

На правах рукописи

Каландаров Зафар Саидович

**ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ПРОБИОТИКА СУБТИЛБЕН
ПРИ КОЛИБАКТЕРИОЗЕ ТЕЛЯТ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



Душанбе – 2006

Работа выполнена в Таджикском научно-исследовательском ветеринарном институте Академии сельскохозяйственных наук Республики Таджикистан и Таджикском аграрном университете.

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор, академик ТАСХН Сатторов И. Т.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук Муминов А. М.
кандидат биологических наук
Каримов М. Ш.

Ведущая организация: Среднеазиатский яшурный институт.

Защита диссертации состоится 15 сентября 2006 г. в 10 ч на заседании диссертационного совета Д 050.001.01 при Таджикском научно-исследовательском ветеринарном институте Академии сельскохозяйственных наук Республики Таджикистан по адресу: 734005, г. Душанбе, ул. Каххорова, 43.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Таджикского научно-исследовательского ветеринарного института по адресу: 734005, г. Душанбе, ул. Каххорова, 43.

Автореферат разослан 10 августа 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук



Турдыев Ш. А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Ведущее место среди причин гибели молодняка крупного рогатого скота (КРС) занимают желудочно-кишечные болезни, наносящие огромный ущерб животноводству.

Поэтому в условиях интенсификации животноводства проблема повышения эффективности лечебно-профилактических мероприятий при желудочно-кишечных болезнях различной этиологии (незаразные, бактериальные, вирусные, при воздействии микотоксинов и др.) является острой для современной ветеринарии (Архангельский И. И. и др., 1960; Анохин Б. М., 1980; Коромыслов Г. Ф., 1980; Аликаев В. А. и др., 1981; Самохин В. Т., 1981; Соколова Н. Л. и др., 1982; Урбан В. П., 1985; Воронин Е. С. и др., 1990; Шахов А. Г., 2000; Гаффаров Х. З. и др., 2002 и др.).

Для терапии и профилактики болезней желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) широко применяют антибиотики, сульфаниламиды, нитрофураны и другие химиопрепараты, бесконтрольное использование которых имеет вредные последствия: отрицательное влияние на формирование иммунитета и характер иммунологических реакций, нефротоксическое и гепатотоксическое действия, неблагоприятное влияние на нервную и кровяную системы, аллергия и дисбактериозы, возникновение устойчивости микроорганизмов к этим лекарственным средствам.

В результате развивающегося дисбактериоза изменяются процессы кишечного микробного пищеварения, усиливается перистальтика, меняются консистенция химуса и значения рН кишечного содержимого, нарушается водно-солевой обмен. Обезвоживание тканей и интоксикация организма приводят к гибели животных.

Накопление антибиотикорезистентных бактерий в организме животных и окружающей среде снижает эффективность лечебных и профилактических мероприятий и приводит к тяжелым экологическим последствиям.

В настоящее время для профилактики и терапии желудочно-кишечных болезней и повышения продуктивности молодняка сельскохозяйственных животных широко применяют различные симбиотические микроорганизмы, среди которых наиболее перспективными признаны молочнокислые, пропионовокислые, бифидобактерии, *Bacillus subtilis* и др., проявляющие избирательную антагонистическую активность в отношении патогенной кишечной флоры, эффективно и быстро восстанавливающие микробиоценоз кишечника (Антипов В. А., 1991; Панин А. Н. и др., 1993, 1999; Паршин П. А. и др., 1997; Малик Н. И. и др., 2000, 2001 и др.).

Основные преимущества пробиотиков в сравнении с другими антимикробными препаратами – высокая эффективность, отсутствие побочных действий и экономичность (Шахназаров В. Ю., 1990; Проскурин Ю. Н., 2000;

Стечин Б. Т. и др., 2005 и др.).

Установлено, что использование пробиотиков из представителей эндогенной микрофлоры для лечения и профилактики энтеритов животных недостаточно эффективно из-за слабой противобактериальной активности этих препаратов, которая значительно выше у препаратов на основе спорообразующих бактерий *B. subtilis*.

Вышеизложенное обуславливает актуальность настоящей работы, целью которой явились разработка эффективного при колибактериозе телят пробиотического препарата на основе местных штаммов *B. subtilis* и исследование физико-химических и биологических свойств этого препарата.

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

1. Подобрать местные штаммы *B. subtilis*, обладающие высокой противомикробной активностью, для создания на их основе пробиотика.

2. Разработать эффективный пробиотический препарат на основе этих штаммов, изучить их антагонистическую активность и исследовать физико-химические и биологические свойства препарата.

3. В экспериментальных и производственных условиях определить терапевтическую эффективность пробиотика субтилбен при колибактериозе новорожденных телят.

Научная новизна. Подобраны штаммы *B. subtilis* и изучена их антибактериальная активность в отношении музейных штаммов и изолятов возбудителей инфекционных болезней ЖКТ животных.

Разработан пробиотический препарат субтилбен на основе местных штаммов *B. subtilis* (Патенты ТЈ 390, ТЈ 391), отработаны методы изготовления и контроля препарата, изучены его антимикробные свойства, безвредность и стабильность.

Определена профилактическая и лечебная эффективность субтилбена при колибактериозе телят, отработан рациональный способ применения препарата.

Практическая ценность. На основании полученных результатов пробиотик субтилбен предложен в качестве противобактериального препарата.

Материалы диссертации вошли в нормативную документацию на препарат:

- Инструкцию по изготовлению и контролю иммунобиотика субтилбен для профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных болезней животных и пчел (утв. Главным управлением ветеринарии (ГУВ) Министерства сельского хозяйства (МСХ) Республики Таджикистан (РТ) 25.11.2004 г.);

- Технические условия на иммунобиотик субтилбен (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.);

- Наставление по применению иммунобиотика субтилбен для профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных болезней

животных и пчел (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.);

- Решение 26-го заседания Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ от 24.11.2004 г. (Душанбе) о практическом использовании препарата субтилбен в ветеринарной практике СНГ.

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

- результаты подбора штаммов *B. subtilis* для создания пробиотического препарата и изучения их противомикробной активности;

- технология изготовления и методы контроля физико-химических и биологических свойств субтилбена;

- результаты изучения антибактериальной активности и безвредности субтилбена;

- результаты экспериментальных и производственных испытаний эффективности препарата при колибактериозе телят.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на заседаниях ученого совета Таджикского научно-исследовательского ветеринарного института (ТаджНИВИ) (2003 – 2005 гг.); республиканских конференциях и семинарах-совещаниях (Душанбе, 2003 – 2006 гг.); X Международном симпозиуме ветеринарных диагностов и Семинаре по биотехнологии МЭБ (Италия, 2001 г.); Международной научно-практической конференции «Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей» (Покров, 2002 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней животных в современных условиях» (Душанбе, 2003 г.), посвященной 60-летию ТаджНИВИ; Второй Международной научной конференции «Мониторинг распространения и предотвращения особо опасных болезней животных» (Самарканд, 2004 г.); 26-ом заседании Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ (Душанбе, 2004 г.).

