью была использована компьютерная программа расчета средних значений - М, среднеквадратичных отклонений ошибок оценки среднего значения - а, доверительного интервала для среднего значения - m и проверки достоверности различия средних значений по критерию Стьюдента (Лакин Г.Ф., 1990).

Методом серийных разведений была определена минимальная подавляющая концентрация антибиотика (МПК) культур *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* и *Staphylococcus aureus* (музейные штаммы, давшие зоны задержки 26-28 мм при оценке методом дисков) и одна культура *Escherichia coli*, выделенная из помёта, давшая зону задержки 15 мм.

В работе использовали 10% раствор Энрофлona, было сделано 21 разведение от 5% (10000 у активного вещества) до 0,0000 (0,0025 γ и в н о - го вещества).

У трёх культур (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*), давших зону задержки 26-28 мм, МПК была в два раза выше и составила 0,00025% (25 гамм).

Следует отметить, что в пробирках, следующих за теми, разведение препарата в которых соответствовало МПК, отмечали рост культуры менее интенсивный, чем в контрольных без добавления энрофлona. При подсчёте колоний из этих пробирок было установлено, что в 1 мл *Escherichia coli* содержится $17,3 \times 10^5$ микробных клеток, *Salmonella enteritidis* - 24×10^5 , *Staphylococcus aureus* - 48×10^4 микробных клеток против $8 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$ микробных клеток в контроле. Очевидно, что при уменьшении дозы энрофлona ещё имеет место бактериостатический эффект.

Из представленных данных видно, что использование препарата энрофлоксацина в птицеводстве перспективно, так как 88,23% штаммов были чувствительны и высокочувствительны и только 11,77% культур - малочувствительны. Исключение представляют только культуры протей. Однако, при применении в птицеводстве препарата в каждом отдельном случае необходимо проверять его чувствительность к исследуемым культурам.

4. ВЫВОДЫ

1. Спектр микрофлоры, выделяемой от разных видов птиц на птицефабриках различного технологического направления достаточно широк, включает в себя 19 видов микроорганизмов. Доминирующими являются *Escherichia coli*, удельный вес которой составляет 41,6%, *Staphylococcus aureus* - 12%, *Proteus vulgaris* - 11,8%. Также от птиц выделяются и эпидемиологически опасные виды *Salmonella enteritidis* - 3,7% и *Campylobacter jejuni* - 2,8%. Видовой состав выделяемой микрофлоры обусловлен эпизоотической ситуацией в каждом отдельном хозяйстве, следствием чего является различное процентное соотношение доминирующих видов.

2. Из 134 мазков из трахеи от клинически здоровых кур в 26,9% случаев выделены микроорганизмы 4-х видов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* Доминирующим видом является *Streptococcus spp.*, удельный вес которого составляет 66,1%.

- 3. Из помёта клинически здоровых птиц выделено 12 видов микроорганизмов, наибольший удельный вес из которых у *Escherichia coli* - 40,9%, *Proteus vulgaris* - 14,99%, *Citrobacter freundii* - 12,3%. Культуры, выделяемые из помёта в большинстве случаев идентичны культурам, выделяемым из трупов.

4. Культуры, выделяемые от птиц, даже одного и того же вида, имеют различную степень вирулентности: встречаются как вирулентные, так и слабовирулентные и авирулентные штаммы. Вирулентные и слабовирулентные штаммы как патогенных, так и условно-патогенных микроорганизмов вызывают или гибель цыплят в первые несколько суток, или заболевание, вследствие которого цыплята отстают в росте и развитии.

5. Модифицированная нами методика выделения кампилобактерий с использованием в качестве одного из компонентов крови птицы показала себя эффективной для выделения кампилобактерий из различных объектов: трупов, групповых проб помёта, смывов с тушек, воды из ванн охлаждения.

6. Кампилобактерии вида *jejuni* циркулируют в птицеводческих хозяйствах как по производству яиц, так и мяса бройлеров. Удельный вес *Campylobacter jejuni*, выделенных из групповых проб помёта птиц в хозяйстве по производству яйца составил 24,6%, в птицеводстве по производству мяса бройлеров - 4,7%. Удельный вес *Campylobacter jejuni*, выделенных из смывов с тушек составил 3,2%. Выделение кампилобактерий из групповых проб помёта подтверждает факт носительства кампилобактерий у птиц. Из внутренних органов (печень) было выделено 9 культур *Campylobacter jejuni* (100%).

7. Впервые от птиц выделены культуры микроаэрофильного стрептококка, относящегося к роду *Melissococcus*. Удельный вес *Melissococcus*, выделенного из групповых проб помета на птицефабрике по производству яйца составил 5,99%, из смывов с тушек в убойном цехе - 7,3%.

