

На правах рукописи



003473715

Ольховик Оксана Петровна

КЛЕБСИЕЛЛЁЗ БРОЙЛЕРОВ

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

АВТОРЕФЕРАТ

*диссертации на соискания учёной степени
кандидата ветеринарных наук*

1 8 ИЮН 2009

Краснодар – 2009

Работа выполнена в Краснодарском научно-исследовательском ветеринарном институте Россельхозакадемии.

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук,
Басова Н.Ю.

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук,
профессор, академик РАЕ
лауреат гос. премии РФ
Шевченко А.А.
кандидат ветеринарных
наук, заслуженный вет.
врач РФ
Васильев В.Ф.

Ведущая организация:

Воронежский государственный
аграрный университет
им. К.Д. Глинки

Защита состоится 1 июля 2009 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.038.07 при Кубанском государственном аграрном университете (350044, Краснодар, ул. Калинина, 13).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кубанского государственного аграрного университета.

Автореферат разослан 29 июля 2009 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор ветеринарных наук, профессор

Родин И.А.

1. Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. В настоящее время серьезной проблемой промышленного птицеводства являются заболевания бактериальной этиологии, вызываемые ассоциациями патогенных и условно-патогенных бактерий.

Ассоциированные бактериальные болезни наносят огромный экономический ущерб птицеводческим хозяйствам в связи с широким распространением, сложностью клинической и лабораторной диагностики, отсутствием средств специфической профилактики и терапии (Еростова Е.И., Киселева Б.С. (1985), Смоленская А.З. (1985); Никулинова Т.С. (1992), Кузнецова Л.С. Воронин Е.С. (1994); Шншков В.П., Ставцева Л.Я. (2004).

Одним из ведущих агентов бактериальных ассоциаций, кроме эшерихий, стрептококков и сальмонелл, являются *Klebsiella* (Ковалева Е.П., Рейзис А.Р., 1993).

Широкое распространение *Klebsiella* в природе, их устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды, дезинфектантам, резистентность по отношению к различным группам антимикробных препаратов и высокая степень адаптации выводит этот микроорганизм на передний план в этиопатогенезе развития заболеваний, как цыплят-бройлеров так и взрослого поголовья птицы (Жданов М.В., Львов Д.К. (1984); Brook I. (1986), Walker R.I. (1986); Gutman Laurent, Williamson Russell, Moreau Nicole (1985); Williams P., Lambert P.A., Haign C.G., Brown M.I. (1986).

В литературе приведены многочисленные данные об этиологической роли микроорганизмов рода *Klebsiella* в развитии различных патологических процессов у людей и сельскохозяйственных животных, однако исследований, касающихся клебсиеллёза домашней птицы практически не встречается (Халитова В.И., и др., 1991; Флоров В.М., 1994; Красноголовец В.Н., Киселева Б.С., 1996; Бондоренко В.М., Петровская Г.В., Потатуркина-Нестерова Н.И., 1996; Черников А.А., Васильев Д.А., 1998; Шпанько Ю.Б., 2005; Deb M. et al, 1980; Frene J. et. al., 1984).

В доступной нам литературе не обнаружены сведения об эпизоотологии, этиологической структуре, патогенезе, клиническом проявлении и патологической картине клебсиеллёза птиц, в том числе бройлеров, как за рубежом, так и в России.

В связи с изложенным, весьма актуально проведение комплексных исследований по изучению этиологической структуры клебсиеллёза бройлеров, биологических свойств возбудителя и поиску препаратов, для эффективной профилактики и терапии.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы является изучение этиологической структуры клебсиеллёза бройлеров, биологических свойств клебсиелл, выделенных при заболевании цыплят бройлеров и взрослого поголовья птицы, клинического проявления и патологоанатомических изменений при экспериментальном и спонтанном инфицировании, поиск эффективных препаратов для профилактики и терапии клебсиеллёза.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- изучить этиологическую структуру, культуральные и биологические свойства клебсиелл, выделенных от бройлеров;

- изучить факторы патогенности выделенных культур, степень их резистентности и адаптации к антимикробным препаратам различных групп, устойчивость к дезинфицирующим средствам;

- определить патогенность выделенных культур клебсиелл по отношению к лабораторным животным;
- изучить клиническое проявление и патологоанатомическую картину клебсиеллёза в экспериментальных и производственных условиях;
- определить эффективность фармакопрофилактики и терапии клебсиеллёза бройлеров.

Научная новизна. Впервые изучена этиологическая структура клебсиеллеза бройлеров в Краснодарском крае, определены источники и пути распространения заболевания, биологические свойства и серологический профиль возбудителя.

Выявлены факторы патогенности возбудителя клебсиеллеза бройлеров, его резистентность и степень адаптации к антимикробным препаратам.

Впервые экспериментально воспроизведено заболевание на эмбрионах и цыплятах. Изучено клиническое и патологоанатомическое проявление клебсиеллёза бройлеров в экспериментальных и производственных условиях.

Доказана профилактическая и терапевтическая эффективность комплексных антимикробных препаратов диоксинор и польодоксин при клебсиеллёзе бройлеров.

Практическая значимость. Изучены пути распространения, степень инфицированности и этиологические особенности клебсиеллёза бройлеров. Определены основные биологические свойства и патогенность возбудителя. Изучена клиническая картина и патологоанатомические изменения, характерные для клебсиеллеза бройлеров. Предложены эффективные антимикробные препараты для фармакопрофилактики и терапии клебсиеллёза бройлеров и активные дезинфицирующие средства. Разработаны методические рекомендации «Клебсиеллез бройлеров», утвержденные Управлением Россельхознадзора по Краснодарскому краю и Республике Адыгея 20.05.2009 г.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и получили одобрение на Ученом совете Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института в 2006 – 2008 гг.; V региональной научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение агропромышленного комплекса (Краснодар, 2004) и на VII региональной научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение агропромышленного комплекса (Краснодар, 2005 гг.), по итогам которой получена почетная грамота; 1-й научно-практической конференции « Современная ветеринарная защита коров высокопродуктивных пород» (Воронеж, 2005 г.); международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию ГНУ Краснодарского НИВИ (Краснодар, 2006 г).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 5 научных работ, в том числе 1 в рецензируемом издании, рекомендуемом ВАК.