Публикации. По результатам исследований опубликованы 8 научных работ, получены 2 патента РТ.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения.

Диссертация изложена на 114 страницах, иллюстрирована 9 таблицами и 9 рисунками. Список литературы содержит 255 источников. В приложение включены материалы, подтверждающие внедрение результатов исследования в практику.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2000 – 2005 гг. в лабораториях вирусологии ТаджНИВИ и микробиотехнологии Таджикского аграрного университета (ТАУ) в соответствии с республиканской научно-технической программой «Разработать и внедрить новые высокоэффективные комплексные препараты по профилактике и терапии респираторно-кишечных инфекций молодняка сельскохозяйственных животных» на 2001 – 2005 гг., зарегистрированной в Национальном патентно-информационном центре (НПИЦентр) РТ (№ госрегистрации 00000967).

Научно-производственные опыты, апробация и производственная проверка полученных результатов проведены в 8 животноводческих хозяйствах РТ.

Диагностические исследования. Колибактериоз диагностировали на основании анализа эпизоотологических данных с учетом клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений и результатов бактериологического исследования патологического материала от больных, павших и вынужденно убитых больных телят.

Животные. Эксперименты проводили на 196 белых мышах (массой 18 – 20 г), 81 кролике породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг), 265 телятах черно-пестрой породы (массой 31 – 33 кг), производственные испытания – 590 телятах черно-пестрой породы (массой 31 – 33 кг). Разброс в экспериментальных группах по исходной массе тела не превышал 10%.

В работе применяли разработанный ТаджНИВИ пробиотик субтилбен, представляющий собой комплекс взвеси микробных клеток местных штаммов (BS TJ 09, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26) *B. subtilis* и минеральных и растительного веществ.

Культивирование *B. subtilis* проведено при участии Бобоева Д. А. по общепринятым и специально разработанным методам.

При разработке субтилбена использовали 5 штаммов *B. subtilis*, выделенных из ЖКТ новорожденных телят (BS TJ 06, BS TJ 07, BS TJ 08, BS TJ 09, BS TJ 10), и 2 штамма из коллекции ТАУ (BS TJ Д 24, BS TJ Д 26).

Для стандартизации и контроля качества субтилбена, а также изучения его стабильности при хранении разработаны методы качественного и количественного контроля препарата.

Физико-химические свойства субтилбена

Внешний вид, наличие механических примесей, плесени определяли визуально при рассмотрении отобранных образцов при хорошем естественном освещении на белом фоне на расстоянии 25 – 30 см от глаз.

Концентрацию водородных ионов (pH) 10% водной суспензии определяли потенциометрически (ГФ XI, вып. 1, с. 175).

Массовую долю влаги определяли по ГОСТу 24061-89.

Биологические свойства субтилбена

Однородность определяли методом микроскопии.

Подсчет количества микробных клеток (м.к.) B. subtilis. Культуру

разводили физиологическим раствором в 10 – 15 раз и заправляли суспензией подготовленную камеру Горяева, в 5 квадратах которой под микроскопом определяли количество м.к. и рассчитывали их число в 1 см³.

Определение количества жизнеспособных клеток B. subtilis. В пробирку, содержащую 1 г субтилбена добавляли 9 см³ стерильного физиологического раствора, после тщательного перемешивания 0,5 см³ суспензии переносили во вторую пробирку с 4,5 см³ физиологического раствора, из которой 0,5 см³ разведенной суспензии – в третью, из третьей – в четвертую, из четвертой – в пятую, из пятой – в шестую пробирку с 4,5 см³ физиологического раствора.

Из последней (шестой) пробирки по 0,5 см³ суспензии пипеткой засеивали в шесть чашек Петри с агаром СБД (комплекс минеральных и растительного компонентов), колебательными движениями распределяя суспензию по всей поверхности агара. Культивировали 36 ч при 37°С, после чего учитывали результаты исследования (определяли количество больших и малых по диаметру колоний).

Стерильность субтилбена определяли по ГОСТу 28085-89.

Для исключения *контаминации микоплазмами* производили посевы проб субтилбена на среду Эдварда (жидкую, полужидкую и твердую), обогащенную 20% сыворотки крови лошади, 10% дрожжевого экстракта, 0,5% глюкозы с добавлением фенол-рота в конечной концентрации 0,001%.

Изучение антагонистических свойств субтилбена в сравнительном аспекте (контроль – бактерин-SL) проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой и плотной питательной средах на музейных штаммах (6) и изолятах E. coli (4), S. dublin (3), P. multocida (4), Pr. vulgaris (2), выделенных от больных диареей телят в животноводческих хозяйствах РТ.

Идентификацию сальмонелл и пастерелл, изучение антагонистической активности B. subtilis в отношении этих возбудителей проводили при участии Хасанова Н. Р.

Динамику антагонистической активности субтилбена в отношении односуточной бульонной культуры E. coli (концентрация – 1 млрд м.к./мл) определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (контроль – силикат алюминия с примесью силикатов магния и кальция).

Токсические свойства субтилбена

Безвредность субтилбена изучали в соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» (М., 1988).

Испытание на *токсичность* проводили по ГФ XI (вып. 2, с. 182).

Стабильность субтилбена для определения срока его годности изучали методом «ускоренного старения» при повышенных температурах (37 и 50°С) и естественного хранения. Образцы экспериментальных серий препарата помещали в термостат на сроки, соответствующие 0,5; 1; 2 и 3 годам естественного хранения. Оценку качества препарата проводили по основным показателям.

Ветеринарно-санитарную экспертизу мяса осуществляли согласно ГОСТу 202353.

Для изучения профилактической эффективности субтилбен вводили перорально с водой или молоком в дозе 0,2; 0,3 и 0,5 г/кг массы тела один раз в сутки в течение 10 дней, лечебной – в тех же дозах 2 раза в сутки до выздоровления.

Экономическую эффективность научных разработок рассчитывали согласно «Методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий» (утв. ГУВ МСХ СССР в 1982 г.), а также в соответствии с «Методикой определения экономической эффективности использования в сельском хозяйстве результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, новой техники, изобретений и рационализаторских предложений» (утв. МСХ СССР в 1983 г.).

Методики отдельных экспериментов изложены в соответствующих разделах диссертации.

Цифровой материал диссертации обработан статистически по критерию Стьюдента для проверки достоверности различий. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при $p \leq 0,05$ (Лакин Г. Ф., 1990).

