

АРТЕМЬЕВА

Татьяна Николаевна

**ПАТОГЕННАЯ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННАЯ МИКРОФЛОРА
КИШЕЧНИКА КУР И ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕТРАДИЦИОННЫХ
СРЕДСТВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ.**

16.00.03. - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург

2004

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

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

Официальные оппоненты:

Доктор ветеринарных наук, профессор Данко Юрий Юрьевич

Кандидат ветеринарных наук Фогель Леонид Сергеевич

Ведущая организация -

ФГУ ВПО Костромская государственная сельскохозяйственная академия

Защита состоится 02 июля 2004 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГУ ВПО Санкт-Петербургская государственная академии ветеринарной медицины по адресу: 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ВПО Санкт-Петербургская государственная академии ветеринарной медицины.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2004 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета доцент

Узюмова О.В.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

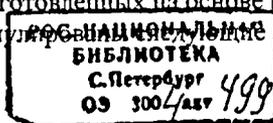
Актуальность темы. Сосредоточение на ограниченных площадях большого поголовья кур и цыплят-бройлеров, применение многоярусных клеточных батарей, создание искусственного микроклимата в помещениях с птицей, использование в рационах нетрадиционных кормов - все это ведет к изменению микробиоценоза кишечника птиц. В связи с этим создается благоприятный фон для развития гастроэнтеритов алиментарного происхождения, длительных кишечных расстройств на фоне снижения естественной резистентности и иммунной реактивности организма больной птицы (Н.Ш.Сингариева, 1999; Р.Н.Коровин, 1995; А.Н.Борисенкова, 1999; М.А.Трунов, 2000; И.П.Степаненко, 2001).

При выборе способа борьбы с какой-либо инфекционной болезнью бактериальной этиологии, прежде всего обращают внимание на патогенные микроорганизмы (возбудители этих болезней), забывая о постоянном спутнике любого живого организма - условно-патогенной микрофлоре, которая представляет серьезную опасность для здоровья птицы и имеет огромное значение в возникновении и развитии болезни, оказывает влияние на экономические показатели птицеводств, обусловленные прямыми и косвенными потерями (М.А.Сидоров, В.В.Суботин, 2000; Э.Д.Джавадов, 2001, А.Н.Борисенкова, Т.Н.Рождественская, В.А.Чавгун, 2003).

С учетом этого весьма актуальным следует считать поиск эффективных и безопасных средств, усиливающих иммунную защиту, устойчивость к стрессам, стимулирующих обменные процессы в организме птиц, позитивно влияющих на кишечный биоценоз (Ю.В.Конопатов, 1992; В.И.Сапего, М.А.Ровин, 1999; И.П.Степаненко, 2001). В связи с этим остро встает проблема иеспецифической профилактики кишечных инфекций у птиц, направленной на поддержание и сохранение, формирование и коррекцию видового и численного состава резидентной микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Такими свойствами обладают иммунотропные препараты, изготовленные из специальных сортов меда, содержащие в высокой концентрации ферменты, флавоноиды, витамины, минеральные соли, органические кислоты и другие вещества, повышающие жизнедеятельность организма (Ю.В.Тулев, 1998,2001). Аспекты использования медовых иммунотропных препаратов в птицеводстве требуют предварительного изучения свойств данных препаратов. Необходимость обратить внимание на эти вопросы является очевидной, так как не только дополнит уже имеющиеся сведения о действии иммунотропных препаратов, но и будет способствовать их применению в промышленном птицеводстве. Таким образом, проблема изучения микробиологического статуса кишечника птиц и изучения различных свойств препаратов, приготовленных на основе меда, является актуальной и представляет научный и практический интерес.

Цель и задачи исследований. Цель работы - изучить патогенную и условно-патогенную микрофлору кишечника птиц, выявить доминирующие виды микроорганизмов, изучить их биохимические и вирулентные свойства, исследовать антибактериальные свойства препаратов, изготовленных на основе меда.

Для реализации данной цели были сформулированы следующие задачи:



- изучить микрофлору кишечника птиц с использованием групповых проб помета в производственных условиях;
- провести исследование кишечника цыплят и кур при энтеритах с целью обнаружения возможного источника загрязнения мяса птицы и продуктов его переработки;
- определить наличие сульфитредуцирующих кластридий в мясе птицы механической обвалки и готовой продукции с учетом сортности;
- изучить антибактериальную активность препаратов, изготовленных на основе меда (апитулима и тулима) в отношении микрофлоры, выделенной из кишечника птиц и в отношении эталонных штаммов ряда патогенных микроорганизмов;
- для определения достоверных результатов и избежания однозначной их трактовки при изучении антибактериальных свойств препаратов, изготовленных на основе меда, рассчитать доверительные интервалы подавления роста микроорганизмов и изучить фармакологические свойства препаратов на лабораторных животных.