Основные положения диссертации выносимые на защиту:

- этнологическая структура и серологический профиль клебселл, выделяемых от бройлеров;
- культуральные и биологические свойства выделенных от бройлеров изолятов *Klebsiella*;
- факторы патогенности выделенных культур, степень их резистентности и адаптации к антимикробным препаратам различных групп;
- пути передачи, клиническая и патологоанатомическая картина клебселлёза бройлеров в производственных и экспериментальных условиях;
- фармакопрофилактика и терапия клебселлёза бройлеров.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице компьютерного текста, иллюстрирована 18 таблицами, 8 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов и практических предложений. Список цитированной литературы включает 201 источник, из них 136 отечественных и 65 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Материалы и методы исследования.

Работа выполнена в лаборатории терапии Краснодарского НИВИ, птицефабриках Краснодарского края: ИПС «Первомайская» Ленинградского района, «Кавказ» Динского района, «Новороссийская» г. Новороссийск. Объектом исследования служили инкубационное яйцо, эмбрионы, павшие и вынужденно убитые цыплята-бройлеры в возрасте (1-45 дней), взрослая птица, объекты внешней среды, вода.

При выполнении диссертационной работы было проведено 6 научно-производственных опытов, использовано 514 белых мышей, 54 беспородные крысы, 37880 цыплят, 360 инкубационных яиц, 90 куриных эмбрионов. В процессе работы проведено 1487 бактериологических, 257 серологических и биологических, 1285 клинических и 382 патологоанатомических исследований.

Частоту выделения клебселл от бройлеров в Краснодарском крае изучали путём анализа данных ФГУ Межобластной ветеринарной лаборатории Краснодарской и собственных исследований.

При выполнении работы было проведено 487 бактериологических исследований проб материала от птиц, 46 проб используемых кормов, 53 пробы воды и 38 проб смывов с поверхности клеток и оборудования инкубационного цеха. Из патологического материала было выделено 785 изолятов различных микроорганизмов, из них 257 изолятов *Klebsiella*.

Клинические, патологоанатомические исследования проводили по общепринятым методикам.

Бактериологические исследования проводили общепринятыми методами согласно «Методическим указаниям по диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями»(1999), «Методическим указани-

ям по диагностике колибактериоза животных и птицы» (2000), «Методическим указаниям по лабораторной диагностике стрептококкоза животных» (1990).

Из патологического материала готовили мазки-отпечатки, которые после фиксации окрашивали по Романоскому-Гимза и по Граму. Высевы из патологического материала проводили в МПБ (мясопептонный бульон), МПА (мясопептонный агар), висмут-сульфит агар, агар Эндо, кровяной агар и питательную среду «КЛЕБСИЕЛЛА 5-АСК-20».

Культуральные свойства выделенных микроорганизмов изучали в процессе их выращивания на плотных и жидких питательных средах. При этом учитывали интенсивность помутнения бульона, характер осадка, наличие или отсутствие пристеночного кольца и плёнки. Особое внимание обращали на форму, величину, структуру и консистенцию колоний.

Морфологические особенности выделенных бактерий оценивали исходя из данных микропирования мазков. Выделенные бактерии окрашивали по Граму, для обнаружения наличия капсулы - по методу Гисса.

Биохимическую активность выделенных штаммов определяли с использованием идентификационных тест-систем: пластин биохимических дифференцирующих энтеробактерий (ПБДЭ) Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Минздрава РФ, мультимикротестов для биохимической идентификации энтеробактерий (ММТ Е1 и ММТ У2) производства НПО «Аллерген» (г. Ставрополь), системы индикаторных бумажных дисков (СИБ), среды Гисса с углеводами, многоатомными спиртами и индикатором Андродэ.

Идентификацию выделенных культур осуществляли, используя официальные бактериологические справочники (Биргера М.О., 1982; Берджи, 1997), программное обеспечение для интерпретации результатов биохимического тестирования энтеробактерий на ПБДЭ

Серотипизацию выделенных изолятов *Klebsiella* проводили в РА по общепринятой методике с типоспецифическими сыворотками, изготовленными фирмой «Илья Мечников», НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Российской АМН.

Вирулентные свойства *Klebsiella* изучали на беспородных белых мышах массой тела 18-20 грамм, путём внутрибрюшинного введения оттитрованной взвеси суточной агаровой культуры *Klebsiella* на физиологическом растворе (рН – 7,2) и суточной бульонной культуры *Klebsiella*, с последующим определением LD_{50} . Повышение степени вирулентности клебсиелл в результате пассажа *in vivo* изучали на беспородных крысах массой тела 150 – 170 г.

Антилизозимную активность (АЛА) клебсиелл определяли экспресс - методом в концентрациях от 1 до 10 мкг/мл лизоцима, по методике, описанной В.Ю. Соколовым (105,18).

Для индентификации энтеротоксинов выделенных культур клебсиелл применяли тест отёка лапки белых мышей.

Оценку токсинообразования выделенных культур клебсиелл проводили методом биотестирования с использованием инфузорий рода *стилонихия*. Трёх суточный культуральный клебсиеллезный фильтрат получали с помощью стерильного фильтра «Minisart 5».

Чувствительность выделенных штаммов бактерий к антимикробным препаратам, определяли методом диффузии в агаровом геле (среда АГВ) с использованием дисков, лунок, где оценку чувствительности осуществляли по диаметру зоны ингибиции роста тест-культуры и методом серийных разведений в жидкой питательной среде, определяя минимальную подавляющую концентрацию, выраженную в мкг/мл. Плотность посевного материала составляла 1 миллиард/мл.

