

На правах рукописи

КОВАЛЬЧУК НАТАЛЬЯ МИХАЙЛОВНА



**ЭКОЛОГО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ
ЭШЕРИХИОЗА НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ
В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ**

**16.00.03 - Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Москва 2004

Работа выполнена в ФГОУ ВПО "Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина" и Красноярском государственном аграрном университете.

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор,
Девришов Давудай Абдулсемедович.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Сидоров Михаил Анисимович;
доктор ветеринарных наук
Малик Нина Ивановна;
доктор ветеринарных наук, профессор
Еремец Владимир Иванович.

Ведущая организация: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии.

Защита диссертации состоится 26 октября 2004 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.042.01 в Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина по адресу: 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина.

Автореферат разослан «²³...» сентября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Брылина В.Е.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Роль условно-патогенных микроорганизмов, в том числе эшерихий, в возникновении патологии у животных продолжает неуклонно возрастать. При этом острые кишечные инфекции (ОКИ) новорожденных телят остаются одной из наиболее актуальных проблем ветеринарии во всех регионах России (Воронин Е.С. и др., 1996; Девришов Д.А., 2000; Шкиль Н.А., 2001; Джупина СИ., 2001; Мищенко В.А. и др., 2002).

Болезни органов пищеварения получили широкое распространение и в животноводческих хозяйствах Сибири. Если в 70-е годы отход телят составлял здесь 2-2,5%, в 80-е годы - 4,5-5%, то к 1995 году этот показатель колебался по отдельным областям Сибири в пределах от 8,5 до 13%, достигнув в настоящее время 27%.

Исследованиями последних лет доказана первостепенная роль патогенных культур эшерихий в развитии желудочно-кишечной патологии новорожденных телят (Езерская Н.В., 1977; Сидоров М.А., 1980; Садилов В.Е., 1982; Moon H.W. et al., 1976; Raska H., 1980; Smith H.W., 1995; Бурлаков В.А. и др., 2002; Пирожков М.К., 2002; Чулков Н.В., 2004 и др.).

Разнообразные стрессовые факторы, в том числе экологические, в ранний постнатальный период приводят к нарушению функционирования системы «тимус-гипофиз-надпочечники», ответственной за поддержание иммунного гомеостаза в организме, а это сопровождается повышенной чувствительностью к инфекциям и нежизнеспособностью приплода (Кашин А.С., 2002.; Шахов А.Г., 2002, 2003). У таких животных понижены неспецифическая защитная резистентность и иммунитет к новым условиям обитания, и на фоне высокой обсемененности бактериями внешней среды, а зачастую и молозива, условно-патогенными микроорганизмами происходят их инфицирование и опережающее заселение кишечника вирусами, энтеробактериями и, как следствие, развитие диареи. Существенно возросло значение нетривиальных грамотрицательных бактерий семейства энтеробактерий, не сбраживающих сахара, в патологии животных и человека (Вейант Р. и др., 1999).

Нарушение экологического баланса в природной среде и равновесия внутри бактериальных ассоциаций у животных приводит к тсиу, что условно-патогенные микроорганизмы занимают ведущие позиции в инфекционной патологии раннего постнатального периода у телят.

Низкая эффективность лечебно-профилактических мероприятий объясняется несколькими причинами и одной из самых важных является высокая экологическая пластичность: антигенная вариабельность, изменчивость и выживаемость колибактерий во внешней среде.

В этой связи несомненный научный интерес представляют результаты сравнительного анализа качественных и количественных характеристик эшерихий, выделенных из различных экологических районов, потенциально участвующих в формировании системы «организм хозяина-внешняя среда». Необходимость подобного исследования биологических свойств возбудителя эшерихиоза связана с

тем, что они изучались разрозненно, без учета экологических факторов внешней среды.

Цель работы. Основной целью представленной работы явился мониторинг энтеропатогенных эшерихий и её синергистов, выделенных от телят из хозяйств с различной экологической нагрузкой, по основным факторам вирулентности, изучение формирования микроэкологического статуса-и некоторых факторов естественной резистентности новорожденных телят в зависимости-от экологических факторов хозяйств, а также обоснование применения местных цеолитов в роли энтеросорбентов при острых кишечных заболеваниях телят.

Задачи исследования. Для реализации поставленной цели.необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ и дать общую оценку антропогенно-экологических характеристик, влияющих-на организм новорожденных телят.

2. Изучить распространение острых кишечных инфекций у новорожденных телят, а также формирование их микроэкологического статуса в зависимости от экологических факторов хозяйств.

3. Определить видовой состав и серологический профиль этиопатогенно значимых условно-патогенных бактерий при диареях нсНоворожденных телят.

4. Разработать иммунохимический метод обнаружения эшерихий, продуцентов термостабильного энтеротоксина, и установить значение энтеротоксигенных эшерихий в патологии новорожденных телят в Сибирском регионе.

5. Дать биологическую характеристику эпизоотических штаммов эшерихий (по основным факторам вирулентности), выделенных из хозяйств с различной экологической нагрузкой.

6. Оценить возрастные показатели функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов (БАСК, ЛАСК и других факторов неспецифической резистентности) у новорожденных телят при острых кишечных инфекциях.

7. Изучить эффективность применения энтеросорбентов (цеолитов) при массовых желудочно-кишечных болезнях телят.

Научная, новизна. Дана комплексная оценка ветеринарно-экологической ситуации по антропогенной нагрузке региона. Проведено ранжирование состояния экосистемы в опорных хозяйствах по совокупности антропогенных нагрузок и оценка степени экологического риска заболеваемости эшерихиозом новорожденных телят.

Впервые в условиях Красноярского края проведен комплексный мониторинг эшерихий, выделенных у телят из различных экологических зон, по факторам вирулентности. Установлено, что при острых кишечных инфекциях (ОКИ) у сельскохозяйственных животных главной их причиной являются условно-патогенные микроорганизмы, обладающие широким спектром вирулентности (энтеротоксигенности, адгизивности, гемолитической активности, антибиотикоустойчивости и антилизоцимной активности). ОКИ возникали при

дисбалансе организма новорожденных телят с внешней средой. На этом фоне инфекционный агент, представленный разнообразными серотипами эшерихий в различных сочетаниях, является ведущим этиологическим фактором:

Установлено, что эшерихий, выделенные у телят способны подавлять, лизоцимную, бактерицидную активность сыворотки крови, что усугубляет дефицит гуморальных неспецифических факторов иммунитета. Проведена оценка неспецифической резистентности у телят с использованием лизосомально-катионного теста (ЛКТ), как интегрального показателя активности микрооцидной системы нейтрофилов при эшерихиозе телят.

Экспериментально обоснован и разработан принципиально новый подход иммунохимической индикации энтеротоксигенных эшерихий, продуцирующих термостабильный энтеротоксин (в РДП и РИФ), позволяющий проводить быструю идентификацию их продуцентов в кишечном содержимом/ молозиве и молоке. Получено авторское свидетельство на способ получения термостабильного энтеротоксина эшерихий (А.с. 1220177 СССР, МКИ С12К1/04).

Изучена профилактическая эффективность природных энтеосорбентов (цеолитов) при кишечных инфекциях у телят.

Практическая значимость. Определены основные антропогенно-экологические характеристики, влияющие на организм новорожденных телят в условиях региона. Созданная специализированная информационная база (эколого-эпизоотологическая карта) может быть использована в качестве основы для научных прогностических разработок природоохранной деятельности, для решения современных задач по устойчивому развитию региона.

Материалы диссертационной работы включены в методические рекомендации «Желудочно-кишечные болезни новорожденных телят в условиях Сибири» (утверждены на заседании подкомиссии «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока»-отделения ветеринарной-медицины СО.РАСХН. - Новосибирск, протокол № 19 от 17 июня 2004).

Разработаны иммунохимические методы обнаружения энтеротоксигенных эшерихий, продуцентов термостабильного энтеротоксина, использующиеся при идентификации энтеропатогенных эпизоотических штаммов микроорганизмов (одобрены ВАСХНИЛ. - М., 1985).

Методические рекомендации «Методы определения показателей естественной резистентности у крупного рогатого скота» позволяют врачам ветеринарных лабораторий-и практикующим ветеринарным специалистам своевременно диагностировать иммунные дефициты у новорожденных телят, а также прогнозировать их устойчивость к конфекционным заболеваниям (утверждены на заседании подкомиссии «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО РАСХН. - Новосибирск, протокол №12 от 27 августа 2003, - Красноярск -, 2004. - 70с).

Научно-технические разработки рекомендованы к внедрению в производство (подтверждено актами внедрения в хозяйствах, вете-

ринарных лабораториях и НТС Управления ветеринарии администрации Алтайского края и республики Хакасия, 2003-2004).