За основу выводов и практических предложений взяты результаты контролируемых опытов в лабораторных и производственных условиях.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Подбор штаммов *B. subtilis* и изучение их антагонистических свойств

Отбор производственных штаммов субтилбена производили из 5 штаммов *B. subtilis*, выделенных из ЖКТ новорожденных телят (BS TJ 06, BS TJ 07, BS TJ 08, BS TJ 09, BS TJ 10), и 2 штаммов из коллекции ТАУ (BS TJ Д 24, BS TJ Д 26).

В результате изучения морфологических свойств было установлено, что исследуемые культуры представляют собой грамположительные спорообразующие палочки с закругленными концами. Размер клеток – $1,9 \times 0,5$ нм; в мазках 18-часовой культуры клетки расположены одиночно, попарно, реже – в цепочку. Споры в клетке расположены центрально, размер спор – $0,9 \times 0,5$ нм.

На твердых питательных средах при температуре 37°C через 24 ч наблюдали рост бактерий в виде кремово-белых складчатых колоний с кратерообразным центром, вязкой консистенции, края колоний изрезанные.

Испытуемые культуры восстанавливали нитраты до нитритов, образовывали каталазу, кислоты из D-глюкозы, L-арабинозы, D-ксилозы и D-маннита, окисляли глюкозу с образованием ацетона (ацетилметилкарбинола), расщепляли крахмал, желатин и казеин.

При пероральном и парентеральном введении смывов суточной агаровой культуры испытуемых штаммов *B. subtilis* белым мышам, кроликам и телятам в концентрациях 3 – 10 млрд м.к./гол. признаки заболевания и других физиологических отклонений у опытных (в сравнении с контрольными) животных не отмечали.

Результаты бактериологического исследования показали, что МПК 5

культур *B. subtilis* (BS TJ 08, BS TJ 09, BS TJ 10, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26) составляет 3,9 – 15,6 млн м.к./мл. Две культуры (BS TJ 06; BS TJ 07) имели низкую антимикробную активность (рис. 1). Высокую противобактериальную активность (7,8 – 31,2) млн м.к./мл) проявили культуры BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 (рис. 2).

Полученные данные о морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных свойствах, патогенности и противомикробной активности штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 послужили основанием для использования их при изготовлении субтилбена.

3.2. Разработка лекарственной формы субтилбена

3.2.1. Состав

Для успешной профилактики и лечения бактериальных желудочно-кишечных болезней необходима одновременная обработка большого поголовья, поэтому наиболее удобной и эффективной лекарственной формой является порошок для перорального применения.

В состав субтилбена входят:

взвесь м.к. штаммов <i>B. subtilis</i> BS TJ 09, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26 (1:1:1)	50 – 70 млрд м.к./г
минеральные и растительные вещества	остальное

3.2.2. Технология

Основные технологические стадии производства субтилбена в форме порошка следующие:

1. Получение матричных культур. С полужидкого агара культуру производственных штаммов *B. subtilis* засевают в пробирку с питательным бульоном СДБ и выращивают в течение 18 – 24 ч при 37°C. Культуры проверяют на чистоту и вновь засевают в матрасы, наполненные питательной средой не более 2/3 объема. Через 18 – 24 ч инкубирования культуры *B. subtilis* проверяют на чистоту и используют для изготовления производственной серии биомассы.

2. Изготовление производственной серии биомассы. Чистые культуры 18 – 24-часового роста в количестве 5%-ного объема засеваемой среды инокулируют в 10-литровые бутылки, наполненные средой СДБ (рН 7,4 – 7,6), и выращивают при 37°C в течение 48 ч. Затем культуры штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24 и BS TJ Д 26 *B. subtilis* смешивают в равных количествах. Полученный гомогенат перемешивают с бентонитопектиновой смесью.

3. Сушку производственной серии биомассы осуществляют методом контактно-сорбционного обезвоживания на бентонитопектиновой смеси в сушильном шкафу при 40 – 50°C в течение 48 – 72 ч. Концентрация биомассы культур *B. subtilis* в порошке – 50 – 70 млрд м.к. с содержанием 90 – 100% спор.

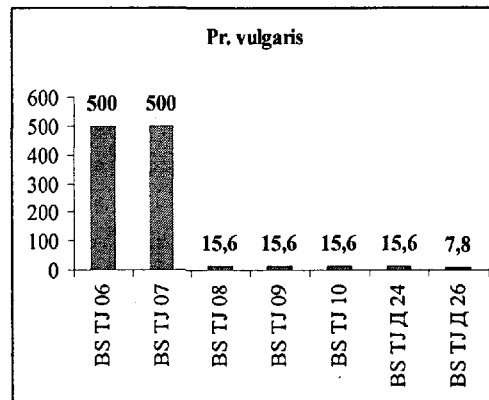
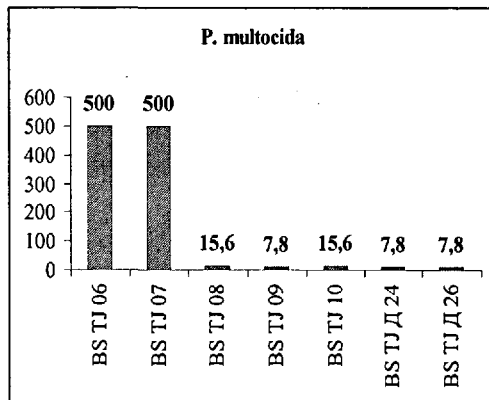
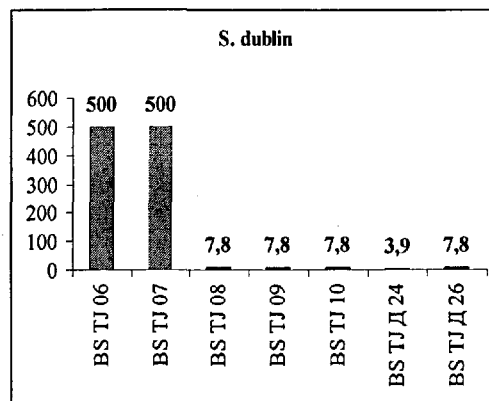
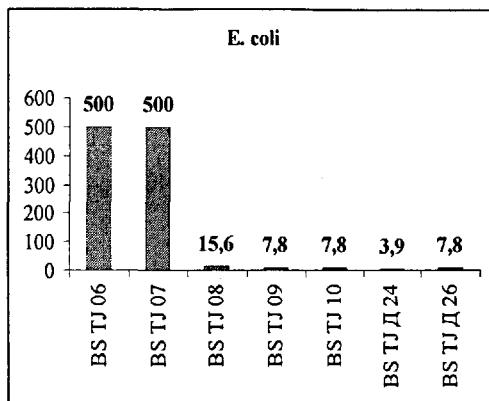


Рис. 1. МПК изученных штаммов, млн м.к. / мл.