Адаптацию к антимикробным препаратам изучали методом 30-кратного пассирования в бульон Хоттингера с суббактериостатическими концентрациями препарата. Через каждые пять пассажей методом серийных разведений определяли чувствительность тест-культуры к антибиотикам.

Экспериментальное воспроизведение клебсиеллёза проводили в условиях лаборатории терапии Краснодарского НИВИ на 30 12-13 суточных куриных эмбрионах, кросса ROSS – 308, в трёхкратной повторности.

Экспериментальное воспроизведение клебсиеллёза проводили на 30 2-х суточных цыплятах кросса ROSS – 308, в тройной повторности, разделённых по принципу аналогов на 3 группы:

1 группа – контрольная;

2 группа – 1-я опытная, цыплята не инфицированные, но содержались вместе с заражёнными (контактная группа);

3 группа – 2-я опытная, цыплят интраназально и перорально заразили суточной бульонной культурой *K. rhinoscleromatis*, в дозе 0,5 мл.

За цыплятами велось наблюдение в течение 45 дней. Через 15, 30 и 45 дней после инфицирования проводили убой 2-х цыплят, из каждой группы, для проведения бактериологического исследования. Бактериологическому исследованию подвергали и павших в течение опыта цыплят. Посевы проводили из носовой полости, воздухоносных мешков, легких, крови сердца, паренхиматозных органов, костного и головного мозга.

Возможность инфицирования цыплят в инкубатории возбудителем, находящимся на поверхности скорлупы изучали в лаборатории терапии Краснодарского НИВИ в трехкратной повторности, для чего провели аэрозольную дезинфекцию 120 инкубационных куриных яиц, разделённых на 3 группы:

1-я группы - 40 штук яиц заражали *K. rhinoscleromatis*;

2-я группа – 40 штук яиц заражали *K. ozaenae*;

3-я группа – 40 штук яиц заражали *K. oxytoca* для чего на поверхность скорлупы наносили взвесь агаровых суточных культур *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae*, *K. oxytoca* на стерильном физиологическом растворе, pH-7,2, концентрацией 1 млрд.м.т./мл в дозе 0,15 мл. После высыхания культуральной взвеси определяли количество КОЕ на поверхности скорлупы в каждой группе методом аппликации по методике Н.Н. Клемпарской и Г.А. Шальнойвой в нашей модификации.

После заражения клебсиеллёзными культурами по 20 яиц, из каждой группы подвергали аэрозольной дезинфекции по схеме, применяемой в инкубаторах: смесью формалина с марганцовокислым калием из расчёта на 1 м³: формалина - 30мл, марганцовокислым калием – 20 гр., дистиллированной воды – 15 мл, при температуре +28 - 30⁰С, которая соответствует температуре инкубатория. Время экспозиции 30 минут. По истечении срока дезинфекции пары формалина в течение 20 минут нейтрализовали путём распыления 25%-ного раствора аммиака в количестве, равном половине использованного формалина.

Оставшиеся 20 яиц из каждой группы инкубировали в течение 30 минут при аналогичной температуре. По истечении времени дезинфекции (30 минут) на поверхности инкубационных яиц подсчитывали количество КОЕ клебсиелл, в каждой группе после аэрозольной обработки и на яйцах, не подвергшихся дезинфекции.

Бактериологические исследования воды проводили по ГОСТу 2874-73, комбикорма, смывов с оборудования.

Профилактическую эффективность химиотерапевтических препаратов определяли на базе п/ф «Кавказ» Динского района на 32000 цыплят-бройлеров суточного возраста. Препараты задавали с питьевой водой в течение 5 дней из расчета 1 мл/ литр.

Терапевтическую эффективность препаратов дюоксинор и польдоксином изучили на 5760 12-и суточных цыплятах с признаками клебсиеллёза.

Определение экономической эффективности применения препаратов проводили согласно «Методическим рекомендациям по определению общего экономического эффекта от использования результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в агропромышленном комплексе» Москва, 2007.

Математическую и биометрическую обработку полученных цифровых и экспериментальных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2000 на компьютере Пентиум 4, степень достоверности устанавливали по распределению Стьюдента.

3. Результаты исследований

3.1. Этиология клебсиеллеза бройлеров.

При исследовании 3-х птицефабрик 2 - «Кавказ», Динского района и ИПС «Первомайска» Ленинградского района были не благополучны по клебсиеллёзу.

Процент выделения клебсиелл из замерших эмбрионов колебался от 20,8% до 50,0%, от цыплят в возрасте до 30 дней - 16,6% – 50%, цыплят старше 40 дней и взрослой птице - 11,2% – 55,5% (рисунок 1). Количество положительных результатов за период исследования с 2006 по 2008 года возрастало по всем исследованным группам от 19,3% в группе цыплят 1-10 дневного возраста до 44,3% в группе птицы старше 40 дней.

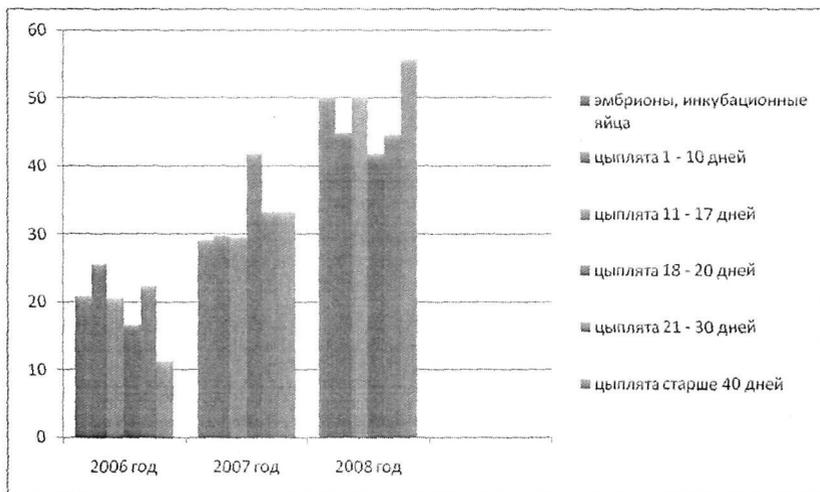


Рисунок 1 - Процент выделения Klebsiella от бройлеров в Краснодарском крае в 2006 – 2008 годах