Предложена концептуальная модель по эколого-микробиологическому мониторингу эшерихиоза и оптимизации противозoonотических мероприятий по профилактике ЖКИ в современных условиях. Результаты проведенных исследований представляют интерес для экологов, физиологов, генетиков, микробиологов и могут быть использованы в практике ветеринарных лабораторий при идентификации нетипируемых энтеропатогенных эшерихий и других энтеропатогенных бактерий.

Материалы работы включены в учебные программы по курсу «Ветеринарная микробиология и иммунология» для студентов факультета ветеринарной медицины по специальности 310800 и используются в аграрных вузах России.

Основные итоги исследования отражены в монографии «Эколого-этиологические аспекты колибактериоза телят в условиях Средней Сибири» (Красноярск, 2004), практикуме по микробиологии «Морфология и физиология микроорганизмов» (Красноярск, 2002), методических пособиях (Красноярск, 2004) и указаниях (Красноярск, 2000-2002).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Анализ антропогенно-экологической ситуации по результатам ветеринарно-экологического мониторинга Сибирского региона.
- Изучение распространения желудочно-кишечных инфекций у новорожденных телят в условиях экологического неблагополучия.
- Формирование микрoэкологического статуса у новорожденных телят в зависимости от аутоэкологических факторов.
- Разработка иммунохимического метода идентификации энтеротоксигенных эшерихий, продуцентов термостабильного энтеротоксина.
- Особенности биологических характеристик эшерихий, выделенных из различных экологических ниш по факторам вирулентности.

Апробация работы. Основные положения диссертации рассмотрены, обсуждены и одобрены на: научных конференциях ветеринарного факультета МВА (Москва, 1982-1984), VII и VIII конференциях молодых ученых МВА (Москва, 1985, 1987), II и III зональных научно-производственных конференциях молодых ученых-специалистов «Пути повышения эффективности сельскохозяйственного производства Восточной Сибири» (Красноярск, 1987, 1989); Всесоюзной научно-технической конференции «Использование гормональных препаратов в животноводстве» (Подольск, 1991); Всесоюзной научно-технической конференции «Проблемы болезней молодняка» (Воронеж, 1991); региональной научно-технической конференции «Молодежь - аграрному производству» (Красноярск, 1991); научных конференциях профессорско-преподавательского состава КрасГАУ (Красноярск, 1993, 1995, 1997, 1998, 2003); Всероссийской научно-производственной конференции «Гигиена, ветсанитария и экология животноводства» (Чебоксары, 1994); IX, XI Международных симпо-

зиумах «Реконструкция гомеостаза» (Красноярск, 1998, 2003); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Достижения науки и техники - развитию сибирских регионов» (Красноярск, 1999); Международной научной конференции «Инфекционные и инвазионные болезни» (Казань, 2000); 7-й международной научно-практической конференции «Природные и интеллектуальные ресурсы Сибири» (Сибресурс - 7-2001) (Томск, 2001); Международной научной конференции «Достижения ветеринарной медицины - XXI веку» (Барнаул, 2002); Международной научной конференции «Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных» (Улан-Удэ, 2003); Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в образовательной сфере России» (Ульяновск, 2003); научно-практической региональной конференции «Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве, растениеводстве и экономике» (Томск, 2003); Всероссийской научно-практической конференции «Аграрная наука на рубеже веков» (Красноярск, 2003); Международной научно-практической конференции, посвященной 150-летию ветеринарной службы Оренбуржья «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии» (Оренбург, 2003); Международной научной конференции «Актуальные аспекты экологической, сравнительно-видовой, возрастной и экспериментальной морфологии» (Улан-Удэ, 2004).

Публикации. Основные научные положения, выводы и разработки диссертации изложены в 50 работах, в том числе в монографии «Эколого-этиологические аспекты колибактериоза телят в условиях Средней Сибири», практикуме, методических рекомендациях и научных изданиях (всего опубликовано 70 работ).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 350 страницах компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и практических предложений. Работа иллюстрирована 49 таблицами и 30 рисунками. Список литературы включает 398 источников, в том числе 170 работ зарубежных авторов

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая работа выполнялась с 1982 по 2004 г. на кафедре эпизоотологии, микробиологии, вирусологии и ВСЭ Красноярского государственного аграрного университета, кафедре болезней молодняка и НИЛ инфекционной патологии и биотехнологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина, на государственных ветеринарных учреждениях и сельскохозяйственных предприятиях Красноярского края, республики Хакасия и Московской области. Работа проводилась в соответствии с планом научно-исследовательской работы и является частью комплексных исследований в рамках программ фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития АПК в 1996-2004 гг., одобренных

общим собранием СО РАСХН «Сельскохозяйственные животные в экстремальных условиях среды».

В работе проанализирован и обобщен статистический материал Красноярского краевого управления ветеринарии, Хакасского республиканского управления ветеринарии, банка данных Красноярского центра по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды с региональными функциями, государственных экологических комитетов края. Аналитические исследования проводились на основе системного подхода к проведению ветеринарно-экологического мониторинга экотоксикантов по единой схеме: почва (вода)-корма-животное (мать)-плацента-плод-приплод в период с 1996 по 2002 г.

Влияние факторов экологического риска на тенденцию динамики эпизоотического процесса при эшерихиозе новорожденных телят изучали поэтапно с учетом опыта системных подходов пространственного анализа окружающей среды (Сочава В.Б., 1978; Хлебович И.А., 2000, 2001, 2003; Кашин А.С., 2002, 2003). Методика экологических исследований базировалась на проведении интегральной оценки экологических ситуаций в регионе с использованием показателей интенсивности антропогенной нагрузки.

Объектом исследования служили новорожденные телята 1-15-дневного возраста, источники воды открытых водоемов хозяйственно-питьевого назначения, предметы ухода за телятами, корма, молоко и молозиво от коров, принадлежащие хозяйствам Сухобузимского, Емельяновского, Березовского, Канского, Курагинского и других районов Красноярского края, а также Орджоникидзевского района Республики Хакасия и Московской области.

Предметом исследования служили образцы фекальных проб от больных животных, а также трупы павших животных. Отбор, упаковка проб кормов, воды, молока, молозива, биоматериалов и их первичная обработка проведены в соответствии с методическими рекомендациями И.Н. Блохиной, Е.С. Воронина и др. (1990). Исследованы 1462 трупа телят, 2800 проб фекалий от больных и здоровых телят до 15-дневного возраста, 200 проб от поросат, 500 трупов цыплят, кроме этого исследовано 1700 глубоководных коров. В процессе работы использованы 30 кроликов массой 2,5-3кг, 2000 мышат-сосунков, 1500 беспородных белых мышей (массой 12-14 *).

С целью установления роли эшерихий в этиологии острых кишечных заболеваний проводились 289 полных бактериологических исследований различных биоматериалов. Были также исследованы пробы молозива от матерей для изучения распространенности колиформных маститов и их взаимосвязи с энтеритами новорожденных телят с целью последующей идентификации условно-патогенной микрофлоры.

Изучали морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные и токсигенные свойства эшерихий, изолированных культур Энтеротоксигенность эшерихий изучали по методике

Н.И. Романенковой с соавт. (1980), а также с помощью иммунохимических методов исследования, предложенного нами (РДП, РИФ).

Всего в ходе работы идентифицировано более 1000 культур микроорганизмов, которые по морфологическим и культуральным признакам относились к семейству Enterobacteriaceae в соответствии с методическими рекомендациями И.Н. Блохиной, Е.С. Воронина и др. (1990), использованы также официальные бактериологические определители Д. Берджи (1997).

Изучен комплекс биологических признаков у 361 штамма эшерихий, выделенных в экологически неблагоприятных районах (ЭНР) из следующих источников: 60 и 30 культур соответственно из воды открытых водоемов (ВОВ) и источников хозяйственно-питьевого назначения (ХПВ), 45 - из фекальных проб клинически здоровых телят (КЗТ), 20 - из предметов ухода за телятами (ПУТ), 73 - от телят с признаками диареи (КБТ), 133 культуры - из патматериала павших телят (КПМ), а также у 93 штаммов эшерихий, выделенных в экологически благополучных районах (ЭБР): 15 и 10 культур соответственно - из ВОВ и источников ХПВ, 15 изолятов - из ПУТ, 10 и 23 штамма соответственно - от здоровых телят (КЗТ) и телят с признаками диареи и больных эшерихиозами (КБТ) и 20 культур - из патматериала павших телят.

Для оценки антилизоцимной активности эшерихий и выраженности персистентных характеристик использовали метод О.В. Бухарина, Б.Я. Усвятцова (1986).

Для изучения микрoэкологического статуса новорожденных телят и определения динамики формирования микробиоценозов ротоглотки и кишечника проводили исследование количественного и качественного состава микроорганизмов (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1997).