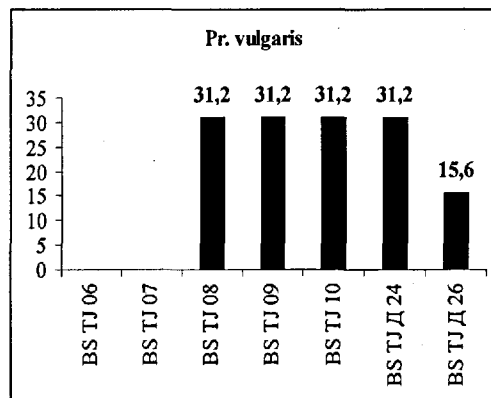
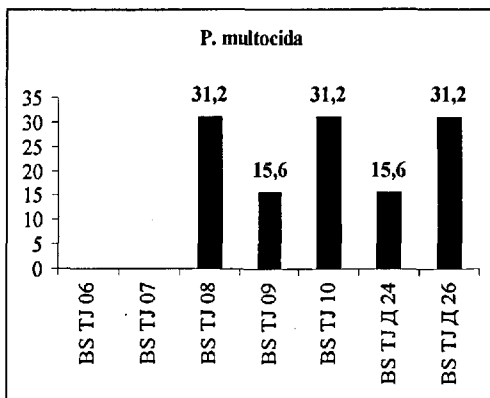
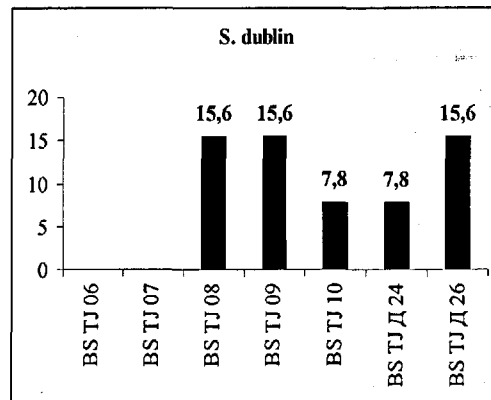
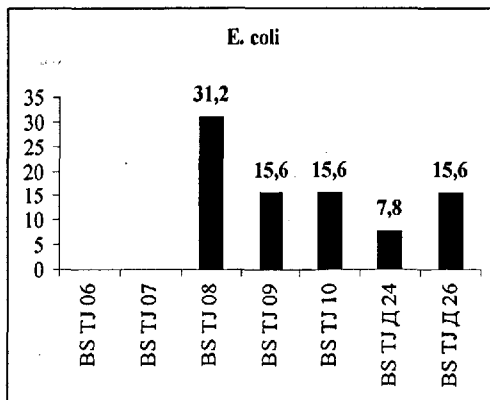


Рис. 2. МБцК изученных штаммов, млн м.к. / мл.

3.3. Антагонистические свойства субтилбена

Борьба с инфекционными болезнями приобретает в последние годы все большее значение в связи с развитием резистентности микроорганизмов к широко применяемым антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам, что обуславливает необходимость изыскания эффективных лечебно-профилактических средств, в том числе биологических.

Изучение антагонистических свойств субтилбена в сравнительном аспекте (контроль – бактерин-SL) проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой и плотной питательной средах на музейных штаммах (6) и изолятах *E. coli* (4), *S. dublin* (3), *P. multocida* (4), *Pr. vulgaris* (2), выделенных от больных диареей телят в животноводческих хозяйствах РТ.

При МПК в мазках тест-культуры, окрашенных по Граму, наблюдали задержку роста, МБЦК (после пересева на агаровую или бульонную среды СБД) через 24 – 72 ч инкубации – гибель тест-микроба.

МПК субтилбена для *E. coli* и *S. dublin* – 7,8 млн м.к./мл, *P. multocida* и *Pr. vulgaris* – 15,6 (рис. 3), МБЦК – соответственно 15,6; 31,2 млн м.к./мл (рис. 4), что свидетельствует о высокой бактериостатической и бактерицидной активности препарата в отношении исследованных тест-микробов.

Известный препарат бактерин-SL вызывал гибель тест-культур в концентрациях 125 (*E. coli* и *P. multocida*) и 250 млн м.к./мл (*S. dublin* и *Pr. vulgaris*).

Динамику антагонистической активности субтилбена изучили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в отношении односуточной бульонной культуры *E. coli* (концентрация – 1 млрд м.к./мл). Оценку бактерицидной активности проводили через 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 и 48 ч.

Установлено (рис. 5), что изменение морфологии *E. coli* начинается спустя 6 ч после контакта с препаратом: клетки тест-культуры увеличивались в размере и принимали различную форму. Через 12 – 18 ч количество клеток *E. coli* начинало уменьшаться, а через 48 ч после контакта с препаратом лизис тест-бактерий заканчивается.

При изучении динамики антагонистической активности субтилбена в отношении серотипов *E. coli* O8, O101 (выделялись наиболее часто), а также O9, O15, O55, O78, O117, O115, выделенных от больных колибактериозом телят, бактерицидная активность проявлялась в концентрациях 15,6 и 31,2 млн м.к./мл, что свидетельствует о равной активности препарата в отношении различных серотипов *E. coli*.

В контрольных пробирках (минеральные и растительные вещества) изменение морфологии тест-культуры не наблюдали, что свидетельствует о связи бактерицидной активности субтилбена с выделением *B. subtilis* биологически активных веществ.

Таким образом, субтилбен обладает высокой антагонистической активностью в отношении музейных штаммов и изолятов *E. coli*, *S. dublin*, *P. multocida* и *Pr. vulgaris*, которая обусловлена выделением *B. subtilis* биологически активных веществ.

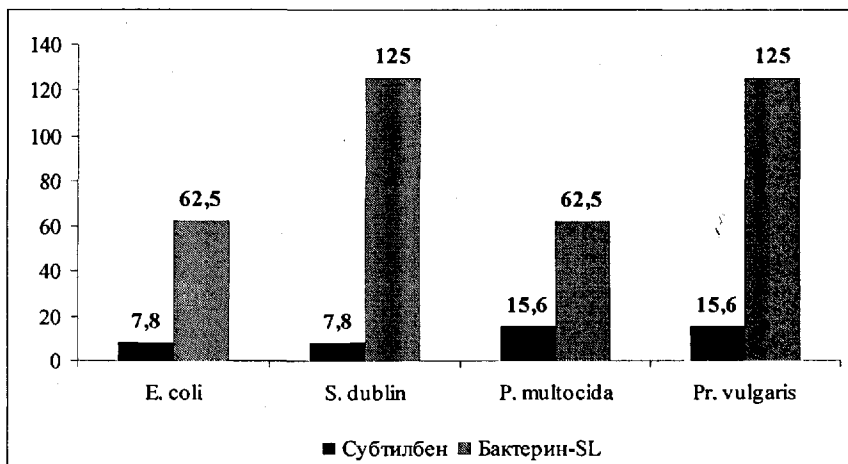


Рис 3. Минимальная подавляющая концентрация, млн м.к./мл.