Из эмбрионов и инкубационных яиц процент выделения возбудителя увеличился с 20,8% в 2006 г. до 50% в 2008 году; от цыплят 1 – 10 дневного возраста возрос с 25,5% до 44,8%; цыплят 11 – 17 дневного возраста – с 20,5% до 50,0%; цыплят 18 – 20 дневного возраста с 16,6% до 41,7%; цыплят 21 – 30 дневного возраста с 22,2% до 44,5%, а цыплят старше 40 дневного возраста и взрослой птицы - с 11,2% до 55,5% соответственно. Кроме клебсиелл изолировали возбудителей: *Streptococcus faecalis* - 5,1% – 16,7%, *Streptococcus avium* в 11,4% – 22,5%, *Staphylococcus* – 11,5% – 26,6%, *Proteus* – 2,6% – 18,0%. Культуры *Klebsiella* от цыплят различных возрастных групп и замерших эмбрионов были изолированы в 15,2% – 43,7% к количеству выделенной микрофлоры.

В большинстве случаев выделяли *K. rhinoscleromatis* – 13,9 – 43,7%, *K. ozaenae* изолировали только от цыплят 21 – 30 дневного возраста – 3, 1%, а *K. oxytoca* от 18 – 20 дневных цыплят - 1,3%

Процент выделения монокультур клебсиелл составлял в среднем 12,4%. В 33,7% проб клебсиеллы выделялись в ассоциации со стрептококками (*Streptococcus faecalis*, *Streptococcus* группы *D*, *Streptococcus avium*), в 43,1% - вместе со стрептококками и бактериями кишечной группы (эшерихии, протей, энтеробактеры, клебсера, шигелла), в 10,8% - в ассоциации с энтеробактериями.

При этом наибольший процент монокультур клебсиелл изолировали из замерших эмбрионов – 52,9%. С возрастом бройлеров этот показатель снижался и от птицы старше 40 дней монокультуры не изолировали.

3.2. Выделение клебсиелл из объектов внешней среды.

Основным резервуаром возбудителя клебсиеллеза на птицефабриках, не благополучных по данному заболеванию, являются поверхность клеток и питьевая вода, инфицированные выделениями больных цыплят.

Из воды распределительного водяного бачка корпуса №13 п/ф «Кавказ» Динского района количество изолированных клебсиелл составило 6390 КОЕ/мл., из nippleльных поилок - 7000 КОЕ/мл. Выделение клебсиелл из nippleльных поилок было выше, чем из распределительного бачка на 619 КОЕ/мл или 9,7%.

В смывах с поверхности клеток в корпусе №6, в котором содержались цыплята 1 – 10 дневного возраста, выделили 80500 КОЕ/мл клебсиелл, а из смывов с поверхности клеток корпуса №4, где содержались 11-18 дневные цыплята - 57000 КОЕ/мл, что в 1,5 раза меньше, чем из смывов корпуса № 6. При исследовании смывов с клеток, в которых содержались 19-20-дневные цыплята, количество выделенных клебсиелл снизилось до 15048 КОЕ/мл.

В кормах «стар», «фрост», «финиш», используемых на птицефабрике, количество клебсиелл было примерно одинаковым и составляло соответственно 220 КОЕ/гр., 130 КОЕ/гр. и 193 КОЕ/гр.

3.3. Биологическая характеристика клебсиелл, выделенных от бройлеров.

3.3.1. Морфологические, культуральные, биохимические свойства и серологический профиль клебсиелл.

Морфокультуральные и биохимические свойства 257 выделенных от птиц культур клебсиелл соответствовали видовым характеристикам.

У 77% или 197 культур регистрировали наличие фимбрий, 54,9% - образовывали слизистые колонии. Штаммы *K. rhinoscleromatis* и *K. ozaenae* формируют выпуклые, гладкие колонии S формы, а *K. oxytoca* - плоские и шероховатые - R формы.

252 культуры *K. rhinoscleromatis* (98,1%) были лактозапозитивными, все культуры *K. oxytoca* - лактозонегативными.

Все культуры клебсиелл, изолированные от бройлеров продуцировали 5-аминосалицилатдекарбоксилазу, на скошенном агаре были прозрачны в проходящем свете и имели розово-дымчатый или оранжево-дымчато-зеленоватый тип свечения, обладали высокой биохимической активностью.

При серологической типизации все 252 культуры *K. rhinoscleromatis* (100%) были отнесены к серогруппе K - 5, 75% культур *K. ozaenae* - к K - 68 и 25% - к K - 25. Культура *K. oxytoca* - к сероварианту K - 70 (таблица 1).

Таблица 1

Антигенная структура клебсиелл, выделенных от бройлеров, n=257

вид <i>Klebsiella</i>	Тип K- антигена	Положительно реагировало:	
		культур	%
<i>K. rhinoscleromatis</i>	K5	252	100,0
<i>K. ozaenae</i>	K68	3	75,0
<i>K. ozaenae</i>	K25	1	25,0
<i>K. oxytoca</i>	K70	1	100,0

Наличия двух и более типов K-антигена у изученных клебсиелл не выявили. Ферментативная активность клебсиелл различных сероваров одного вида различалась: культуры *K. ozaenae*, отнесённые к серологическому варианту K - 68, в отличие от серологического типа K - 25, отрицательно реагировали с цитратом натрия, не продуцировали лизиндекарбоксилазу и не сбраживали инозит, но активно ферментировали лактозу и сахарозу.