Наличие адгезивной активности у эпизоотических штаммов эшерихий, выделенных из различных источников, изучали с антиадгезивными агглютинирующими сыворотками, а также по методике В.И. Брилис, Т.А. Брилине (1985) в нашей модификации. Была также изучена и их гемолитическая активность.

Вирулентные свойства выделенных от животных штаммов определяли титрованием на белых мышах массой 18-20 г путем внутрибрюшинного инфицирования их кратными дозами 12-18-часовой бульонной культуры в дозе 0,5 мл, на лигированной петле кишечника кролика, а также путем экспериментального инфицирования безмолозивных 3-дневных телят. В работе использованы 30 кроликов массой 2,5-3 кг, 2500 мышат-сосунков, 3000 белых мышей массой 15-20 г. Антибиотикоустойчивость выделенной микрофлоры изучена методом бумажных дисков.

Для изучения влияния состояния здоровья коров-матерей на уровень резистентности и заболеваемости новорожденных телят в экологически благополучных хозяйствах с энзоотическим проявлением эшерихиоза проводили комплекс эпизоотологических ис-

следований. Клиническое состояние исследуемых животных проводили по общепринятым методикам (Кондрахин И.П. и др., 1985). -

При оценке факторов естественной резистентности у животных определяли бактерицидную активность сыворотки крови и функциональную активность фагоцитов периферической крови. Использовали также лизосомально-катионный тест (ЛКТ) для цитохимического выявления в нейтрофильных гранулоцитах ферментных и неферментных катионных белков (Пигоревский В.Е., 1979, Смирнов П.Н., 1989).

При разработке иммунохимического метода исследования использовали энтеротоксигенные штаммы эшерихий: *E. coli* P16 (09K9) - продуцент ТС-энтеротоксина; *E. coli* H1012 (09) - продуцент термостабильного энтеротоксина; *E. coli* P99 (141:K88ав, K88авH4) - продуцент ТС и ТЛ-энтеротоксинов; *E. coli* 10407 (O78:H11) - продуцент ТЛ-энтеротоксина. В контрольных исследованиях использовали 5 культур *E. coli* следующих серогрупп: 09; 0141; 0149; 0139, не продуцирующих энтеротоксины.

Токсинсодержащий материал получали при выращивании эталонных штаммов эшерихий методом шуттелирования колб с питательной средой при 300 об/мин в течение 24 часов в целлофановом мешке по нашему методу при активной аэрации (воздух подавали в среду через два стерилизующих фильтра и барбетер) в течение 24-48 часов и стационарно - в колбах в течение 24 часов. Выращивание энтеротоксигенных культур проводили на следующих питательных средах: Р. Лаллиера (1980), Р.А. Финкильштейна (1976), бульоне Хоттингера.

Для получения фильтратов, содержащих термостабильный энтеротоксин, микробную массу из бактериальной культуры отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 минут. Полученную надосадочную жидкость фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,25 мкм. После этого фильтраты концентрировали высушиванием под вытяжной вентиляцией. Концентрацию белка в исследуемых фильтратах определяли на спектрофотометре СФ-16 по методу Лоури.

Биологическую активность ТС-энтеротоксина в супернатантах изучали по методике Н.И. Романенковой (1980) на мышатах-сосунках, в тесте лигированной петли кишечника кролика по М. De et. al. (1953) и PF-активность термостабильного энтеротоксина по методу I. Graig (1965).

Очистку ТС-энтеротоксина из токсинсодержащего материала проводили методом гельфильтрации по методу R. Lallier et. al. (1980) на биогеле Р-2 (фирмы Bio Rad Laboratories, 1980). Гомогенность ТС-энтеротоксина изучали диск-электрофорезом как в кислой, так и в щелочной среде в 15% полиакриламидном геле (ПААГ), испол1 уя реактивы и установку для электрофореза «Ренал» ВНР по методу Г. Маурера (1971). Некоторые физико-химические свойства гомогенного ТС-энтеротоксина изучали нагреванием (при 37, 100, 110 С) в течение 10, 30, 60 мин, влияние различных концентраций водородных ионов (рН от 1 до 11) - с помощью 0.02М HCl и 0.02М NaOH. Кроме того, испытывали действие протеолитических ферментов (трипсина,

пепсина, сычужного фермента) в 0,2% концентрации на биологическую активность очищенного термостабильного энтеротоксина.

Антисыворотку к термостабильному энтеротоксину эшерихий получали путем гипериммунизации кроликов по методике R. Lallier et al (1980), R. Gianella et. al. (1981), A. Takagaki et. al. (1980) в сочетании с различными адьювантами. По первым двум схемам кроликам внутримышечно вводили антиген в количестве 1,5 мг за одну инъекцию. По третьей схеме антиген вводили в дозе 400, 500 мкг в шкиши передних и задних лап. Все животные, подвергшиеся иммунизации, предварительно были проверены на отсутствие нормальных антител в сыворотке их крови к энтеротоксинам эшерихий.

Динамику антителообразования, активность и специфичность сывороток исследовали в РДП по методу Оухтерлони (Э. Бем, 1979), иммуноэлектрофореза - по методу Х.Ф. Фримель (1979) и в РИФ непрямым варианте.

При изучении специфичности полученных антисывороток в качестве гетерологических культур применяли: *E. coli* патогенных для телят и поросят 09, 0141, 0147, 0149, 0139, не являющихся продуцентами энтеротоксинов; *E. coli* P99 - продуцент термолабильного энтеротоксина; *Kl. pneumoniae* (API) - продуцент ТЛ-энтеротоксина; *Aer. Hydrophila* (190a) - продуцент термолабильного энтеротоксина; *Staph. aureus* RFI-243, RFI-722, RFI-137, 493, 494 и 326 - продуценты энтеротоксинов А, В, С₁, С₂, Д и Е типов; *Salm. typhimurium* и *Salm. enteritidis* (64/69), продуцирующих ТС-энтеротоксин; *Kl. perfringens* (8239) - продуцент энтеротоксина типа А.

Производственные серии опытов по изучению лечебно-профилактической эффективности природных энтеросорбентов - цеолитов проводили при спонтанном и экспериментальном эшерихиозе раздельно и в сочетании с пробиотиками с учетом научно обоснованного механизма их действия (Беляков Н.А., 1991). На основании проведенной работы сформулирована концептуальная модель по эколого-микробиологическому мониторингу эшерихиоза и оптимизации противоэпизоотических мероприятий.

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента на персональном компьютере PENTIUM-III с помощью пакета программ Statgraf.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Мониторинг антропогенно-экологических характеристик, влияющих на новорожденных телят в условиях Красноярского края. Здоровье животных, и особенно в ранний постнатальный период, является одним из наиболее чувствительных интегральных показателей, характеризующих среду обитания и, в том числе, степень её антропогенного загрязнения.

Агропромышленный комплекс Красноярского края - крупнейший в Центральной и Восточной Сибири. Антропогенное загрязнение края достигло критических отметок, что является следствием размещения на территории около 12759 источников выбросов, относящихся к 23 министерствам и ведомствам. При этом установлено, что наиболее

опасными, с точки зрения здоровья животных, являются топливно-энергетическая, машиностроительная, металлургическая, химическая, горнодобывающая, лесоперерабатывающая, фармакологическая промышленности, ядерно-промышленный комплекс и другие. В регионе выбрасывается ежегодно от 2832,4 до 3509,9 тыс. тонн загрязняющих веществ, из них 1-го и 2-го класса опасности - до 50%, среди которых наибольшее значение имеют фтористые соединения, соединения тяжелых металлов, отходы фармакологической промышленности. Зарегистрировано свыше 10 ПДК по взвешенным веществам и формальдегиду, фенолу, бенз(а)пирену, сероуглероду, до 6 ПДК - по фтору, 2-2,5 ПДК - по свинцу и др. Характерной особенностью, характеризующей экологическую ситуацию как чрезвычайно неблагоприятную для животных и человека, является то, что одновременно с крайне высоким уровнем техногенного загрязнения регион подвергается радиоактивному загрязнению с мозаичной структурой гамма-поля. Экологическая опасность высоких концентраций химических поллютантов в компонентах окружающей среды обусловлена их последующим попаданием в почву, воду, растения и далее по трофической цепочке в корма и организм животных, что приводит к развитию органопатологий у животных, в том числе внутриутробных уродств, мертворожденности.

При проведении интегральной оценки экологических ситуаций в регионе использовали показатели интенсивности антропогенной нагрузки, так как неблагоприятные экологические ситуации создаются и обуславливаются именно антропогенной нагрузкой.

В связи с возникшей экологической ситуацией во многих районах края наблюдается массовая заболеваемость и гибель новорожденных телят. Установлено, что высокая заболеваемость животных и детей в районах с напряженной экологической ситуацией в среднем в 3 раза выше/чем в относительно чистых районах. Динамика гибели новорожденных телят в регионе представлена на рис. 1.