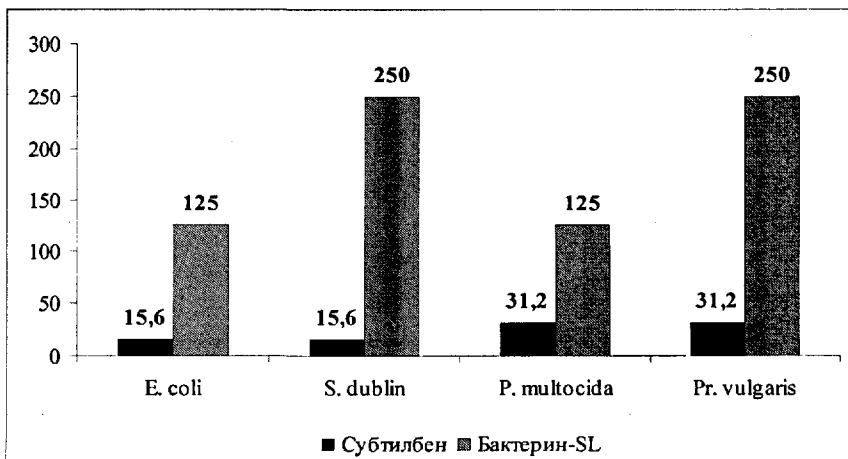


Рис 4. Минимальная бактерицидная концентрация, млн м.к./мл.

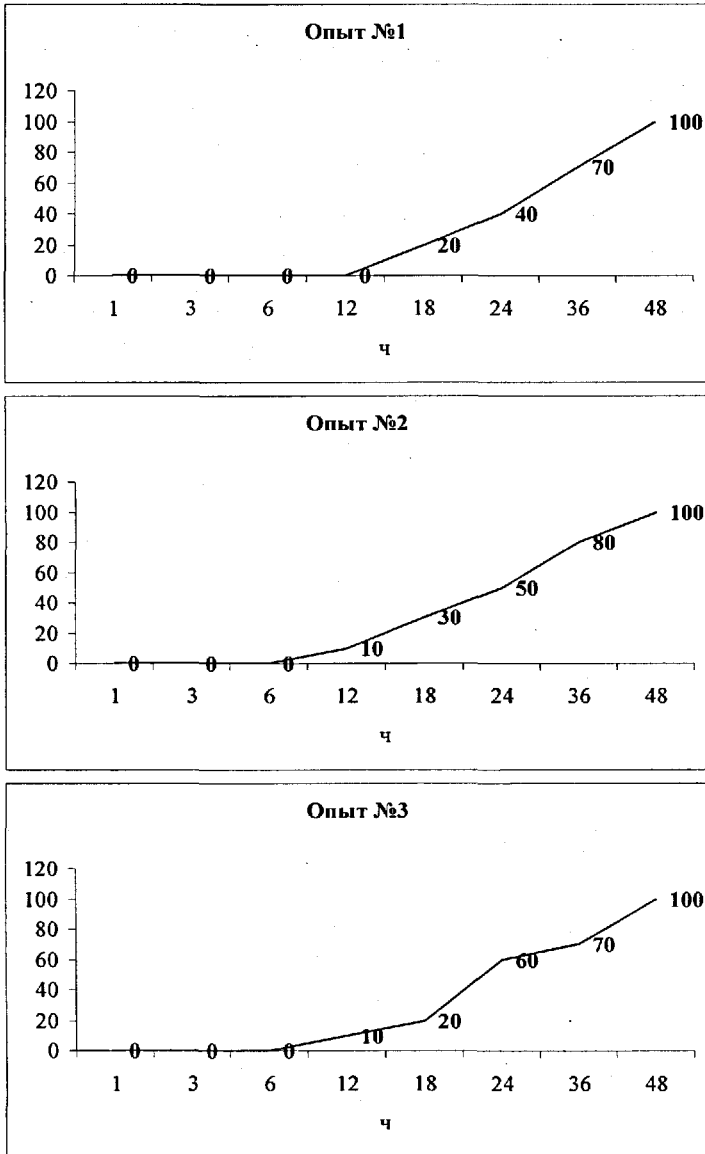


Рис. 5. Динамика лизиса *E. coli* после контакта с *B. subtilis*, % лизиса.

3.4. Токсические свойства субтилбена

Безвредность субтилбена изучали на белых мышах (массой 18 – 20 г, $n=10$), кроликах породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг, $n=5$) и новорожденных телятах черно-пестрой породы (массой 31 – 33 кг, $n=5$), которым препарат в ориентировочно-терапевтической дозе (0,5 г/кг массы тела) вводили с водой перорально в объемах соответственно 0,5; 10 и 30 мл 2 раза в сутки в течение 7 дней.

В опытах на белых мышах (массой 18 – 20 г, $n=10$) и новорожденных телятах черно-пестрой породы (массой 31 – 33 кг, $n=5$), из которых по принципу парных аналогов сформировали по 11 групп, изучали *острую токсичность субтилбена*.

Белым мышам субтилбен в виде суспензии на физиологическом растворе вводили однократно перорально в объеме 0,5 мл в дозах 0,25 г/кг массы тела (1-я группа), 0,5 (2-я), 0,75 (3-я), 1,0 (4-я), 1,25 (5-я), 1,5 (6-я), 1,75 (7-я), 2,0 (8-я), 2,25 (9-я), 2,5 г/кг массы тела (10-я); телятам – в объеме 30 мл в тех же дозах. Контрольным животным в соответствующих объемах вводили физиологический раствор.

За лабораторными животными и телятами наблюдали в течение 14 дней, учитывая общее состояние, внешний вид, поведенческие реакции, прием пищи и воды, ритм и частоту сердцебиения, количество дыхательных движений.

Гибели опытных животных не наблюдали, клиническое состояние опытных и контрольных животных не отличалось.

Таким образом, субтилбен относится к малотоксичным веществам.

В опытах по скармливанию субтилбена в течение 20 суток трем группам ($n=10$) белых мышей (массой 18 – 20 г) и трем группам ($n=10$) кроликов породы шиншилла (массой 2,5 – 2,7 кг) в 2-, 5- и 10-кратной ориентировочно-терапевтической дозе (0,5 г/кг массы тела) изучали *хроническую токсичность препарата*. Животные контрольных групп субтилбен не получали. За лабораторными животными наблюдали в течение 30 дней.