3.3.2. Вирулентность и факторы патогенности выделенных от бройлеров клебсиелл.

Все выделенные из инкубационных яиц, замерших эмбрионов, вынужденно убитых и павших цыплят бройлеров и взрослой птицы культуры клебсиелл патогенны для белых мышей при внутрибрюшинном введении. Заражение смывами агаровых культур вызывало гибель мышей через 18-24 часа, бульонной культуры - через 5 - 7 часов, что, по нашему мнению, свидетельствует о наличии экзотоксина

У 93,8% изолятов LD₅₀ находилась в пределах 400-600 млн. м. т./мышь, 6,2% - 200-250 млн. м. т./мышь. Слизистые культуры *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* обладающие мощной капсулой, оказались более вирулентными, чем бескапсульные и *K. oxytoca*. Бактерионосительство у зараженных мышей регистрировали в течение 18-20 дней.

Одним из факторов патогенности клебсиелл, является цитотоксичность (гемолитическая активность). 100% культур клебсиелл лизировали эритроциты барана. Из них 79 культур (30,7%) продуцировали β -гемолизины, а 178 культур (69,3%) - α -гемолизины.

Гемолитической активностью по отношению к эритроцитам кролика обладали 184 культуры или 71,5%, формируя вокруг колоний зону α -гемолиза. Не одна из изучаемых культур клебсиелл не гемолизировала эритроциты морской свинки (таблица 2)

Таблица 2

Гемолитическая активность Klebsiella, выделенных от бройлеров.

культуры	МПА+ 1% глюкоза + 5% дефибринированной крови								
	барана			кролика			морс. свинки		
	тип гемоллиза			тип гемоллиза			тип гемоллиза		
	β	α	γ	β	α	γ	β	α	γ
Σ Klebsiella n = 257	79/ 30,7	178/ 69,3	-	-	184/ 71,5	73/ 28,5	-	-	257/ 100
В том числе:									
K. rhinoscleromatis n = 252	79/ 31,3	173/ 68,7	-	-	184/ 73,0	68 27,0	-	-	252/ 100
K. ozaenae n = 4	-	4/ 100	-	-	-	4 100	-	-	4 100
K. oxytoca n = 1	-	1/ 100	-	-	-	1 100	-	-	1 100

Примечание: в числителе – количество культур; в знаменателе - % соотношения.

Способность к токсинообразованию, по мнению ряда исследователей (Бондаренко В.М. и др., 1986; Jhanjee A., Asnani P., 1982; Kahlich R. et al., 1982; Ivanof A. et al., 1983), является одним из основных факторов патогенности клебсиелл.

Экзотоксины, выявленные в тесте отека лапки, продуцировало 57,2% или 147 культур выделенных от бройлеров клебсиелл. Максимальное накопление токсинов в фильтратах культур клебсиелл отмечали на 3-5 сутки культивирования.

При выявлении токсигенности на инфузориях стилопнихиях, токсигенные свойства выявили у 64,6% или 166 культур Klebsiella, то есть 7,4% или 19 культур кроме экзотоксина продуцировали токсины других типов.

Антилизощимный признак у клебсиелл способствует подавлению фагоцитоза, а также сохранению и возможно, размножению обладающих им штаммов в фаголизосоме. 100% выделенных от птиц культур клебсиелл обладали антилизощимной активностью. Средняя величина АЛА составила $4,9 \pm 0,2$ мкг (концентрация лизощима мкг/мл).

3.3.2.1. Повышение уровня вирулентности *Klebsiella rhinoscleromatis*

При изучении повышения уровня вирулентности полевого штамма 128 п *K. rhinoscleromatis*, на беспородных лабораторных крысах, массой тела 150-170 гр. установили, что в процессе последовательных пассажей через восприимчивый организм степень вирулентности клебсиелл значительно возрастает: уже к шестому пассажу летальная доза снизилась в 4 раза: с 4 млрд м.т./голову до 1 млрд м.т./голову, при этом в 6 пассаже регистрировали гибель 88,9% крыс.

3.4. Резистентность и адаптация выделенных от бройлеров культур клебсиелл к антимикробным препаратам различных групп.

Нами изучена чувствительность 257 изолятов 3 видов клебсиелл выделенных от бройлеров: *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* и *K. oxytoca* к 24 антибактериальным препаратам различных групп фармакологических средств.

Препаратов, активных в отношении всех выделенных культур не установлено. 100% культур, выделенные из инкубационных яиц и замерших эмбрионов были чувствительны к 3 комплексным препаратам - квинололу, польодоксину и диоксигену. Культуры клебсиелл, изолированные от бройлеров 11-17 и 21-30-и дневного возраста проявили высокую резистентность к антимикробным средствам: были чувствительны только к диоксигену и польодоксину соответственно, а клебсиеллы, выделенные от цыплят 1-10-дневного возраста не были в 100% случаев чувствительны не к одному из тестируемых средств.

Препараты диоксиген, польодоксин, витроцил эффективны в отношении 75,2 – 84,8% культур.

Количество препаратов, активных в отношении антибиотикочувствительных культур клебсиелл, выделенных от цыплят различного возраста и взрослой птицы, варьировало от 5 до 9.

Степень адаптации *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* и *K. oxytoca*, выделенных от бройлеров и *K. pneumoniae*, выделенной от теленка к 7 антимикробным препаратом основных групп: тетрациклины, сульфаниламиды, нитрофураны, всех тестируемых клебсиелл достаточно велика: уже к 11 пассажу их чувствительность снизилась 2 – 128 раз. К 30 пассажу чувствительность к тетрациклину была ниже в 16 – 320 раз, норсульфазолу - в 8 – 641 раз, нитрофурану – 8 – 320 раз, клафорану – 16 – 1111 раз, абактану и неомитцину – 4 – 128 раз и ампициллину – 5 – 64 раза.