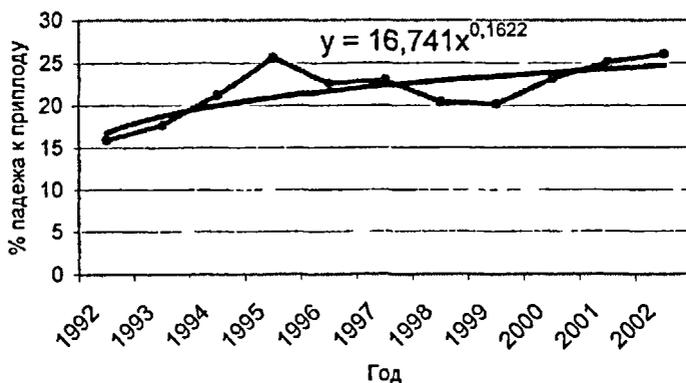


Рис. 1. Динамика падежа новорожденных телят в регионе

При экологической дезадаптации сужается диапазон функциональных приспособительных реакций иммунной системы, благодаря чему создаются условия для проявления ранее скрытых врожденных пороков и вирусно-бактериальных инфекций. Вмешиваясь в регуляторные процессы важных систем жизнеобеспечения, таких как нервная, эндокринная и иммунная системы, поступающие в организм ксенобиотики вызывают широкий спектр функциональных нарушений.

В районах с напряженной эколого-антропогенной обстановкой усиливается хроническое трансплацентарное повреждение приоритетными экотоксикантами плода в системе «мать-плацента-плод-приплод». Наиболее характерным действием на плод является воздействие приоритетных экотоксикантов (свинец, фтор, ртуть, никель, хром, мышьяк и др.) в сочетании с другими токсикантами. При дополнительном воздействии стрессов (неблагоприятные условия микроклимата в помещениях, дисбаланс и дефицит микро- и макроэлементов в кормах и др.) усиливаются предпосылки повреждающего эффекта жизненно важных регуляторных и энергетических систем и клеток в организме новорожденных телят. При этом согласно современным представлениям о стрессовой реакции организма животных в патогенезе эколого-адаптационного стресс-синдрома большое место занимает расстройство нейрогуморальной регуляции. Многократное поступление в организм даже малых доз факторов малой интенсивности, обладающих способностью к аккумуляции, приводит при дополнительном стрессовом воздействиях (инфекционные агенты, неполноценное кормление) к угнетению функционирования системы «тимус-гипофиз-надпочечники», ответственной за поддержание иммунного гомеостаза, что сопровождается развитием желудочно-кишечных заболеваний с высокой гибелью животных.

Проведено ранжирование состояния экосистемы в опорных хозяйствах в регионе. Для анализа среды обитания животных предлагается модель, которая позволяет сконцентрировать внимание на объективных и главных элементах внешней среды, их взаимосвязи с состоянием здоровья новорожденных животных и чувствительностью к кишечным инфекциям. Модель можно условно разделить на следующие составные части: историко-географическую, производственно-экономическую и эколого-эпизоотологическую.

Изучение экологических особенностей территории важно, на наш взгляд, ещё и потому, что в последние годы в инфекционной патологии отмечена важная особенность активизации условно-патогенной микрофлоры и увеличение её роли в возникновении инфекционных болезней, что затрудняет постановку диагноза и проведение противоэпизоотических мероприятий. Важно отметить, что в эпизоотологии колибактериоза на фермах необходимо признать нарушение экологической системы, животноводства и агробиоценоза в регионе. Анализируя представленные показатели накопления приоритетных экотоксикантов в биоматериалах у коров-

матерей и новорожденных телят из экологически неблагоприятных хозяйств, установлено, что их накопление в организме животных в 4-20 раз выше, чем в благополучных хозяйствах.

На основе суммарных антропогенных нагрузок составлена эколого-эпизоотологическая карта, в которой представлены эпизоотические очаги, отражающие эпизоотологическое неблагоприятие новорожденных телят по эшерихиозу. На наш взгляд, эколого-эпизоотологическое картографирование должно рассматриваться в качестве основного инструмента пространственного анализа территориальных комплексов. Именно территориальным структурам агробиоценозов свойственны региональные совокупности географических предпосылок различных болезней животных. Карта не только пассивно регистрирует и отражает явления, но и в высокой степени способствует выявлению разного порядка закономерностей в размещении сочетаний и соответствий пространственно выраженных явлений.

3.2. Распространение острых кишечных инфекций среди новорожденных-телят. Представлен современный концептуальный подход к проблеме факторности желудочно-кишечных инфекций новорожденных телят, объединяющий средовые и микробные факторы. При факторных инфекциях новорожденных животных взаимоотношения «возбудитель-хозяин» происходят по схеме, отражающей статистические закономерности причинно-следственных отношений факторно-инфекционного характера: неблагоприятные условия и факторы —> нарушение физиологических механизмов регуляции гомеостаза —> снижение факторов естественной резистентности организма -> патогенетическое действие эфффектора «возбудителя» —> клинические признаки и поражения.

Представлено соотношение биоценологических (экологических и этиологических) факторов в возникновении желудочно-кишечных болезней новорожденных телят в Сибирском регионе. При этом установлено, что в зависимости от загрязнения почвы и кормов в хозяйствах наблюдается прямая корреляция заболеваемости и гибели новорожденных телят. Установленная зависимость указывает на существенную разницу экологической нагрузки на животных, которая напрямую коррелирует с уровнем комбинированной нагрузки и заболеваемостью новорожденных телят острыми кишечными инфекциями.

Изучена патогенетическая взаимосвязь субклинических маститов у коров в молозивный период с заболеваемостью новорожденных телят острыми кишечными инфекциями. Исследования морфологического, биохимического, иммунобиологического статуса глубоководных коров (9 месяцев стельности) в стойловый период позволили установить, что у животных, больных субклиническими маститами, отмечено низкое содержание гемоглобина ($94,02 \pm 1,32$ г/л), эритроцитов ($5,68 \pm 0,94 \times 10^{12}/л$). Одновременно отмечали РЭИ-трофилию со сдвигом ядра влево и эозинопению ($1,25 \pm 0,35$), снижение гематокритного числа ($27,26 \pm 1,27$). Обращает на себя вни-

мание низкий уровень неспецифической резистентности у больных коров. Бактерицидная активность сыворотки крови составляла всего ($20,98 \pm 2,38\%$), лизоцимная активность ($2,39 \pm 0,15$ мкг/мл), фагоцитарная активность лейкоцитов ($26,25 \pm 6,12\%$). Подобная картина характеризует протекание беременности как крайне неблагоприятное, поскольку стрессовому воздействию подвержена не только мать, но и плод (гипоксия, метаболический ацидоз, гипотрофия). Кроме того, упомянутые отклонения могут свидетельствовать о возможном развитии различных осложнений послеродового периода. От больных коров телята рождались с дефицитом массы тела $\pm 2,5$ кг, а также низкими иммунобиологическими показателями.

Телята, полученные от коров с субклиническим маститом, также имеют ряд клинических, функциональных и гематологических отклонений, свидетельствующих о слабой жизнеспособности плода. При осмотре новорожденных телят и наблюдении за ними установили низкую упитанность, слабую двигательную активность и аппетит, наличие красной каймы на деснах под аркадой резцов, сухость и низкий тургор кожи, легкое западание глазных яблук. Ректальная температура находилась в пределах $38,6-39,0^\circ\text{C}$, частота пульса 108-120 ударов в мин., дыхания - 45-50 движений.

Изучение показателей крови показало, что у телят, полученных от больных коров-матерей, присутствуют легкая дегидратация, ацидоз, нарушение минерального обмена, о чем свидетельствует повышенное гематокритное число, увеличение количества гемоглобина ($112,32 \pm 3,27$ г/л), эритроцитов ($7,22 \pm 1,02 \times 10^{12}$ /л). Показатели неспецифической резистентности свидетельствуют о низкой адаптационной способности новорожденных к условиям внешней среды. Уровень лизоцима в сыворотке крови составлял $2,82 \pm 0,43$ мкг/мл, а фагоцитарная активность лейкоцитов - $2,5 \pm 2,63\%$, что в 2-6 раз ниже, чем у телят, полученных от здоровых коров. На фоне данных изменений у исследуемых телят четко просматриваются нарушения в микрoэкологической системе кишечника, становление которой тесно связано с функциональной активностью пищеварительной системы новорожденных телят, а также санитарным благополучием родильных отделений и профилакториев.