Научная новизна. Получены новые данные по микробиологическому статусу кишечника бройлеров, цыплят и кур яичных пород. Выявлен широкий набор энтеробактерий и другой микрофлоры.

Впервые выделена *Salmonellabovis morbificans*, нехарактерная для содержимого кишечника птиц. Впервые из помета птиц выделена микрофлора рода *Xenorhabdus* (сем. Enterobacteriaceae). При массовых геморрагических энтеритах цыплят и кур из содержимого кишечника, слизистых оболочек и печени выделена *Cl.perfringens*. Установлена зависимость санитарно-микробиологических показателей колбасных изделий от наличия сульфитредуцирующих кластридий в сырье. Впервые изучены антимикробные свойства препаратов, изготовленных на основе меда - апитулима и тулима, в отношении микроорганизмов, выделенных из помета кур и референс-штаммов. Впервые при изучении антимикробных свойств применен математический метод расчета доверительного интервала на модели иммунотропных препаратов апитулима и тулима. Впервые изучены токсичность, пирогенность и безвредность вышеуказанных препаратов.

Практическая ценность работы. Выявлена доминирующая микрофлора кишечника кур. Установлена роль *Cl.perfringens* в развитии геморрагических энтеритов кур. Выявлена взаимосвязь наличия сульфитредуцирующих кластридий в сырье и готовых колбасных изделиях. Установлены антимикробные свойства препаратов, изготовленных на основе меда в отношении кишечной микрофлоры цыплят и кур. Апробирована и предложена методика математического метода расчета доверительного интервала для определения антимикробных свойств препаратов. Учитывая антимикробные свойства препаратов, изготовленных на основе меда, нами проведены испытания апитулима и тулима на бройлерах в производственных условиях и получены положительные результаты.

Основные положения выносимые на защиту.

- микробиологический статус кишечника цыплят и кур;

- зависимость санитарно-микробиологических показателей колбасных изделий от наличия сульфитредуцирующих клостридий в сырье;
- антимикробные свойства препаратов, изготовленных на основе меда - апиулима и тулима, в отношении кишечной микрофлоры птиц;
- применение математического метода расчета доверительного интервала для определения антимикробных свойств препаратов.

Апробация работы. Основные положения и результаты заслушаны на заседаниях Методического Совета отделов микробиологии и паразитологии ВНИВИП (1998-2001), Ученого Совета ВНИВИП (1998-2001), на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей и на Межрегиональных Координационных совещаниях специалистов птицеводства по ВНИВИП (1998-2001), на юбилейной конференции, посвященной 190-летию высшего ветеринарного образования в России и 100-летию ветеринарной науки в России (Санкт-Петербург, 1998), на конференции по птицеводству Национального комитета по сотрудничеству птицеводов России с Всемирной научной ассоциацией по птицеводству (Зеленоград, 1999), на семинарах «Современное производство конкурентоспособной мясной продукции» (Санкт-Петербургская Академия методов техники управления, ЛИТМУ, 2002-2003).

Публикации научных исследований. По теме диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, библиографического указателя литературы, приложения. Диссертация изложена в одном томе на 189 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 32 таблицами, 9 гистограммами, 6 рисунками, 5 диаграммами, 2 графиками. Список использованной литературы включает 317 источников, в том числе 72 иностранных авторов.

2. Собственные исследования

2.1. Материалы и методы

Работу проводили с 1997 по 2002 год в отделе микробиологии Всероссийского научно-исследовательского института птицеводства (ВНИВИП), в бактериологическом отделе Государственного Учреждения Санкт-Петербургская городская ветеринарная лаборатория (ГУ ГВЛ), на двух птицефабриках. Часть работы выполнена на базе Российского Ордена Трудового Красного знамени научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена.

В работе использовало 283 культуры эптеробактерий, 17-стафилококка, 8 - стрептококка, 4-псевдоманады, 426-клостридий, выделенных из помёта цыплят и кур разного возраста, из содержимого кишечника и из трупов птицы, а также из мяса птицы и продуктов его переработки.