Установлено, что длительное введение субтилбена в дозах 1,0; 2,5 и 5 г/кг массы тела не влияет на поведение, аппетит, прием воды, состояние слизистых оболочек и шерстного покрова опытных и контрольных животных.

Установлено, что применение субтилбена в дозах 1,0; 2,5 и 5 г/кг массы тела не влияет на динамику массы тела, которую определяли на 5, 10, 15 и 20 сутки, у опытных и контрольных животных (величины статистически не отличались). Применение препарата не вызывало повышения температуры тела и не влияло на характер локомоторной активности, стереотипное поведение и выносливость животных.

Влияние субтилбена на кожу и слизистые оболочки изучали методом однократной аппликации 10% суспензии субтилбена на кожу мышей (массой 18 – 20 г, $n=6$).

Повторное местное раздражающее действия препарата исследовали на белых мышах (самках, массой 18 – 20 г, $n=6$) и кроликах (самках, массой 2,5 – 2,7 кг, $n=6$), которым ежедневно на выстриженный участок кожи в межлопаточной области наносили соответственно по 1 и 2 капли субтилбена в

течение 14 и 21 дня соответственно. Животным контрольных групп ($n=6$) по той же методике наносили подсолнечное масло. Наблюдение за белыми мышами вели в течение 30, кроликами – 60 дней.

На кроликах (самках, массой 2,5 – 2,7 кг), которых разделили на две группы ($n=6$) изучали действие субтилбена на слизистую оболочку глаза.

Местное раздражающее действие субтилбена на кожу и слизистые глаз при однократном и повторном введении выражено слабо.

3.5. Стандартизация субтилбена

Для стандартизации и контроля качества субтилбена, изучения его стабильности при хранении нами разработаны качественные и количественные методы исследований, предусмотренные ОСТ 91500.05.001.00 в требованиях к качеству порошков.

Результаты проверки качества трех экспериментальных серий показали хорошую воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля субтилбена.

Качество препарата характеризуется следующими физико-химическими и биологическими показателями:

1. Внешний вид и цвет – порошок серовато-белого цвета.
2. Наличие механических примесей, плесени – нет.
3. Концентрация водородных ионов (рН) 10% водной суспензии – 6,5 – 7,0.
4. Массовая доля влаги – не более 10%.
5. Однородность – посторонняя микрофлора отсутствует.
6. Количество м.к. *B. subtilis* – 50 – 70 млрд/г.
7. Количество жизнеспособных клеток *B. subtilis* – 75 – 80%.
8. Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой – отсутствует.
9. Контаминация микоплазмами – отсутствует.
10. Антагонистические свойства (МБЦК в отношении *E. coli*) – 7,8 – 31,2 млн м.к./г.
11. Токсичность в 10-кратной терапевтической дозе – нетоксичен.

На основании проведенных исследований были предложены требования к качеству субтилбена, которые вошли в инструкцию по изготовлению и контролю и технические условия на препарат.

3.6. Стабильность субтилбена

Изучение стабильности субтилбена методом «ускоренного старения» при повышенных температурах (37 и 50°C) (образцы экспериментальных серий препарата помещали в термостат на сроки, соответствующие 0,5; 1; 2 и 3 годам естественного хранения) показало, что по физико-химическим и биологическим показателям качества препарат оставался стабильным в течение срока, соответствующего 2 годам естественного хранения.

При естественном хранении физико-химические и биологические свойства субтилбена оставались стабильными в течение 2 лет.

На основании полученных данных установлен срок хранения препарата –

2 года. Препарат хранят по списку Б, в сухом, хорошо проветриваемом, защищенном от света и атмосферных осадков месте, при температуре не выше 30°С.

3.7. Ветеринарно-санитарная оценка качества мяса при введении субтилбена

Результаты ветеринарно-санитарной экспертизы и бактериологических исследований мяса, полученного после убоя кроликов, обработанных субтилбеном, свидетельствуют о его доброкачественности.

После 5- (2 раза в сутки; 1-я группа) и 10-кратной (1 раз в сутки; 2-я группа) дачи субтилбена в дозе 0,5 г/кг массы тела установлено, что мясо кроликов опытных групп не отличалось по качеству от мяса контрольных животных, на разрезе мышечная ткань красноватого цвета, поверхность разреза влажная, эластичная, плотная; бульон прозрачный без посторонних запахов.

Бактериологическими исследованиями обсемененности проб мяса и внутренних органов микроорганизмами из групп токсикоинфекций не обнаружено. Мазки-отпечатки из проб мяса опытных и контрольных животных окрашивались плохо.

В препаратах из поверхностных слоев обнаруживались отдельные колонии (по 1 – 3 в поле зрения микроскопа) кокковой микрофлоры. В препаратах, приготовленных из глубоких слоев мышц, микрофлора не выделялась.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что многократное введение субтилбена не приводит к статистически значимым изменениям качественных и биохимических показателей мяса животных.

3.8. Эффективность субтилбена при колибактериозе телят

В настоящее время с целью профилактики и терапии энтеритов и повышения продуктивности молодняка сельскохозяйственных животных широко используют различные симбиотические микроорганизмы, среди которых наиболее перспективными признаны молочнокислые, пропионовокислые, бифидобактерии, *V. subtilis* и др.

Нами на основе *V. subtilis* был изготовлен препарат субтилбен в форме порошка, лечебно-профилактическая эффективность которого изучена в животноводческих хозяйствах РТ.

3.8.1. Профилактическая эффективность

В экспериментальных условиях профилактическая эффективность субтилбена исследована в сравнении с препаратом-аналогом (биоспорин) на 4 молочно-товарных фермах, стационарно неблагополучных по колибактериозу.

Субтилбен телятам выпаивали с молозивом (молоком) в дозах 0,2 (1-я группа, n=20), 0,3 (2-я группа, n=20) и 0,5 г/кг массы тела (3-я группа, n=20) в течение 10 дней 1 раз в сутки; биоспорин (4-я группа, n=20) использовали в соответствии с наставлением по применению препарата.

В течение месяца за животными вели клиническое наблюдение, учитывая

общее состояние, заболеваемость и сохранность.

Результаты клинических наблюдений свидетельствуют о высокой профилактической эффективности субтилбена, выразившейся в предотвращении колибактериоза (2 и 3-я группы), полной сохранности и хорошем общем состоянии телят, увеличении пророста массы тела.