В результате проведенных бактериологических исследований секрета вымени от больных коров выделены следующие виды микробов: *Str. pyogenes*, *Str. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*. Выделенные штаммы эшерихий от коров при маститах и от телят при энтероколитах отнесены к серотипам 0115 (3%), 026 (2%), остальные штаммы специфическими О-количесыворотками не типировались. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что молозиво от больных коров субклинической формой мастита, загрязненное энтеротоксигенными эшерихиями в ассоциации с другими колиформными бактериями, опасно для новорожденных телят. Оно вызывает у них диарею и приводит к летальному исходу.

Формирование микрoэкологического статуса у новорожденных

телят в зависимости от аутоэкологических факторов хозяйств.

Анализ динамики формирования микробиоценозов у новорожденных телят в зависимости от экологических условий хозяйства показал, что характерной особенностью для становления микрофлоры было расселение отдельных видов микроорганизмов по определенным биотопам с первых дней жизни животных. Динамика контаминации организма новорожденных телят условно-патогенной микрофлорой зависела от условий содержания животных и в целом отражала экологическое благополучие хозяйств.

Так, в хозяйствах, относящихся к экологически неблагоприятным районам (ЭНР), со слизистой ротоглотки часто и в значительных количествах удавалось изолировать эшерихии ($32,0 \pm 0,8\%$ и $3,5 \pm 0,1$ lg КОЕ/т) и альфастрептококки ($68,0 \pm 0,8\%$ и $3,8 \pm 0,1$ lg КОЕ/т), тогда как лактобактерии составили $12,0 \pm 0,1\%$ и $1,8 \pm 0,2$ lg КОЕ/т.

Кроме того, в первые сутки выделялись и другие условно-патогенные микроорганизмы. *Staphylococcus aureus* ($10,0 \pm 0,3\%$ и $3,0 \pm 0,3$ lg КОЕ/т), протей ($1,5 \pm 0,4\%$ и $2,0 \pm 0,1$ lg КОЕ/т), *Enterococcus faecalis* ($35,0 \pm 0,6\%$ и $3,0 \pm 0,3$ lg КОЕ/т). Интенсивность колонизации последними свидетельствует о недостаточной колонизационной резистентности ротоглотки.

При анализе динамики микробиоценоза ротоглотки телят из ЭБР следует отметить, что в первые сутки уровни условно-патогенных микроорганизмов были существенно ниже. Так, *E. coli* удавалось изолировать у $5,0 \pm 0,1\%$ и $2,4 \pm 0,2$ lg КОЕ/т, тогда как лактобактерии составили $20,0 \pm 0,3\%$ и $3,2 \pm 0,1$ lg КОЕ/т, негемолитические стрептококки - $35,0 \pm 0,5\%$ и $3,8 \pm 0,1$ lg КОЕ/т. Принимая во внимание активную роль стрептококков в интерференции с условно-патогенными видами, наблюдаемое явление можно рассматривать как положительное.

Нами установлено, что в условиях экологического неблагоприятия у новорожденных телят увеличивается число бактерий в ротоглотке. В ротовой полости микроорганизмы встречаются более благоприятные условия, чем в окружающей среде. Однако безграничному накоплению микробов препятствуют факторы защиты - лизоцим, ингибиторы слюны, фагоцитоз, адсорбция микробов на поверхности слизистой оболочки.

Действие этих факторов приводит к непрерывному уничтожению микрофлоры полости рта, благодаря чему поддерживается здоровое состояние слизистых оболочек и не развивается инфекционный процесс.

Учитывая неравномерность расселения бактерий по экотопам у новорожденных телят, изучение становления микробиоценоза кишечника проводили также в хозяйствах с различной экологической нагрузкой из ЭБР и ЭНР (рис. 2, 3). В течение первых суток жизни у новорожденных телят кишечник оставался стерильным только у 1% телят, у остальных микрофлора содержимого кишечника была представлена характерными для этого экотопа микроорганизмами.

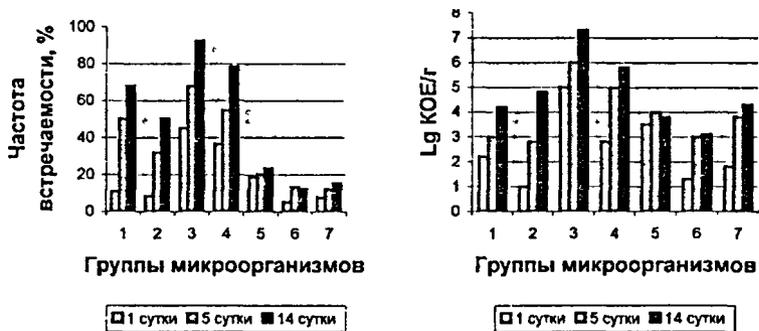


Рис 2 Характер микробиоценоза кишечника новорожденных телят из ЭНР: 1 - Bifidobacterium, 2- Lactobaallus. 3 - Eschenchia col 4 - Enterococcus, 5 - Proteus, 6 - Crtrobacter, 7- Pseudomonas



Рис 3 Характер микробиоценоза кишечника новорожденных телят из ЭБР: 1 - Bifidobactenum, 2 - Lactobaallus, 3 - Eschenchia coli, 4 - Enterococcus, 5 - Proteus, 6 - Citrobacten 7- Pseudomonas

Исследования фекальных проб, проведенное в хозяйствах с различной экологической нагрузкой, показали, что кишечная микрофлора у телят представлена в основном колиформными бактериями, количественный и качественный состав которых достоверно коррелировал с уровнем этой нагрузки $P < 0,05$.

Так, в первые сутки в кишечнике у телят из ЭБР ($n=30$) концентрация *E. coli* достоверно была в пределах $3,8 \pm 0,21 \text{lg КОЕ/г}$ у 31% животных, тогда как у телят из ЭНР ($n=30$), концентрация этих микроорганизмов достигала $5,8 \pm 0,1 \text{lg КОЕ/г}$ у 45,2% животных ($P < 0,01$).

Развивающиеся под влиянием различных факторов нарушения в микробиоценозе чаще всего выражены в дефиците бифидобакте-

рий и увеличении, популяционного уровня различных видов условно-патогенных микроорганизмов: протей ($8,1 \pm 0,3\%$) и ($18,7 \pm 0,1\%$) с интенсивностью обсеменения 1-4 lgKOE/г, цитробактер ($3,1 \pm 0,4\%$) и ($5,1 \pm 0,4\%$) с интенсивностью обсеменения (1-3,1 lgKOE/г), Pseudomonas ($5,3 \pm 0,3\%$) и ($7,5 \pm 0,3\%$) с интенсивностью обсеменения (1,8-3,8 lgKOE/г) Уже в конце первых суток жизни у $13,7 \pm 4,8\%$ обследованных в ЭНР обнаруживали бактериоды, что свойственно новорожденным телятам Тем не менее, интенсивность их выделения превышала на 2-3 порядка таковую у представителей молочнокислой флоры и в среднем составляла $3,8 \pm 0,2$ lgKOE/г. Клостридии начинали выделяться на 5-е сутки.

Обращает на себя внимание тот факт, что уже на протяжении первых 24 часов после рождения происходит контаминация условно-патогенными микроорганизмами. Безусловно, особое внимание следует уделять формированию у новорожденных телят бифидо-микробиоты кишечника, с присутствием которой здесь во многом связана невосприимчивость новорожденного организма к кишечным инфекциям. Настораживает то обстоятельство, что у телят в ЭНР даже к двухнедельному возрасту частота выделения бифидобактерий достигала только $68,2 \pm 0,2\%$ и $4,2 \pm 0,2$ lgKOE/г, тогда как в ЭБР этот показатель приближался к физиологической норме ($98,3 \pm 1,2\%$) и интенсивности ($7,1 \pm 0,1$ lgKOE/г). Анализ и сопоставление динамики и интенсивности колонизации новорожденных телят различными видами бактерий в изучаемых локусах выявили ее волнообразный характер. По-видимому, эти особенности вместе с описанным ранее появлением анаэробов в кишечнике и ротоглотке новорожденных на фоне имплантировавшихся аэробов могут свидетельствовать о происходящей в организме телят смене микробных сообществ - сукцессии.

3.3. Этиологическая структура желудочно-кишечных инф ЖКций у новорожденных животных в условиях региона. Представлены данные по изучению клинических, гематологических и патологоанатомических изменений у телят при желудочно-кишечных инфекциях в условиях Сибирского региона. На основании многолетних экспериментальных и клинических исследований установлены особенности физиологического и иммунобиологического статуса у новорожденных телят. Установлены некоторые показатели функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при острых кишечных инфекциях новорожденных телят. Так, содержание катионного белка (КБ) в нейтрофильных гранулоцитах у новорожденных телят из ЭНР со среднетяжелой формой колибактериоза в остром периоде составило $0,81 \pm 0,07$, что на $23,9\%$ ниже, чем у здоровых телят в тех же хозяйствах ($1,05 \pm 0,02$). У больных телят из хозяйств ЭБР содержание катионного белка (КБ) составило $0,98 \pm 0,20$. В период выздоровления содержание катионного белка увеличивалось в среднем на 17% , разница показателя была достоверной ($P < 0,05$).