10 эталонных штаммов (референс-штаммов) нами получено из Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля ме-

дицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича (в том числе культуры сальмонелл 3-х видов: *Sal.gallinarum*, *Sal.typhimurium*, *Sal.paratyphy A*).

Изучение вирулентных свойств культур, выделенных из помета клинически здоровых кур и цыплят, а также из трупов птиц, проводили на белых мышах, куриных эмбрионах. Белым мышам массой 14,0-16,0 г вводили внутривентриально суспензию суточной агаровой культуры в дозе 500 млн. микробных клеток (0,5 мл), приготовленной на изотоническом растворе хлорида натрия по отечественному стандарту мутности 10^6 КОЕ/мл. Куриные эмбрионы заражали в хориоаллантоисную область (ХАО), путем введения суточной бульонной культуры сальмонелл в дозе 100 млн. микробных клеток.

Для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из помета птиц использованы общепринятые методики.

Для идентификации микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, наряду с общепринятыми методами, широко использовали пластины биохимические, дифференцирующие энтеробактерии - ПБДЭ (*Biochemical differentiation plate of enterobacteria*). Были применены отечественные тест-системы одноразового использования, содержащие 20 тестов.

Серологическую идентификацию эшерихий проводили путем обнаружения адгезивных антигенов согласно наставлению по применению агглютинирующих сывороток к адгезивным антигенам эшерихий K_{88} , K_{99} , 987P, F_{41} и A_{20} .

Выделение сальмонелл и определение их биохимических свойств осуществляли по стандартной методике. Серологическую идентификацию культур проводили согласно «Методическим указаниям по бактериологической диагностике сальмонеллеза животных» (1990) с использованием диагностических агглютинирующих адсорбированных сальмонеллезных сывороток Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток.

Для выделения стафилококков нами использованы общепринятые методики. Для идентификации микроорганизмов рода *Staphylococcus* до вида, использовали пластины биохимические дифференцирующие стафилококки - ПБДС (*Biochemical differentiation plate of staphylococci*). Были применены отечественные одноразовые тест-системы, содержащие 17 тестов. Дополнительно в работе был использован набор агглютинационный для экспресс-диагностики стафилококка золотистого (*Staphylococcus aureus*), разработанный НИИ экспериментальной медицины РАМН, НПП «Аквапаст», Санкт-Петербург.

Для выделения стрептококков использованы общепринятые методики. Определение серологической группы стрептококков мы проводили с использованием набора антистрептококковых группоспецифических сывороток (A, B, C, G, D) и стандартных групповых антигенов.

Для выделения клостридий из трупов кур и цыплят, а также сульфитредуцирующих клостридий из мяса птицы и продуктов его переработки использованы общепринятые методики и ГОСТы.

Для изучения антимикробных свойств апитулима и тулима был применен метод серийных разведений.

Обработку результатов проводили в соответствии с Государственным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) «Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

Биометрическую и статистическую обработку данных, полученных в ходе работы, проводили в соответствии с современной методической литературой с использованием вычислительной техники. Графическое оформление полученных результатов осуществляли при помощи ЭВМ (Intel Pentium), с применением программ «Statgraf», Microsoft office.

2.2. Результаты исследований

2.2.1 Изучение микроэкологического статуса кишечника цыплят и кур

2.2.1.1. Исследование помета птиц разного возраста в производственных условиях

В первой серии исследований микрофлору кишечника птиц изучали используя прижизненный метод диагностики, а именно, путем бактериологического исследования групповых проб помета.

Исследования проводили на двух птицефабриках по производству яйца.

Бактериологическому исследованию было подвергнуто 90 проб помета от цыплят и кур-несушек промышленного стада, соответственно 71 и 19 проб.

Из групповых проб помета птиц были выделены культуры, являющиеся представителями 11-ти родов семейства энтеробактерий.

Из проб помета от 4-5-дневных цыплят выделены 9 культур *E.coli*, из которых у 4-х был обнаружен адгезивный антиген $F_{41.5}$ культур, не имеющих адгезивных антигенов, не вызывали гибель белых мышей при внутрибрюшинном заражении. Одновременно с кишечной палочкой были выделены культуры *Proteus vulgaris*.