В опытной группе, телятам которой субтилбен выпаивали в дозе 0,2 г/кг массы тела в течение 10 дней 1 раз в сутки, заболело 1 (5%) животное; в контрольной группе заболели 3 (15%), пал 1 теленок (5%). Профилактическая эффективность субтилбена в экспериментальных условиях составила 95 – 100%, что по сравнению с препаратом-аналогом (биоспорин) на 10 – 15% выше (рис. 6). В опытных группах телят среднесуточный прирост живой массы был выше по сравнению с контрольной на 4,0 – 28,8%.

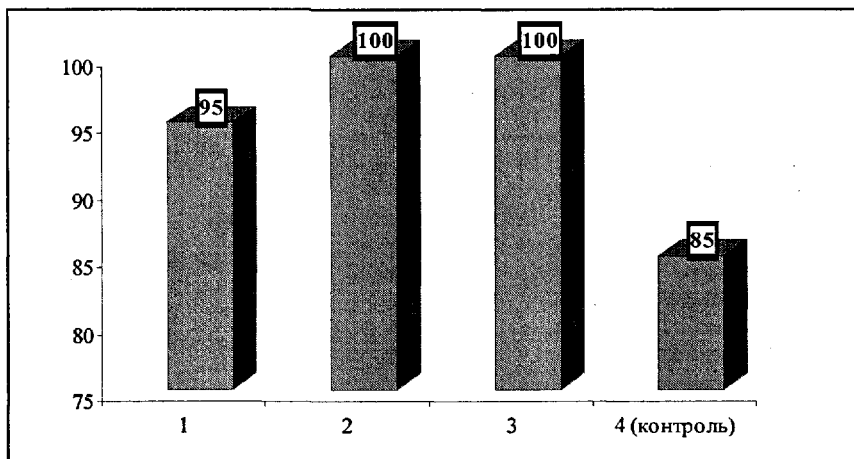


Рис. 6. Профилактическая эффективность субтилбена в экспериментальных условиях в сравнении с биоспорином, %.

При производственном испытании субтилбена на 356 телятах в 5 хозяйствах районов республиканского подчинения, Согдийской и Хатлонской областей РТ в 2003 – 2005 гг. профилактическая эффективность препарата составила 95,5 – 96,0%. Профилактические мероприятия, проводившиеся по схеме принятой в хозяйствах, предотвращали колибактериоз телят (198 гол.) на 87 – 89%.

Таким образом, установлена профилактическая эффективность субтилбена, которая в экспериментальных условиях составляет 95,0, в производственных – 95,5 – 96,0%.

3.8.2. Лечебная эффективность

Изучение терапевтической эффективности субтилбена при колибактериозе телят провели в 8 хозяйствах районов республиканского подчинения, Согдийской и Хатлонской областей РТ.

Колибактериоз диагностировали на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов бактериологических исследований.

При изучении клинического состояния у больных животных с острой формой колибактериоза отмечали кратковременное повышение температуры тела в начале болезни до 40 – 40,5°C, снижение аппетита, вялость, малоподвижность. Пульс становился частым, нитевидным (частота пульса доходила до 140 уд/мин). Дыхание было поверхностным, брюшного типа (32 – 49 /мин). Наблюдались истечения из носовой полости. На 2 – 3 дни болезни появлялся профузный понос. Испражнения были бело-желтого цвета, часто пенистые, с неперевавленными сгустками казеина, иногда с примесью крови. Спустя 12 ч после инфицирования у больных телят начиналось обезвоживание организма. Глазные яблоки западали в орбиты. Состояние животных было угнетенным, реакция на окружающее – сниженной.

При патологоанатомическом вскрытии павших телят на эпикарде и под эпикардом наблюдали точечные кровоизлияния. Ткань печени перерождена. Селезенка незначительно увеличена, под капсулой – точечные кровоизлияния. Преджелудки содержали смесь серовато-желтого цвета. На слизистой оболочке, покрытой слизью, местами имелись кровоизлияния. Слизистая оболочка кишечника набухшая, гиперемированная, с кровоизлияниями. Мезентеральные лимфатические узлы увеличены и гиперемированы.

При бактериологическом исследовании паренхиматозных органов павших и вынужденно убитых с диагностической целью телят выделены патогенные культуры *E. coli*.

Для опыта подобрали 4 группы больных колибактериозом телят 4- – 7-дневного возраста. Животным 1-й группы (n=16) субтилбен, растворенный в 300 мл воды, в дозе 0,2 г/кг, 2-й (n=16) – 0,3, 3-й (n=16) – 0,5 г/кг массы тела выпаивали дважды в сутки. Контрольную группу телят (n=16) лечили биоспорином в соответствии с наставлением по применению препарата.

За животными в течение 14 дней вели клиническое наблюдение, учитывая длительность болезни, выздоровление, сохранность поголовья, прирост массы и температуру тела.

Проведенными исследованиями установлено, что применение субтилбена способствовало улучшению общего состояния животных, повышению аппетита, нормализации температуры тела. Более высокий лечебный эффект отмечен в группе телят, получавших субтилбен в дозе 0,3 – 0,5 г/кг массы тела.

Установлено, что терапевтическая эффективность субтилбена в дозе 0,2 г/кг массы тела – 75,0% (соответствует таковой у биоспорина), а в дозах 0,3 и 0,5 г/кг массы тела – 87,5% (рис. 7).

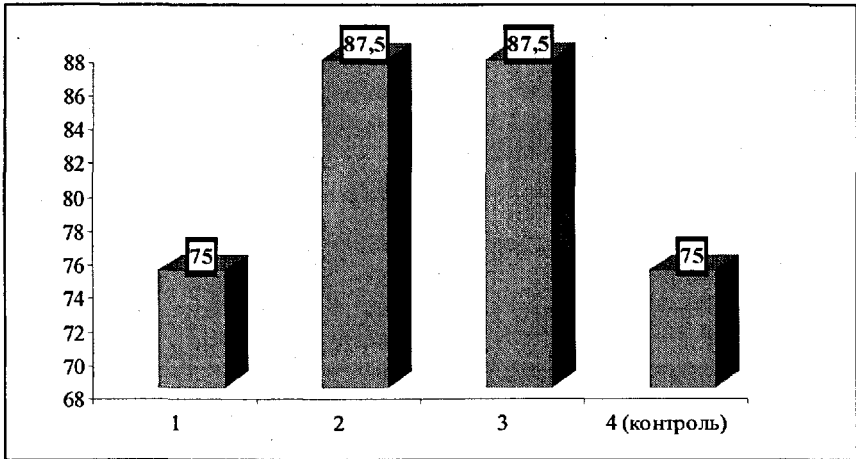


Рис. 7. Лечебная эффективность субтилбена в экспериментальных условиях в сравнении с биоспорином, %.