Накопленный материал свидетельствует о том, что энтеропатогенные и энтеротоксигенные эшерии, как возбудители моноин-

фекций, встречаются только в 15-20% случаев, а чаще всего в 80-85% возбудители эшерихиоза встречаются в ассоциации с другими бактериями, вирусами и простейшими.

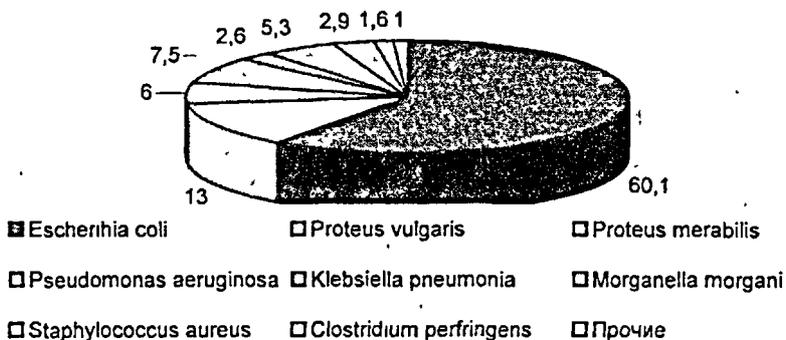
Видовой состав и серологический профиль этиологически значимых условно-патогенных бактерий при диареех новорожденных телят. Как показали наши исследования, проводимые в течение длительного периода, одной из ведущих причин, обуславливающих возникновение диарей у телят, является иммунодефицитное состояние организма у новорожденных животных, на фоне чего проявляют свою активность условно-патогенные микроорганизмы и, прежде всего, бактерии из семейства Enterobacteriaceae. Число микроорганизмов-участвующих в желудочно-кишечной патологии у молодняка, неуклонно возрастает, что обязывает по-новому взглянуть на биогенные аномалии сельскохозяйственных экосистем антропогенного происхождения, на так, называемые факторные болезни. Биогенные аномалии антропогенного происхождения незамедлительно и неблагоприятно отражаются на здоровье и продуктивности сельскохозяйственных животных. В 20 обследуемых хозяйствах, принадлежащих 15 районам Красноярского края, желудочно-кишечные болезни охватывали 75-100% поголовья новорожденных телят. Статистика гибели новорожденных телят в условиях Красноярского края за последние пять лет отражает динамику в сторону её увеличения, особенно в районах с напряженной экологической ситуацией. Так, в 1998 году летальность от кишечных инфекций составила 20,4%, в 1999 г. - 20,5%, в 2000 г. - 23,2%, в 2001г. - 25% и в 2002 г. - 26%.

При проведении 289 бактериологических исследований биоматериалов от больных и павших телят (крови, паренхиматозных органов, мезентеральных лимфатических узлов, головного мозга, трубчатой кости, тонкого и толстого отдела кишечника) при диареех мы определили основной спектр условно-патогенных бактерий, циркулирующих на фермах края и массово поражающих новорожденных животных. Во избежание ложных результатов или случайного контаминирования исследования в каждом хозяйстве повторялись, материал отбирался не позднее 6 часов после гибели животного или прибегали к вынужденному убою, а также прижизненному отбору биоматериала путем пункций (кровь, экссудат пораженных суставов).

Исследование по изучению основных условно-патогенных микроорганизмов проводили в хозяйствах с учетом экологического благополучия района. Всего в ходе работы было идентифицировано более 1000 штаммов микроорганизмов, которые по морфологическим

и культурально-биохимическим свойствам относились в основном к семейству энтеробактерий.

При бактериологическом исследовании биоматериалов на эшерихиозную инфекцию из ЭНР выделены 743 культуры микроорганизмов, которые по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам относились к следующим видам: *Escherichia coli* (45* - 60,1%), *Proteus vulgaris* (95 - 13%), *Proteus merabilis* (45 - 6%), *Pseudomonas aeruginosa* (55 - 7,5%), *Klebsiella pneumonia* (20 - 2,6%), *Morganella morganii* (40 - 5,3%), *Staphylococcus aureus* (22 - 2,9%), *Clostridium perfringens* (12 - 1,6%) и некоторым другим (рис. 4).



• Рис.4.. Соотношение различных видов бактерий, выделяемых у телят при диареях

При бактериологическом исследовании образцов, отобранных в хозяйствах из относительно благополучных Курагинского и Ордоникидзевского районов, выделено 278 культур микроорганизмов (табл. 1).

Установлено, что во многих хозяйствах в период массовых заболеваний телят диареей наряду с известными возбудителями болезни (бактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Proteus*) также встречаются патогенные штаммы бактерий рода *Morganella*, а также *Klebsiella*. Установлено, что осложняющим этиологическим фактором при диареях телят значительная роль принадлежит синегнойной палочке (*Pseudomonas aeruginosa* 6,6-28,5%). Изучение патогенных свойств выделенных микроорганизмов проводили на белых мышах. Вирулентность различных штаммов кишечной палочки и других условно-патогенных микроорганизмов сильно различалась, LD_{50} у разных штаммов варьировала от 50 до 750 млн м.т., при этом использовались суточные бульонные культуры.

1. Результаты бактериологического исследования материала от новорожденных телят

| Патологический материал | Количество проб | | В том числе | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|-----|------------------|------|------------------|------|------------------------|------|------------------|------|-----------------------|------|-------------------|------|-----------------------|------|---------------------|--|
| | | | Выделено культур | | Escherichia coli | | Pseudomonas aeruginosa | | Proteus, vulgans | | Klebsiella pneumoniae | | Proteus merabilis | | Staphylococcus aureus | | Morganella morganii | |
| | | | Количество | % | Количество | % | Количество | % | Количество | % | Количество | % | Количество | % | Количество | % | | |
| Толстый кишечник | 17 | 30 | 15 | 50 | 2 | 6,6 | 8 | 26,6 | 1 | 3,3 | 1 | 3,3 | 2 | 6,6 | 1 | 3,3 | | |
| Тонкий кишечник | 16 | 35 | 17 | 48,5 | 3 | 8,5 | 6 | 17,1 | 1 | 2,8 | 2 | 5,4 | 3 | 8,5 | 3 | 8,5 | | |
| Мезентериальные лимфоузлы | 13 | 18 | 8 | 44,4 | 2 | 11,1 | 2 | 11,1 | 1 | 5,5 | 1 | 5,5 | 2 | 11,1 | 2 | 11,1 | | |
| Почки | 15 | 26 | 7 | 26,6 | 4 | 15,3 | 5 | 19,2 | 1 | 3,8 | 3 | 11,5 | 2 | 7,6 | 4 | 15,3 | | |
| Селезенка | 40 | 38 | 14 | 36,8 | 5 | 13,1 | 10 | 26,3 | 4 | 10,5 | 1 | 2,6 | 3 | 7,8 | 1 | 2,6 | | |
| Сердце | 20 | 41 | 16 | 39,0 | 8 | 19,5 | 4 | 9,7 | 4 | 9,7 | 1 | 2,4 | 2 | 4,8 | 6 | 14,6 | | |
| Костный мозг | 38 | 42 | 12 | 28,5 | 12 | 28,5 | 3 | 7,1 | 2 | 4,7 | 2 | 4,7 | 6 | 14,2 | 5 | 11,9 | | |
| Головной мозг | 36 | 38 | 12 | 31,5 | 10 | 26,3 | 6 | 15,7 | 3 | 7,8 | 4 | 10,5 | 2 | 5,2 | 1 | 2,6 | | |
| Всего | 195 | 278 | 93 | 32,3 | 46 | 16,5 | 44 | 15,8 | 19 | 6,8 | 15 | 5,3 | 22 | 7,9 | 23 | 8,2 | | |

При изучении роли различных серологических вариантов эшерихий при диареях новорожденных телят установлено, что в экологически неблагоприятных хозяйствах серологическая вариабельность была особенно велика. Так, по соматическому O-антигену у выделенных от телят эшерихий в ЭНР, установлен следующий серологический профиль- 01 -16,3%, 02 -6,6%, 03 -0,2%, 04 -4,1%, 08 -13%, 09 -3%, 015 -4,9%, 018 -5,8%, 020 -7,7%, 026 -5,5%, 033 -0,5%, 078 -12,4%, 086 -1,6%, 0101 -1,5%, 0108 -1,6%, 0111 -2,7%, 0115 -1,5%, 0117 -1,6%, 0119 -1,9%, 0126 -1%. 0130-0,8%, 0141 -1,5%, 0142 -3,6%, 0147 -0,5%, 0149 -0,2%. В ЭБР при серологической типизации изолированных штаммов эшерихий к серотипу 020 отнесено 22,5%, 026-16,1%, 015-5,3%, 035-4,3%, 09-2,1% и 08-1,1%.