Из помета цыплят в возрасте 9-11 дней, а также из помета взрослой птиц выделены 17 культур *E.coli* (27,4%), с выявленным адгезивным антигеном F_{4i} , и одна культура *Proteus mirabilis*. Кроме протей и кишечной палочкой выявлена другая микрофлора из семейства *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter agglomerans*, *Serratia rubideae*, *Enterobacter intermedius*, в единичных случаях — *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *Shigella boydii*. В 13 пробах выделены культуры *Staphylococcus lentus*. Все выделенные культуры были не патогенны для белых мышей.

На другой птицефабрике по производству яиц, где не применяли лекарственные препараты, из 13 проб помета от птицы 113-ти, 211-ти и 270-дневного возраста были выделены сальмонеллы группы C_2 : *Salm.bovis morbificans* (68,42%).

Из всех 19 проб помета от взрослой птицы на данной птицефабрике выделены непатогенная кишечная палочка и *Xenorhabdus nematophilus*, в одной - *Proteus vulgaris*. Представители рода *Xenorhabdus* относятся к малоизученным, недавно описанным энтеробактериям.

Выделенные из помета культуры *Serratia rubideae*, *Kluuvera cryocrescens*, *Shigella boydii*, *Xenorhabdus nematophilus*, *Enterobacter intermedius* не являются

типичными представителями микрофлоры желудочно-кишечного тракта птиц. Полученные данные требуют продолжения исследований для определения роли вышеперечисленных микроорганизмов и установления их этиологического значения в инфекционной патологии птиц.

В 13-ти пробах помета от цыплят и кур-несушек промышленного стада были выделены культуры стафилококка, которые были отнесены к виду *Staphylococcus lentus*, не патогенному для белых мышей.

У кур-несушек промышленного стада выделяемая из помета микрофлора стабилизируется. Обнаружение культур *E.coli* составляет 100%, *Proteus vulgaris* 42,86%, *Enterobacter agglomerans* 18,37%. В единичных случаях обнаруживаются культуры *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii*, а также *Staph.lentus*.

Анализируя представленные данные можно сделать вывод, что во всех возрастных группах не зависимо от типа хозяйства преобладающей является микрофлора рода *Escherichia* (42%). Появление в помете цыплят раннего возраста условно-патогенных микроорганизмов, таких как бактерии рода *Proteus*, *Staphylococcus* свидетельствуют о нарушении микробиоценоза кишечника птицы.

2.2.1.2. Исследование микрофлоры тонкого отдела кишечника птицы

Следующим этапом исследований микроэкологического статуса кишечника птиц было изучение микрофлоры в содержимом тонкого отдела кишечника при убое птицы. Работу проводили на двух птицефабриках

Проведено две серии исследований. В первой серии исследовано 14 проб содержимого тонкого отдела кишечника цыплят 115 - дневного возраста.

Результаты исследований показали, что среди выделенных культур преобладает *E.coli*- 42,2%. Выделение патогенных микроорганизмов рода *Salmonella* составило 27%, а условно-патогенных (*p.Enterobacter* и *p.Citrobacter*)- 30,8%.

У 50% цыплят в содержимом тонкого отдела кишечника обнаружена *Salmonella enteritidis*. У 78,57% исследованных проб была выделена кишечная палочка, у 14,29% выявлен адгезивный антиген A_{20} . У 50% исследованных проб, одновременно с кишечной палочкой были выделены культуры *S.enteritidis*, *Ent.agglomerans*, в одном случае - *Citr.freundii*.

Микрофлора, выделенная из тонкого отдела кишечника птиц аналогична микрофлоре, выделенной из помета, однако следует отметить, что ни в одной пробе из тонкого отдела кишечника культур протей и стафилококка выделено не было.

Во второй серии исследований изучение микрофлоры тонкого отдела кишечника птиц было проведено на птицефабрике мясного направления при масовых геморрагических энтеритах.

Было проведено микробиологическое исследование 24-х проб патологического материала от 3-х, 9-ти, 30-ти, 35-ти и 142-дневных цыплят. От каждого трупa исследовано по три пробы: содержимое кишечника, слизистые оболочки тонкого отдела кишечника, печень.

Из 7 проб (29,2%) были выделены культуры *Cl.perfringens* тип А, являющиеся возбудителем инфекционной энтеротоксемии (кlostридиоза) животных и птиц. Тип токсина был установлен в реакции нейтрализации с использованием стандартных антитоксических сывороток.