Степень адаптации зависит не только от группы антимикробных препаратов, но и от вида возбудителя.

3.5. Устойчивость клебсиелл к дезинфицирующим средствам.

При изучении *in vitro* устойчивости выделенных от бройлеров культур *K. rhinoscleromatis* к 7 дезинфицирующим средствам установили, что наиболее эффективные в отношении возбудителей были роксацин и катомин, бактерицидная концентрация которых находилась в пределах 0,008% – 0,02%, а бактериостатическая – 0,004% – 0,006%. Растворы хлорной извести и формалина ингибировали рост клебсиеллы в концентрации 0,125% а их бактерицидная активность была в пределах 0,6% или в 4,8 раз выше, чем бактериостатическая концентрация, Selko pH и септабик были менее активны, чем роксацин и катомин но более – в сравнении с формалином, хлорной известью, соляной и молочной кислотами, ингибирующая концентрация которых препаратов была, соответственно 0,125% и 0,016%, а бактерицидная – 0,5% и 0,032%.

Для изучения возможности инфицирования цыплят возбудителем, находящимся на поверхности скорлупы, провели дезинфекцию поверхностно инфицированных в дозе 0,15

млрд.м.т. *Klebsiella rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* и *K. oxytoca* инкубационных яиц парами формальдегида по применяющей в инкубаторных схеме.

Установили, что 100% дезинфекции не происходит: на поверхности сохраняется до 1,5% КОЕ *K. oxytoca*.

3.6. Клиническое проявление и патологоанатомическая картина клебсиеллёза в экспериментальных и производственных условиях.

При трансвариальном заражении эмбрионов клебсиеллой вывод цыплят на птицефабрике снижается до 54 – 60%, что на 30,2% - 37,2% ниже, чем при инкубировании не инфицированных яиц.

Количество не жизнеспособных цыплят, выведенных из инфицированных клебсиеллой яиц, погибающих в первые 4 – 5 дня жизни, увеличивается в 2 – 2,5 раза, что составляет 7 – 8%.

При экспериментальном заражении 12 – 13 дневных эмбрионов в аллантоисную полость установили снижение вывода на 26,6% и 100% гибель цыплят в первые 3-4 дня жизни. При бактериологическом исследовании павших цыплят и замерших эмбрионов опытной группы во всех случаях выделили ретрокультуру *K. rhinoscleromatis*.

От клинически здорового племенного поголовья бройлеров 25 – 36 недельного возраста, кроссов Flex и F – 15 на стационарно неблагополучной по клебсиеллезу птицефабрики возбудителя выделили из костного, головного мозга и гонад.

Клинически клебсиеллёз птиц, в производственных условиях, протекает в 2-х формах:

1 – респираторная – наблюдается у цыплят младшего возраста, с первого по 18-20 дни жизни, как правило, на 5-7 сутки. При такой форме течения клебсиеллёзной инфекции отмечается угнетение птицы, внезапная потеря аппетита, снижение прироста массы тела, затруднённое дыхание, одышка, кашель, риниты и конъюнктивиты, сопровождающиеся слезо- и слюнотечением.

При патологическом вскрытии у цыплят отмечается риниты – слизистая носовой полости гиперимирована, усеяна геморрагиями, набухшая и отёчная, студневидна вследствие инфильтрации толщи слизистой оболочки серозным экссудатом;

Регистрируются серозно-фибринозные аэросаккулиты, с начала межключичных воздухоносных мешков. Воспаление воздухоносных мешков развивается вследствие перехода на них воспалительного процесса с носоглотки.

Серозно-фибринозное воспаление сопровождается скоплением серозно-фибринозного выпота в полость межключичного воздухоносного мешка, затем воспаленные переходят на шейные мешки, поражая главный бронх, краниальные и каудальные грудные мешки, а в последствие и брюшные воздухоносные мешки. Аэросаккулиты характеризуются отложением на воспалённых стенках воздухоносных мешков серозно-фибринозного экссудата, вначале в виде едва заметного, нежного паутиноподобного налёта серо-белого или серо-желтого цвета. В дальнейшем развивается фибринозная пневмония, характеризующаяся лобарным поражением лёгких, сразу распространяясь на целую долю или несколько долей, поражая преимущественно передние отделы легкого. Культуры *K. rhinoscleromatis* при респираторной форме течения изолировали от цыплят из носовой полости, поражённых воздухоносных мешков, лёгких, из паренхиматозных органов, крови сердца, но не из головного и костного мозга.

2 – кишечная форма течения клебсиеллёза, как правило, отмечается у цыплят старше 20-ти дневного возраста, характеризующаяся поражением желудочно-кишечного тракта. При этой форме течения клебсиеллёзной инфекции отмечается усиление жажды, потеря аппетита, понос. Патологоанатомическая картина при кишечной форме характеризуется развитием геморрагическим воспалением железистого желудка, регистрируется серозно-геморрагический отёк подслизистой оболочки мышечного желудка. Выражено катаральное воспаление слизистой оболочки тонкого кишечника. Печень и почки увеличены в объёме, печень глинистой окраски. При такой форме течения клебсиеллёза от бройлеров

выделяли не только *K. rhinoscleromatis*, как при респираторной форме болезни, но и *K. ozaeuae*. Возбудителя изолировали из паренхиматозных органов, крови сердца, головного и костного мозга. Кроме клебсиелл при кишечной форме часто выделяли ассоциации эшерихий и условно-патогенных энтеробактерий.

Для подтверждения роли *K. rhinoscleromatis* провели экспериментальное воспроизведение клебсиеллёза на 30-и 2-х суточных цыплятах, разделённых по принципу аналогов на 3 группы: 1 – интактный контроль; 2 – опытная группа, инфицированная интраназально и перорально суточной бульонной культурой *K. rhinoscleromatis* в дозе 0,5 мл; 3 – контрольная, находилась на контакте с инфицированными.