При копроскопических исследованиях фекальных проб от телят при диареях установлено, что криптоспоридии выявлялись довольно часто, причем инвазивность составляла от 10 до 90% от числа обследованных. Наиболее высокий процент поражения обнаруживали у телят в возрасте 10-15 дней. Установлено также, что процент поражения на протяжении года закономерно был выше в весенне-летний период, а в осенне-зимний период встречаемость криптоспоридии снижалась во всех обследуемых возрастных группах ($P < 0,05$).

Серологическое исследование парных сывороток крови у телят, а также сухостойных коров и коров после отела позволило выявить антитела к рото- и коронавирусам в 45,9-67,3%. У новорожденных телят в ИФА выявлены антитела к ротавирусной инфекции в 12% случаев. Рото- и коронавирусная инфекция выявлена при исследовании парных сывороток крови в хозяйствах Емельяновского, Сухобузимского, Козульского, Ачинского, Ужурского, Березовского районов, что свидетельствует о широком вирусоносительстве среди клинически здоровых коров и телят и является причиной эпизоотологического неблагополучия при диареях новорожденных животных.

На основании полученных результатов разработан специальный алгоритм эшерихиоза новорожденных телят: экотоксиканты + избыток (недостаток) микроэлементов -> стресс -> свободнорадикальная органопатология —> низкая неспецифическая сопротивляемость организма + энтеропатогенные и энтеротоксигенные эшерихии + ассоцианты (условно-патогенная микрофлора + рото-вирусы + коронавирусы + криптоспоридии) = эшерихиоз.

3.4. Разработка иммунохимического метода обнаружения эшерихии, продуцентов термостабильного энтеротоксина. Первым этапом нашего исследования являлся подбор оптимальной питательной среды для максимального накопления термостабильного энтеротоксина эшерихии (ТСЭ), необходимого для дальнейшей работы. Энтеротоксинсодержащий материал получали в трех питательных средах: среде I (Лаллиер Р.С. с соавт., 1980), среде II (Финкельштейн Р.А., 1976), среде III (бульон Хоттингера). В качестве продуцента ТСЭ-энтеротоксина применяли штаммы E. coli P16, H1012, O15-339. Энтеротоксинсодержащий материал получали с использованием трех питательных сред по связующей схеме. К 50 мл каждой питательной среде прибавляли по 5 мл суточной бульонной культуры эшерихии и выращивали при 37°C в течение 24 часов тремя методами: аэрацией, шуттелированием и стационарным.

Были проведены 15 серий опытов по оптимизации накопления и очистки термостабильного энтеротоксина. Установили, что для максимального накопления ТСЭ в культуральной жидкости выращивание штамма P16 в среде Филькенштейна следует проводить в течение 24 часов при 37°C методом шуттелирования. Токсинсодержащий супернатант подвергали гель-хроматографии на колонке с био-гелем Р-2.

Анализируя показатели оптической плотности полученных фракций элюатов, следует отметить, что по концентрациям белка они распределялись на 5 фракций. Причем выход первой фракции отмечен с 16 по 24 пробирки. Вторая фракция элюата находилась с 25 по 34 пробирки. Выход третьей фракции составил с 35 по 44 пробирки. Четвертая фракция элюата находилась с 46 по 55 пробирки. Пятая - с 56 по 67 пробирки. При изучении биологической активности ТСЭ в полученных фракциях нами было установлено, что выраженную энтеротоксическую активность имела только пятая фракция ($P < 0,01$).

Результаты специфической биологической активности гомогенного ТСЭ изучали на мышатах-сосунках также биопробой в тесте лигированной петли кишечника кролика. Учитывая результаты изучения биологической активности по энтеротропному действию очищенного ТСЭ *E. coli* P-16 и результаты диск-электрофореза в 15% ПААГ, мы установили, что термостабильный токсин содержался в пятой фракции фильтрата, полученного на биогеле Р-2, так как при определении биопробой на мышатах-сосунках и лигированной петли кишечника кролика он обладал высоким энтеротропным действием.

При получении очищенного ТСЭ одним из критериев его оценки является изучение физико-химических свойств, так как это позволяет оценить степень его очистки и изучить свойства, характерные для токсического белка.

Следующим этапом работы было получение антитоксической сыворотки к очищенному ТСЭ эшерихий путем гипериммунизации кроликов. При иммунизации кроликам вводили раствор, который готовили из лиофилизированного препарата ТСЭ.

Антисыворотки, полученные при гипериммунизации кроликов с использованием трех схем инъекций ТСЭ, были активными, так как образовывали толь по одной линии преципитата с гомологичным антигеном. Следует отметить, что при постановке РДП и ИЭФ с гетерологичным антигеном.ни в одном случае не было обнаружено образования специфических полос преципитата. Антисыворотка, полученная нами по схемам 1 и 2, выявляла специфический антиген в концентрации от 5 до 10 мкг/мл. Антисыворотка, полученная по схеме 3, выявляла наименьшие концентрации антигена в 5 мкг/мл, так как преципитат образовывался в разведении 1:32. Иммунохимический метод позволяет выявлять токсигенные эшерихий - продуценты ТСЭ в фекальных пробах новорожденных телят при диареях, а также в молозиве и молоке коров. Проводя иммунохимическую идентификацию энтеротоксигенных эшерихий в фекальных массах, молозиве и молоке, мы установили, что РДП и РИФ в непрямом варианте являются высокочувствительными и специфическими реакциями. Они позволяют заменить трудоемкие приемы по выделению и определению токсигенных культур методом биопроб на легковоспроизводимые и доступные иммунохимические методы.

При исследовании 35 проб, полученных от больных телят в РДП, положительные результаты были получены в 20 случаях (или в 57%). Из 5 контрольных проб, полученных от клинически здоровых телят, РДП была во всех 5 (100%) случаях отрицательной. В качестве положительного контроля при постановке РДП применяли токсиносохраняющий материал, из культурального фильтрата *E. coli* № Р16, продуцирующего ТС-энтеротоксин. Все 35 проб от больных телят были исследованы трехкратно с интервалом в один день. При этом было установлено, что число положительных проб не увеличивалось в последующие дни, то есть РДП во всех случаях исследований давала аналогичные результаты. При проведении люминесцентного анализа было установлено, что РИФ в непрямом варианте является

высокочувствительной реакцией при идентификации эшерихий - продуцентов ТС-энтеротоксина. При этом РИФ была более чувствительной реакцией по сравнению с РДП, так как она выявляла на 5% больше в фекальных пробах наличие токсигенных эшерихий.

Кроме фекальных проб на наличие ТС-энтеротоксина исследовали также пробы молозива и молока. В первые дни жизни телят исключительно важное значение имеет их кормление полноценным Mont зивом. Если токсигенные эшерихий проникают в желудочно-кишечный тракт телят с молозивом или молоком, то происходит их инфицирование и развитие кишечной формы колибактериоза. В мазках, приготовленных из 40 исследованных проб молозива, нам удалось выявить в 7,5% пробах в РИФ специфическое свечение энтеротоксигенных эшерихий, в то время, как РДП во всех случаях был получен отрицательный результат. При исследовании 40 проб молока количество положительных результатов в РИФ на наличие токсигенных эшерихий, продуцирующих ТС-энтеротоксин, составило 5 %.

3.5. Биологическая характеристика эпизоотических штаммов эшерихий, выделенных из различных экологических зон. Учитывая, что эшерихий колонизируют слизистые оболочки пищеварительного тракта новорожденных животных и способны мигрировать в окружающую среду, а также транслоцироваться во внутренние органы, несомненный научный интерес представляли результаты сравнительного анализа качественных характеристик *E. coli*, выделенных из различных экотопов, потенциально участвующих в формировании системы «организм хозяина - внешняя среда». Такой анализ проведен нами при изучении комплекса биологических признаков у эпизоотических штаммов эшерихий, циркулирующих в условиях хозяйств.

При изучении комплекса биологических признаков у 361 штамма эшерихий, выделенных в ЭНР из следующих источников: 60 и 30 культур соответственно из воды открытых водоемов (ВОВ) и источников хозяйственно-питьевого назначения (ХПВ), 45 - из фекальных проб практически здоровых телят (КЗТ), 20 - из предметов ухода за телятами (ПУТ), 73 - от телят с признаками диареи (КБТ), 133 культуры - из патматериала павших телят (КПМ), а также у 93 штаммов *E. coli*, выделенных из ЭБР: 15 и 10 культур соответственно из ВОВ и источников ХПВ, 15 изолятов - из ПУТ, 10 и 23 фекальных штамма соответственно от здоровых телят (КЗТ) и телят с признаками диареи и больших (КБТ) и 20 культур - из патматериала павших телят (КПМ).