Из 6 проб (25%) были выделены культуры гемолитического стрептококка (а-гемолиз). При серологической типизации с использованием антистрептококковых группоспецифических сывороток и стандартных групповых антигенов в реакции кольцепреципитации выделенные культуры отнесены к серогруппе Д, а с учетом культурально-биохимических свойств идентифицированы как *Streptococcus faecalis*, являющийся возбудителем энтерококкоза птиц.

Из одной пробы (содержимое кишечника) были выделены оба возбудителя.

Таким образом, в 58,4% проб патологического материала при массовых геморагических энтеритах цыплят были выделены возбудители кlostридиоза и энтерококкоза птиц.

2.2.2. Изучение условно-патогенной и патогенной микрофлоры в мясе птицы механической обработки и в готовой продукции

Зависимость наличия сульфитредуцирующих кlostридий в готовой продукции (варенных колбасных изделиях) от наличия их в мясе птицы механической обвалки (сырье) изучена на одном из мясоперерабатывающих предприятий.

Согласно нормативной документации масса продукта, в которой не допускается наличие сульфитредуцирующих кlostридий для вареных колбас, составляет 0,1г. Мясо птицы механической обвалки (кур, индеек) широко используется в рецептуре вареных колбасных изделий.

Согласно техническим условиям, в колбасах высшего сорта мясо птицы мехобвалки составляло 20-25%, первого и второго сортов 28-38% и 40-50% соответственно.

Количество сульфитредуцирующих кlostридий определяли в ОД и в 0,01 г мяса птицы мехобвалки, поступающего на предприятие и в 0,1 г вареных колбасных изделий, в производстве которых было использовано это мясо.

Было исследовано 34 партии мяса птицы механической обвалки. В 28-и из них обнаружены сульфитредуцирующие кlostридии.

В ходе исследования было выделено 313 культур микроорганизмов. Все они были отнесены к виду *Clostridium perfringens*. Результаты, полученные при исследовании мяса птицы механической обвалки, показали, что в 91,3% исследованных партий мяса птицы механической обвалки (93,4% проб) были обнаружены сульфитредуцирующие кlostридии и только в 9,7% партий (6,6% проб) данная микрофлора отсутствовала.

Учитывая, что птица может быть носителем патогенных для людей серовариантов сальмонелл, что показано и нашими исследованиями, и в соответствии с требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01, мы проводили исследования мяса птицы механической обвалки на наличие сальмонелл.

Результаты исследований показали, что в трех партиях (45 пробах) были обнаружены сальмонеллы. При серологической типизации одна из культур саль-

монелл была отнесена к группе В: S.chestcr; вторая - к группе С1: S.braenderup; третья была отнесена к сальмонеллам редких групп.

Результаты бактериологического исследования птичьего мяса и изготовленных из него изделий показали, что колбасные изделия первого и второго сортов, приготовленные с добавлением мяса птицы механической обвалки в 0,1 г которого обнаружены сульфитредуцирующие клостридии, имеют значительную бактериальную обсемененность этими микроорганизмами: 80% и 96,6% соответственно.

Наличие клостридии в 0,01 г птичьего мяса является причиной микробного обсеменения всех изготовленных из него колбасных изделий независимо от сорта: 76,9%, 100% и 100% соответственно.

В результате проведенных исследований установлена прямая зависимость между обсемененностью клостридиями продовольственного сырья и готовой продукции.

2.2.3 Изучение свойств препаратов, изготовленных на основе меда - апиулима и тулима

2.2.3.1. Изучение антимикробных свойств апиулима и тулима

Антимикробные свойства апиулима и тулима изучали на 30-ти штаммах различных микроорганизмов: 20 штаммов были выделены от птиц с различных птицефабрик Северо-Запада, 10 - получены из ВГНКИ им. Л.А. Тарасевича. В опыт были включены представители следующих семейств: Enterobacteriaceae - 19 штаммов, в т.ч. сальмонелл - 7, кишечных палочек - 5, протей - 4, клебсиелл - 2, цитробактер - 1; семейство Micrococaceae - 6, в т.ч. стафилококков - 5, стрептококков - 1; семейство Pseudomonadaceae - 5.

На первом этапе исследования определяли максимальное разведение препаратов, обеспечивающее подавление роста микроорганизмов по наличию или отсутствию роста культур в МПБ при добавлении апиулима и тулима в разведениях от 1/2 до 1/128. По результатам исследований минимальной подавляющей концентрацией для кишечных палочек, сальмонелл, кокковой микрофлоры, псевдомонад, клебсиелл является применение апиулима и тулима в разведении 1/16, а для протеев и цитробактеров - в разведении 1/8.