Продолжительность лечения субтилбеном в дозе 0,2 г/кг массы тела составила 5,2, в дозах 0,3 и 0,5 г/кг массы тела – 4,0, в контрольной группе (биоспорин) – 6,2 дня.

Прирост живой массы животных в опытных группах был на 8,3 – 25,0% выше, чем в контрольной.

При производственном испытании субтилбена на 234 больных телятах 4-х неблагополучных по колибактериозу хозяйств районов республиканского подчинения РТ терапевтическая эффективность препарата в комплексе с организационно-хозяйственными и ветеринарно-санитарными мероприятиями составила 92,0%.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что субтилбен при колибактериозе телят обладает высоким лечебным эффектом. Препарат в дозе 0,3 – 0,5 г/кг массы тела при введении 2 раза в день обеспечивает выздоровление 92,0% телят.

Экономическая эффективность субтилбена в расчете на 1 сомони затрат при лечении колибактериоза телят составила 1,9 сомони, что больше в 2 раза, чем соответствующий показатель биоспорина.

Определение суммарного индекса показало, что при терапии колибактериоза телят субтилбен эффективнее препарата-аналога в 2 раза.

Таким образом, установлена высокая лечебная и экономическая эффективность субтилбена при колибактериозе телят.

ВЫВОДЫ

1. Изучение морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных свойств, патогенности и антимикробной активности штаммов BS TJ 09, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26 показало, что на их основе возможно создание пробиотического препарата.

2. Штаммы BS TJ 09, BS TJ Д 24, BS TJ Д 26 непатогенны для лабораторных и сельскохозяйственных животных и проявляют высокую противобактериальную активность (3,9 – 15,6 млн м.к./мл) в отношении патогенной *E. coli*.

3. Субтилбен обладает высокой бактериостатической (МПК для *E. coli* и *S. dublin* – 7,8 млн м.к./мл, *P. multocida* и *Pr. vulgaris* – 15,6 млн м.к./мл) и бактерицидной активностью (МБцК – соответственно 15,6; 31,2 млн м.к./мл).

4. Изменение морфологии *E. coli* начинается спустя 6 ч, а через 48 ч после контакта с субтилбеном лизис тест-бактерий заканчивается. Препарат проявляет одинаковую антагонистическую активность в отношении различных серотипов *E. coli*

5. Субтилбен относится к категории малотоксичных препаратов и не оказывает местного раздражающего и аллергенного действий.

6. Отработаны технология изготовления субтилбена в условиях Республики Таджикистан преимущественно на основе местного сырья и методы контроля препарата.

7. Методами «ускоренного старения» при повышенных температурах и естественного хранения определена стабильность физико-химических и биологических свойств субтилбена, срок хранения которого в сухом, хорошо проветриваемом, защищенном от света и атмосферных осадков месте, при температуре не выше 30°C – 2 года.

8. Наилучший терапевтический эффект достигается при пероральном введении субтилбена больным колибактериозом телятам в дозе 0,3 – 0,5 г/кг массы тела 2 раза в сутки до выздоровления; с профилактической целью препарат применяют перорально в такой же дозе один раз в сутки в течение 10 дней. Результаты производственных испытаний субтилбена при колибактериозах показали, что его профилактическая эффективность составляет 95,5 – 96,0%, лечебная – 92,0%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Инструкция по изготовлению и контролю иммунобиотика субтилбен для профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных болезней животных и пчел (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.).

2. Технические условия на иммунобиотик субтилбен (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.).

3. Наставление по применению иммунобиотика субтилбен для профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных болезней животных и пчел (утв. ГУВ МСХ РТ 25.11.2004 г.).

4. Решение 26-го заседания Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ от 24.11.2004 г. (Душанбе) о практическом использовании препарата субтилбен в ветеринарной практике СНГ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. The bactericidal activity of eubiotic – Subtilben in trials in vitro / Sattorov I., Djumanculov H., Machmudov K., Rachmatjonov M., Kalandarov S. // X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology. – Parma, 2001. – P. 186.

2. Сатторов И. Т. Применение иммунобиотика субтилбен при лечении диареи у телят / Сатторов И. Т., Каландаров З. // Биолого-экологич. пробл. зараз. болез. дик. жив. и их роль в патол. с.-х. жив. и людей: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2002. – С. 353. – 354.

3. Сатторов И. Т. Динамика бактерицидной активности иммунобиотика субтилбен / Сатторов И. Т., Каландаров З., Турдиев Ш. А. // Биолого-экологич. пробл. зараз. болез. дик. жив. и их роль в патол. с.-х. жив. и людей: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2002. – С. 353.

4. Сатторов И. Т. Антимикробная активность иммунобиотика «Субтилбен» / Сатторов И. Т., Саидов Ш., Каландаров З., Сафаров Н., Салимов Т. // Птицеводство: Матер. IV Укр. конф. по птицевод. с междунар. участием. – Харьков, 2003. – Вып. 53. – С. 625 – 626.

5. Способ получения биопрепарата на основе *B. subtilis* / Джуманкулов Х. Д., Сангинов Б. С., Сатторов И. Т., Махмудов К. Б., Каландаров З. // Актуал. пробл. болез. жив. в соврем. усл.: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Душанбе, 2003. – С. 165 – 166.

6. Каландаров З. Новое средство для лечения диареи телят / Каландаров З. // Мониторинг распротр. и предотвращения особо опас. болез. жив.: матер. II Междунар. науч. конф. – Самарканд, 2004. – С. 85 – 86.

7. Пат. ТД 391 Республика Таджикистан, 7 С 12 N 1/20, А 61 К 35/74. Лечебно-профилактический препарат субтилбен / Сатторов И. Т., Джуманкулов Х. Д., Сангинов Б. С., Султонова М. Х., Каландаров З., Саидов Ш.; заявитель и патентообладатель – Сатторов И. Т.; заявл. 18.07.2003; опубл. 2004, Бюл. №35. – С. 12 – 13.

8. Пат. ТД 390 Республика Таджикистан, МИК 7 А 01 N 63/00, С 12 N 1/20. Способ получения лечебно-профилактического препарата субтилбен / Сатторов И. Т., Джуманкулов Х. Д., Сангинов Б. С., Султонова М. Х., Махмудов К. Б., Турдиев Ш., Каландаров З., Саидов Ш., Носиров С.; заявитель и патентообладатель – Сатторов И. Т.; заявл. 18.07.2003; опубл. 2005, Бюл. №38. – С. 4 – 5.

Сдано в набор 19.07.2006 г. Подп. к печ. 26.07.2006 г. Формат бум. 60×84¹/₁₆.

Зак. 116. Тираж 100 экз. Объем 1¹/₄ п. л.

Гарнитура Times New Roman.

Типография Таджикского аграрного университета.

Душанбе, пр. Рудаки, 146.