Перед началом и в конце опыта провели взвешивание цыплят. Наблюдение вели в течение 10 дней, регистрировали клиническое состояние, заболевание и отход.

При экспериментальном воспроизведении клебсиеллёза путем интраназального и перорального инфицирования 2-х суточных цыплят установили, что заболеваемость инфицированных цыплят была 40%, что на 50% ниже, чем в группе, цыплята которой находились в непосредственном контакте с инфицированными. Сохранность была, соответственно 90% и 70%, что свидетельствует о наличии горизонтального пути передачи. Клинические признаки клебсиеллёза у экспериментально инфицированных цыплят соответствовали респираторной форме, проявились на 5 – 8 день после инфицирования.

При бактериологических исследованиях павших цыплят ретрокультуру *K. rhinoscleromatis* изолировали из паренхиматозных органов, крови сердца, легких и воздухоносных мешков. От бройлеров опытных групп, вынужденно убитых в 45-и дневном возрасте, клебсиеллу изолировали из головного и костного мозга, что свидетельствует о длительной персистенции возбудителя в организме птицы.

3.7. Профилактическая и терапевтическая эффективность комплексных препаратов диоксинор и польдоксиин.

Профилактическую эффективность комплексных препаратов изучали на базе птицефабрики «Кавказ», Динского района.

Для проведения опыта в корпусе клеточного содержания сформировали 3 группы цыплят – 2 опытные по 15000 голов (размещенных в 2-х батареях) и контрольная – 2000 голов.

Цыплятам опытных групп препараты задавали с питьевой водой из расчёта 1,0 мл/л воды, ежедневно, в течение 5 дней с суточного возраста.

За 5 дней наблюдения установили, что при применении польдоксиина сохранность была выше на 4,1%, заболеваемость ниже на 18,5%, среднесуточный прирост массы тела возрос на 7,24 гр. или 42,5% по сравнению с контрольной группой. При применении диоксинора эти показатели были соответственно – 4,4%, 18,8% и 8,33 гр. или 48,8% (таблица 3).

Лечебную эффективность препаратов диоксинор и польдоксиин (таблица 4) изучали в период вспышки клебсиеллёзной инфекции, на 2-х группах цыплят-бройлеров 15-и дневного возраста, подобранных по принципу аналогов, по 2880 голов в группе. Птица содержится в клеточных 4-х рядных батареях типового корпуса, водопой – nippleные поилки. В подготовительный период (14 дней) ежедневно проводили учёт сохранности. Препараты в опытном периоде задавали с питьевой водой в течение 8 дней, из расчёта 1,0 мл/л воды. После прекращения дачи препаратов наблюдение вели еще на протяжении 6 дней.

Таблица 4

Эффективность фармакотерапии при клебсиеллезе бройлеров.

№ п/п	препараты	количество голов	падёж голов / %		
			1-й период	2-й период	3-й период
			14 дней	8 дней	6 дней
1.	диоксинор	2880	82 / 2,8	41 / 1,7	27 / 0,98
2.	польодоксин	2880	81 / 2,8	64 / 2,3	32 / 1,17

Анализ полученных результатов свидетельствует, что терапевтическая эффективность применения диоксинора при клебсиеллезе бройлеров на 0,6% выше, чем польодоксина в период лечения и на 0,19% - последующие 6 дней.

Экономическая эффективность профилактического применения польодоксина – 18,9 рублей на 1 рубль затрат, диоксинора – 43,6 рублей на 1 рубль затрат.

Экономическая эффективность терапевтического применения польодоксина – 4,18 рублей на 1 рубль затрат, диоксинора – 6,3 рубля на 1 рубль затрат.

Таблица 3

Эффективность фармакопрофилактики клебсиеллеза бройлеров.

№ п/п	группы	количество цыплят в группе	препарат, доза мл/л	масса цыплят в начале опыта, г.	масса цыплят в конце опыта, г.	средн. суточ. прирост массы тела, г./ к контролю	заболело		пало		% сохранности
							цыплят	%	цыплят	%	
1.	опытная	15000	польодоксин 1,0	40,2	162	24,36/ +7,24	375	2,5	165	1,1	98,9
2.	опытная	15000	диоксинор 1,0	40,6	168	25,48/ +8,33	330	2,2	120	0,8	99,2
3.	контрольная	2000	-	40,4	126	17,12/-	420	21,0	104	5,2	94,8

4. ВЫВОДЫ

1. На неблагополучных по клебсиеллезу птицефабриках возбудитель выделяется от всех возрастных групп бройлеров, из инкубационных яиц и эмбрионов. Частота выделения зависит от возраста птицы. Из замерших эмбрионов клебсиеллу изолировали в 20,8% до 50,0% случаев, от цыплят 1- 30 -дневного возраста - 16,6% – 50%, цыплят старше 40 дней и взрослой птице - 11,2% – 55,5%. Количество положительных проб за период с 2006 по 2008 годы возросло во всех обследованных группах с 11,2 - 25,5% до 41,7 - 55,5%.

2. Основным этиологическим агентом при клебсиеллезе бройлеров является *K. rhinoscleromatis* - 98% культур от числа всех изолятов клебсиелл. Средний процент выделения *K. rhinoscleromatis* составил 13,9 – 43,7%, из эмбрионов - 30,8%, от цыплят младшего возраста – 43,7%, от взрослой птицы - 23,1%. *K. ozaenae* и *K. oxytosa* играют второстепенную роль, их изолировали в 1,6% и 0,4% случаев соответственно.