Дальнейшую работу вели для получения более точных результатов исследования, увеличения предела обнаружения определяемого компонента, т.е. изменяя совокупность операций и правил исследования, старались обеспечить получение необходимых результатов исследования с гарантированной точностью. Количество микроорганизмов N в 1 см^3 инокулюма вычисляли как средневзвешенное значение из подсчетов на двух последовательных разведениях.

Для удобства расчетов среднего результата мы объединили все исследуемые культуры в 7 групп: эшерихии, сальмонеллы, кокковая микрофлора, псевдомонады, протей, клебсиеллы, цитробактеры. Для того чтобы определить достоверность результатов и избежать однозначной их трактовки, мы рассчитывали доверительные интервалы, которые характеризуют статистическое распределение микроорганизмов в образце.

Цельный апитулим, а так же цельный тулим обладают бактериостатическим действием, поэтому не участвовали в расчетах доверительного интервала. Доверительный интервал представляет собой сумму и разность среднего арифметического M и среднеквадратического отклонения t . При подсчете колоний, выросших на чашках, велика вероятность случайных погрешностей, т.е. погрешностей, в проявлении которых не наблюдается какой-либо закономерности. Такие погрешности, как правило, неустранимы. Они вызывают рассеяние результатов при многократном определении величины при постоянных условиях, обуславливая различия в их последних значащих цифрах.

Доверительный интервал представляет собой интервал значений случайной погрешности, внутри которого с заданной вероятностью находится искомое (истинное) значение погрешности результата измерений.

Анализируя полученные данные можно сделать вывод о том, что препараты апитулим и тулим имеют сходные бактериостатические свойства, а именно: разведения препаратов от 1/32 и более не оказывают существенного бактериостатического действия на микроорганизмы. Разведения 1/8 и 1/16 обладают значительным бактериостатическим действием. Так, если в 1 см³ инокулюма количество *E. coli* без внесения "медового" препарата составляет порядка $3,0 \times 10^5$, то в инокулюме с добавлением апитулима в разведении 1/16 количество *E. coli* в аналогичном объеме составляет порядка $1,0 \times 10^4$, т.е. 3,3%. Аналогичная картина наблюдается при действии разведений апитулима и тулима на сальмонеллы, псевдомонады, клебсиеллы. Количество кокковой микрофлоры в 1 см³ инокулюма без внесения "медового" препарата составляет порядка $2,0 \times 10^5$, а с добавлением апитулима в разведении 1/16- 8×10^3 , т.е. 4%; количество протей в 1 см³ инокулюма без внесения препарата составляет порядка $5,5 \times 10^5$, а с добавлением апитулима в разведении 1/16- 2×10^3 т.е. 3,6%; количество цитробактера соответственно составляет $6,5 \times 10^5$ и $3,3 \times 10^4$, т.е. 5%.

Таким образом, препараты апитулим и тулим обладают антимикробным действием и требуют дальнейшего изучения с целью возможного использования их, для коррекции кишечного биоценоза.

2.2.3.2. Опыт применения апитулима в производственных условиях.

Опыт проводили на одной из птицефабрик в течение 60 дней на ограниченном поголовье цыплят (24 тыс.), из которых половину составляла контрольная группа. Цельный апитулим разводили водой 1:50 и назначали с кормом из расчета 1 мл на голову. Препарат применяли двукратно в 7-ми и в 14-дневном возрасте. Других препаратов антимикробного действия на протяжении всего периода исследования птица не получала и была клинически здорова.

Контролем эффективности апитулима было выделение патогенной кишечной палочки и сальмонелл из трупов павших цыплят и в помете. Из десяти трупов цыплят опытной и контрольной групп, павших в течении 7 дней до применения апитулима, были выделены культуры патогенной кишечной палочки сероваров $O_2 O_{115}$ - 3 и 2 соответственно. После применения апитулима из 30 проб патологического материала от птицы опытной группы было выделено 4 культуры

патогенной кишечной палочки сероваров O_2 и O_{115} (13,3%). В контрольной группе, при исследовании такого же количества патологического материала было выделено 12 культур патогенной кишечной палочки сероваров O_1 O_2 и O_{115} (40%) и 2 культуры *S. enteritidis* (6,6%). На 50-ый день наблюдения в пробах помета от птицы опытной группы патогенной микрофлоры обнаружено не было, а из помета птицы контрольной группы были выделены две культуры *E. coli* (O_2) и одна - *S. enteritidis*.