8. Со смывов с тушек и воды из ванн охлаждения выделены микроорганизмы 9-ти видов, наибольший удельный вес из которых у *Escherichia coli* - 39,4%, *Klebsiella pneumoniae* - 26,6%, *Staphylococcus aureus* - 10,6%. Также выделены эпидемиологически опасные виды - *Salmonella enteritidis* и *Campylobacter jejuni* - по 3,2% каждого. Выделение условно-патогенной, а также эпидемиологически опасной микрофлоры (сальмонелл и кампилобактерий) в ваннах охлаждения и смывах с тушек доказывают существование перекрёстной контаминации доброкачественной продукции в ваннах охлаждения, куда данные микроорганизмы попадают из помета птиц.

9. Доминирующая в хозяйстве микрофлора (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и др) выделяется из всех исследованных нами объектов (трупы, помёт, смывы с тушек).

10. Перспективно использование в птицеводстве при бактериальных болезнях птиц препарата энрофлоксацина отечественного производства. При исследовании чувствительности микроорганизмов, выделенных от птиц, к энрофлоксацину 88,23% штаммов были чувствительны и высокочувствительны, и лишь 11,77% культур - малочувствительны.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.

1. Для оценки эпизоотической ситуации в отношении бактериальных болезней птиц можно рекомендовать исследования мазков из трахеи и групповых проб свежего как эффективные и безопасные прижизненные методы контроля эпидемиологически опасных и условно-патогенных микроорганизмов, выделяемых от птиц, что дает возможность выбора средств для нормализации микробиологического статуса кишечника и профилактики заболеваний бактериальной этиологии.

2. Для контроля бактериальных болезней птиц проводить исследования не только на факультативные анаэробы, но и на микроаэрофилы. При выделении микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* проводить идентификацию не только до рода, но и до вида.

3. Для контроля за кампилобактериозом проводить исследование не только групповых проб помета, но и смывов с тушек и воды из ванн охлаждения.

4. Для снижения бактериальной инфицированности птицы эффективно использовать препарат отечественного производства энрофлоксацин.

5. Разработанные «Методические рекомендации по выделению кампилобактерий и другой кишечной микрофлоры из помета птиц» могут быть использованы в работе врачами-бактериологами лабораторий птицефабрик и бактериологических отделов ветеринарных лабораторий

6 Материалы, изложенные в диссертации могут быть использованы в учебном процессе на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б. О выделении кампилобактерий от кур // Международная конференция-выставка «Птицеводство: мировой и отечественный опыт». - Москва, Россия, 28-31 января 2002.-С. 19.
2. Новикова О.Б. Методика выделения кампилобактерий из помёта кур // Материалы 54-й научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ. - Санкт-Петербург, 2002. - С. 66-68.
3. Новикова О.Б., Хорева Е.В., Головешенко Л.В. Изучение микрофлоры цыплят раннего возраста // Тезисы докладов Всероссийской конференции молодых учёных и аспирантов по птицеводству. - Сергиев Посад, 2002. - С. 32-33.
4. Новикова О.Б. Выделение микроаэрофильной микрофлоры из кишечника кур // Тезисы докладов Всероссийской конференции молодых учёных и аспирантов по птицеводству. - Сергиев Посад, 2002. - С. 33-35/
5. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б., Елисеева Е.Н. Определение активности энтерофлоры при бактериальных болезнях птиц // Журнал «Ветеринария». - 2002. -№ 6. - С. 15-17.
6. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б. О кампилобактериозе кур // Конференция по птицеводству, Материалы национального комитета по сотрудничеству птицеводов России с Всемирной научной ассоциацией по птицеводству. - Зеленоград, 2003. - С 202-203.
7. Борисенкова А.Н., Коровин Р.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б., Чавгун В.А., Головешенко К.А. Спектр микрофлоры, выделяемой от птиц, в хозяйствах различного технологического направления // Журнал «Рациональное животноводство». - 2003. - № 9. - С. 3-6
8. Новикова О.Б. Сравнительная характеристика микрофлоры, выделяемой из помёта кур, ванн охлаждения и смывов с тушек // Тезисы докладов второй международной межвузовской научно-практической конференции аспирантов и соискателей «Предпосылки и эксперимент в науке». - Санкт-Петербург. - 2004.- С. 90-91.
9. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б. Бактериальные болезни птиц, вызываемые зоопатогенными и эпидемиологически опасными микроорганизмами // Материалы Всероссийского ветеринарного конгресса. - Москва, 2004. - С. 34-37.

Отпечатано в ООО «АкадемПринт».
С-Пб. ул. Миллионная, 19 Тел.: 315-11-41.
Подписано в печать 26.05.04.
Тираж 100 экз.

№ 1 2 4 5 4