3. В среднем процент выделения монокультур клебсиелл составил 12,4%. В 33,7% проб клебсиеллы выделялись в ассоциации со стрептококками (*Streptococcus faecalis*, *Streptococcus группы D*, *Streptococcus avium*), в 43,1% - вместе со стрептококками и бактериями кишечной группы (эшерихии, протей, энтеробактеры, клебсиера, шигелла), в 10,8% - в ассоциации с энтеробактериями. С увеличением возраста бройлеров процент бактериальных ассоциаций возрастал с 47,1% из эмбрионов по 97,6% - от птицы старше 45 дней.

4. Основным резервуаром возбудителя клебсиеллеза на птицефабриках, не благополучных по данному заболеванию, являются поверхность клеток и питьевая вода, инфицированные выделениями больных цыплят. Количество клебсиелл, изолированных из воды составляло 6397 – 7000 КОЕ/мл, из смывов с поверхности клеток – 15048 - 80500 КОЕ/мл.

5. Культуры клебсиелл, выделенные от бройлеров обладали значительной вариабельностью биохимических свойств. В подавляющем большинстве случаев - 99,6% формировали колонии S – типа, 100% культур имели капсулу и активно сбраживали сахара. Все 252 культуры *K. rhinoscleromatis* (100%) относились к серогруппе K – 5, 75% культур *K. ozaenae* - к K – 68 и 25% - к K – 25. Культура *K. oxytosa* – к сероварианту K – 70.

6. Все выделенные культуры клебсиелл были вирулентными для белых мышей в дозе LD₅₀ 200 - 600 млн. м. т./мышь, 69,3% культур продуцировали α - гемолизины и 30,7% - β- гемолизины. 100% изолятов гемолизировали эритроциты барана, 71,5% кролика и ни одна культура не гемолизировала эритроциты морской свинки. 64,6% культур *Klebsiella* продуцировали токсины: 57,2% - экзотоксины, 7,4% - токсины других типов, 100% клебсиелл обладали антилизотимной активностью в концентрации 4,9 ± 0,2 мкг/мл.

7. Большинство культур клебсиелл высокорезистентны к антимикробным препаратам. Из 24 испытуемых препаратов активных в отношении всех выделенных культур не установлено. 37,5% были высоко эффективны по отношению к клебсиеллам - преимущественно комплексные соединения. Степень адаптации клебсиелл к антимикробным препаратам достаточно высока: к 30 пассажи чувствительность снизилась в 4 – 1111 раз. Наиболее эффективными дезинфицирующими средствами, при клебсиеллезе являются роксацин и катомин.

8. Клебсиеллез у бройлеров протекает в двух формах – респираторной и кишечной. Респираторная форма болезни развивается у цыплят до 18-и дневного возраста и ассоциируется с *K. rhinoscleromatis*. В старшем возрасте регистрировали кишечную форму клеб-

снеллса, при которой кроме *K. rhinoscleromatis* изолировали *K. ozaenae* в ассоциации с эшерихиями и условно-патогенными энтеробактериями.

9. Профилактическая эффективность применения препарата польдоксиин была в пределах 98,9%, диоксинон – 99,2%. Экономическая эффективность профилактического применения польдоксиина – 18,9 рублей на 1 рубль затрат, диоксинона – 43,6 рублей на 1 рубль затрат. Экономическая эффективность терапевтического применения польдоксиина – 4,18 рублей на 1 рубль затрат, диоксинона – 6,3 рубля на 1 рубль затрат.

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕЖДЛОЖЕНИЯ

Для профилактики клебсиеллза бройлеров рекомендуется проводить бактериологический контроль поступающих яиц и не допускать к инкубации, инфицированные клебсиеллой яйца из неблагополучных родительских стад.

Необходимо проведение качественной дезинфекции инкубационного яйца с последующим контролем качества дезинфекции на наличие клебсиелл, а затем бактериологических исследований замерших 18-и суточных эмбрионов с подтитровкой чувствительности выделенной микрофлоры к антимикробным препаратам.

Рекомендуется применение высокоэффективных комплексных антимикробных препаратов польдоксиин и диоксинон для профилактики клебсиеллза бройлеров в 1-5 и 28-33-дневном возрасте, с питьевой водой в дозе 0,5 -1,0 мл/л, в течение 5 дней, с лечебной целью – 1,0 мл/л в течение 5-7 дней.

На основе результатов исследований разработаны методические рекомендации «Клебсиеллез бройлеров», утвержденные Управлением Россельхознадзора по Краснодарскому краю и Республике Адыгея 20.05.2009 г.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Клебсиеллёзная инфекция телят / соавт.: Н.Ю. Басова // Материалы 1-ой научно - практической конференции «Современная ветеринарная защита коров высокопродуктивных пород». Всероссийский научно – исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии. Воронеж, 2005. – С. 7 – 8.
2. Роль клебсиеллы в развитии желудочно-кишечных и респираторных болезней телят / соавт.: Н.Ю. Басова // Материалы 7 региональной научно – практической конференции молодых учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса». Краснодар, 2005. – С. 222 – 223.
3. Видовой состав бактерий, выделяемых в хозяйствах Краснодарского края / соавт.: Н.Ю. Басова // Материалы международной научно – практической конференции, посвящённой к 60 – летию ГНУ Краснодарского НИВИ «Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях». Краснодар, 2006. – С. 188 – 189.
4. Видовой состав и чувствительность к антибиотикам бактерий, выделенных от телят с респираторными и кишечными инфекциями / О.П. Ольховик // Научный журнал «Труды Кубанского Государственного Аграрного Университета». Краснодар, 1 (16), 2009. – С. 176 – 178.
5. Клебсиеллёз птиц / Методические рекомендации, утверждённые Управлением Россельхознадзора по Краснодарскому краю и Республике Адыгея 20.05.2009 г.

Подписано к печати: 27.05.2009 г. Формат 60x84/16.

Усл. печ. л. 1,33. Уч. изд. л. 1,33. Тираж 100 экз.

Заказ № 58

ООО «Световод» Краснодар,

ул. Калинина, 126/1 корп. 57