Проверка достоверности различия результатов по критериям Стьюдента показала, что различие достоверно при уровне значимости 0,05 - для патологического материала $|Z| > 1,96$ ($Z = 2,56$) и 0,1 - для помета $|Z| > 1,64$ ($Z = 1,89$).

2.2.3.3. Определение токсичности, безвредности, пирогенности апитулима и тулима

Были проведены испытания на токсичность, пирогенность, безвредность в экспериментальной лаборатории РНИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена.

Для определения острой токсичности препараты разводили 1:4 0,9%-ным физиологическим раствором, подогревали до 37 С и в объеме 0,5 мл вводили со скоростью 0,1 мл/сек, в хвостовую вену 10-и белым мышам: 5 - раствор апитулима, 5 - раствор тулима. Наблюдение за животными вели в течение 48 часов. Ни одной мыши ни в одной группе не погибло. Следовательно, при однократном введении больших доз лабораторным животным данные препараты не токсичны.

Далее исследование проводили на 30 белых крысах и 6 кроликах. Животные были разделены на 3 группы, одна из которых служила контролем. Препараты разводили в соотношении 1:10 в 0,9% растворе натрия хлорида, вводили внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг в течение 7 дней. Результаты сравнивали на 1-ый, 10-й и 30-й день после последнего введения препарата. Наблюдение за животными на протяжении 30 дней не выявило внешних признаков токсического действия препаратов. Достоверного изменения морфологического состава крови и биохимических показателей в сыворотке крови после введения всех препаратов на 1-й и 30-й день не наблюдалось. Дегенеративных изменений клеток крови не обнаружено. После убоя животных на вскрытии патоморфологических изменений внутренних органов не обнаружено.

Лпитулим и тулим, разведенные 1:4 0,9%-ным физиологическим раствором, вводили в ушную вену кроликов в дозе 1,5±0,1 мл/кг. В течение трех часов измеряли температуру тела животных. Изменения температуры не превышали норму, следовательно, препараты апиогенны.

Испытание апитулима и тулима на безвредность проведено на 4 морских свинках (по 2 на препарат). Каждой свинке вводили по 5,0 мл рабочего раствора препаратов подкожно (по 2,5 мл в оба бока). При наблюдении в течение 7 суток общих и местных реакций не обнаружено. Следовательно, данные препараты безвредны.

ВЫВОДЫ

1. Анализ патогенной и условно-патогенной микрофлоры, выделенной из кишечника птиц в хозяйствах различного технологического направления при различной эпизоотической ситуации, позволил выявить следующие виды микроорганизмов: *E.coli*, *Salm.bovis morbificans*, *Ent.agglomerans*, *Prot.mirabilis*, *Prot.vulgaris*, *Ent.intermedius*, *Cit.freundii*, *Kl.pneumoniae*, *Prov.stuartii*, *Ser.rubideae*, *Sh.boydii*, *Xen.nematophilus*, *Kl.cryocrescens*, *Staph.lentus*. Доминирующими видами являются эшерихии и протеи, выделение которых составляет 42% и 24,5% соответственно.

2. При исследовании 19 групповых проб помета от птиц с птицефабрики, на которой, согласно технологическому процессу, антибиотики не применяются, выделено 13 культур *Salm. bovis morbificans*, нехарактерной для содержимого кишечника птиц. Из всех 19 проб помета птиц выделен вид *Xenorhabdus nematophilus* (сем. *Enterobacteriaceae*), не выделяемый ранее. Данный вид не обладал вирулентными свойствами.

3. Из содержимого тонкого отдела кишечника кур выделены *Salm.enteritidis*, *E.coli*, *Ent.agglomerans*, *Cit.freundii*. Доминирующими видами являются эшерихии и энтеробактеры, выделение которых составляет 42,3% и 27% соответственно.

Культуры кишечной палочки, имеющие адгезивные антигены F_{41} и A_{20} (26,03%) обладали выраженными вирулентными свойствами, в то время, как культуры, не имеющие адгезивными антигенами, не обладали вирулентными свойствами для белых мышей при внутрибрюшинном заражении.

4. При массовых геморрагических энтеритах цыплят и кур из содержимого кишечника, слизистых оболочек и печени выделены культуры *Cl.perfringens* и *Strep. faecalis*.

5. Из 34 партий мяса птицы механической обвалки в 25 г продукта были выделены 3 серовара сальмонелл: *Salm. Chester*, *Salm. braenderup*, *Salm. редких групп*. В 0,1 и 0,01 г продукта в 313 пробах были выделены сульфитредуцирующие клостридии.

6. Санитарно-микробиологические показатели колбасных изделий зависят от наличия сульфитредуцирующих клостридий в сырье. При обнаружении сульфитредуцирующих клостридий в 0,1 и 0,01 г мяса птицы механической обвалки, в 100% случаев исследованных вареных колбас низших сортов, изготовленных с использованием этого сырья, были обнаружены сульфитредуцирующие клостридии.

7. При изучении антибактериальных свойств апитулима и тулима установлено, что данные препараты в цельном виде обладают бактерицидными свойствами, а в разведении от 1/2 до 1/16 - бактериостатическими.

Методом серийных разведений определено максимальное разведение препаратов апитулима и тулима, обеспечивающее подавление роста микроорганизмов. Таким разведением для большинства исследованных культур является 1/4 для обоих вышеназванных препаратов.

При изучении бактериостатических свойств апитулима и тулима был применен метод определения доверительного интервала, т.е. определен интервал значений случайной погрешности, внутри которого с заданной вероятностью находится искомое (истинное) значение погрешности результата измерений. Доверительный интервал определен по двум препаратам (апитулиму и тулиму), для семи групп микроорганизмов (эшерихий, сальмонелл, протей, кокковой микрофлоры, псевдомонад, клебсиелл, цитробактеров), при разведении препаратов от 1/2 до 1/128.

8. Препараты, приготовленные на основе меда (апитулим и тулим) не токсичны, апирогенны, безвредны.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты наших исследований вошли в справочник «Микробиологический контроль мяса животных, птицы, яиц и продуктов их переработки», выпущенный издательством «КолосС» в 2002 году. В нем обобщена действующая нормативно-техническая документация по микробиологии мяса, яиц и продуктов их переработки, изложен порядок отбора проб и проведения их бактериологического анализа с использованием дифференциально-диагностических пластин для энтеробактерий и стафилококков, отработанный нами при выполнении диссертационной работы в разделе по идентификации культур, выделенных из помета и содержимого кишечника цыплят и кур.

2. Разработанные с нашим участием «Технические условия (ТУ)» на препараты апитулим и тулим согласованы с Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 07.10.2000 г.:

на апитулим ТУ 9325-007-00493361-00;

на тулим ТУ 9325-007-00493362-00.

«Наставления по применению апитулима и тулима в качестве иммуностимулирующих средств при бактериальных и вирусных болезнях телят, поросят и собак» утверждены Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 11 сентября 2000 г. Целесообразно дополнить их применением для птиц.

3. Для более точной и объективной оценки антибактериальных свойств препаратов использовать метод математического расчета доверительного интервала в соответствии с Государственным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 51446-99 «Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Борисенкова А.Н., Артемьева Т.Н. Характеристика микрофлоры, выделенной из помета птиц в производственных условиях// Материалы конференции по птицеводству национального комитета по сотрудничеству птицеводов России с Всемирной научной ассоциацией по птицеводству. Зеленоград, 2000, С. 165.
2. Артемьева Т.Н. Опыт применения апитулима на цыплятах// Материалы межвузовской научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов. Санкт-Петербургская ГАВМ, 2001, С. 14-15.
3. Артемьева Т.Н. Антимикробные свойства апитулима и тулима// Материалы 8-й международной межвузовской научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии». Санкт-Петербург, 2001, С. 46.
4. Артемьева Т.Н., Страхова У.И. Об испытании апитулима и тулима на токсичность// Материалы 8-й международной межвузовской научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии». Санкт-Петербург, 2001, С.108.
5. Артемьева Т.Н. О микрофлоре мяса птицы и колбасных изделий// Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Сборник научных трудов №133. Санкт-Петербург, 2001, С. 5.
6. Борисенкова А.Н., Артемьева Т.Н. Роль стрептококков и клостридий в этиопатогенезе желудочно-кишечных заболеваний бройлеров// Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Сборник научных трудов №134. Санкт-Петербург, 2002, С. 25-26.
7. Артемьева С.А., Артемьева Т.Н. и др. Справочник. Микробиологический контроль мяса животных, птицы, яиц и продуктов их переработки. М., «КолосС», 2002, 288 с.

№ 12460