Эшерихий способны колонизировать различные экотопы (в частности, кишечник и внутренние органы макроорганизма, объекты окружающей среды), что свидетельствует о высоком адаптивном потенциале данных микроорганизмов и выраженной экологической пластичности вида *E. coli*.

Поскольку конкретные условия существования эшерихий в указанных экотопах заметно отличаются между собой, логично полагать, что приспособление бактериальных популяций к ним сопровождается

отбором клонов с такими фенотипическими характеристиками, которые адекватны спектру абиогенно-биотических факторов, сложившемуся в конкретной биологической нише. Исследования показали значительную межпопуляционную вариабельность эшерихий по комплексу анализируемых биологических характеристик (персистентность, гемолитическая и адгезивная активность, антибиотикоустойчивость и энтеротоксигенность). В зависимости от источников выделения штаммов эшерихий частота встречаемости (пенетратность) и уровень выраженности (экспрессивность) отдельных признаков в бактериальных популяциях были различными и колебались в достаточно широком диапазоне. При этом удалось установить ряд тенденций в широте распространения изучаемых признаков среди изолятов эшерихий, выделенных из различных экотопов.

Установлено, что частота встречаемости бактериальной персистенции у эшерихий увеличивалась вдоль оси экотопов: внешняя среда - здоровые телята - больные телята. Наиболее ярко эта закономерность прослеживалась при анализе *E. coli* по частоте встречаемости антилизоцимной активности (АЛА) (рис. 5).

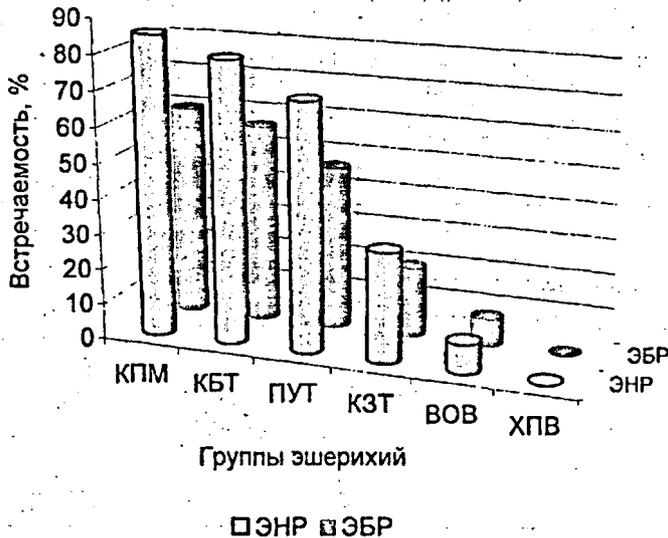


Рис. 5. Частота встречаемости антилизоцимной активности АЛА (%) у эшерихий, выделенных из различных источников и экологических зон

Антилизоцимный признак отсутствовал у всех кишечных палочек, изолированных из ХПВ, и выявлялся примерно одинаково из ВОВ (у 8,2% культур из ЭНР и у 7,9% культур из ЭБР), в то время как среди штаммов эшерихий, выделенных от больных и павших телят (КБТ и КПМ), данный признак регистрировался значительно чаще, как в эко-

логически неблагополучных, так и в экологически благополучных районах: 79,5% и 85% случаев ($P < 0,05$) и 56,5% и 60% случаев ($P < 0,01$), соответственно. Среди эшерихий, выделенных из (ПУТ), АЛА достигала достаточно высокого уровня 70% в ЭНР и 46,7% в ЭБР ($P < 0,01$). Копроштаммы здоровых телят (КЗТ) занимали промежуточное положение 31,1% и 20%, соответственно в ЭНР и ЭБР ($P < 0,05$).

Серорезистентными считали культуры, проявляющие уровень выживания в 95% случаев и более при контакте с сывороткой крови.

Серорезистентность эшерихий, выделенных из различных источников, позволила выявить подавление одного из ключевых механизмов неспецифической резистентностиTM и противомикробной защиты макроорганизма. Будучи ключевым фактором антибактериального иммунитета, бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) является неминуемым барьером для грамотрицательных бактерий. Резистентные штаммы эшерихий чаще выделяли из организма больных диареей животных, а также из биоматериалов павших телят.

Резистентные штаммы эшерихий чаще всего выделяли из биоматериалов больных и павших телят (КБТ и КПМ) при исследовании 450 штаммов, разделенных в зависимости от источника выделения на 6 групп, в ЭБР и ЭНР (табл. 2).

2. Параметры серорезистентности выделенных эшерихий

| Источник выделения | Резистентность эшерихий к БАСК | |
|--------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | ЭНР | ЭБР |
| ПУТ | $\frac{20}{5,0 \pm 0,1}$ | $\frac{15}{0,0}$ |
| КЗТ | $\frac{45}{11,8 \pm 0,1}$ | $\frac{10}{2,01 \pm 0,1}$ |
| КБТ | $\frac{73}{43,8 \pm 0,6}$ | $\frac{23}{17,3 \pm 1,2}$ |
| КПМ | $\frac{133}{61,6 \pm 0,54}$ | $\frac{20}{30,0 \pm 0,1}$ |

Примечание. В числителе - число исследованных штаммов, в знаменателе - % резистентных штаммов.

При изучении гемолитической активности у эшерихий, выделенных у телят в хозяйствах с различной экологической нагрузкой, установили увеличение доли гемолитических штаммов у микроорганизмов, относящихся к хозяйствам ЭНР. Соотношение гемолитических и негемолитических штаммов эшерихий в зависимости от источника выделения выглядело следующим образом (табл. 3).

3. Частота обнаружения гемолитической активности у эшерихий, выделенных из различных источников

| Источник выделения | | Всего культур эшерихий | Доля гемолитических культур, % | Отношение гемолитических культур к негемолитическим |
|--------------------|--------|------------------------|--------------------------------|---|
| ЭНР | 1. КБТ | 73 | 65,1±1,2 | 1,0,52 |
| | 2. КПМ | 133 | 68,0±1,4 | 1,0,47 |
| ЭБР | 3 КБТ | 23 | 22,1±1,0 | 1,3,6 |
| | 4 КПМ | 20 | 25,0±2,2 | 1,3,0 |

Примечание. КБТ - эшерихии, выделенные из организма больных телят; КПМ - эшерихии, выделенные из организма павших телят; $P_{1,3} < 0,01$; $P_{2,4} < 0,01$."

Анализируя полученные данные, отчетливо видно, что штаммы, циркулирующие в организме новорожденных телят из экологически неблагоприятных районов, имеют достоверно более высокие показатели гемолитической активности, чем штаммы эшерихий, выделенные от телят из экологически более благоприятных районов. Среди штаммов эшерихий, выделенных из других источников, достоверных различий по гемолитической активности не было выявлено.

При изучении факторов вирулентности установили, что существующие различия эпизоотических штаммов эшерихий по адгезивному показателю у телят могут быть также связаны с экологическими особенностями территорий, что наглядно прослеживается при сравнении адгезивности по K99-антигену. Так, процент эшерихий, имеющих в своем составе антиген K99, был всегда достоверно выше в хозяйствах, относящихся к экологически неблагоприятным районам ($P < 0,05$). Так, среди эшерихий, выделенных от здоровых телят показатель адгезивности не превысил 5%, как в ЭНР, так и в ЭБР, среди эшерихий выделенных из предметов ухода за телятами - 10 и 5% ($P < 0,05$), от больных - 48,5 и 37,2% и от павших телят - 58,2 и 48% соответственно.

Анализ результатов по изучению антибиотикоустойчивости у эшерихий показал значительную межпопуляционную вариабельность у микроорганизмов, выделенных из различных источников в современных условиях животноводческих хозяйств. При этом важно отметить, что штаммы эшерихий, изолированные от больных и павших телят при диареях, чаще проявляли множественную лекарственную устойчивость, чем штаммы, выделенные из объектов окружающей среды. Поэтому антибиотикоустойчивость копрокультур эшерихий представляет особый интерес с точки зрения формирования межпопуляционного полиморфизма у микробов в условиях экологической нагрузки животноводческих хозяйств.

Следует отметить, что проведенные исследования *in vitro* по выявлению чувствительности к антибиотикам позволили установить у эпизоотических штаммов эшерихий высокий спектр устойчивости к следующим противомикробным препаратам: хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину, канамицину и др. При этом установлено, что для эшерихий, выделенных от больных и павших телят, харак-

терно преобладание фенотипов с множественной лекарственной устойчивостью к антимикробным препаратам. Частота встречаемости эшерихий, обладающих лекарственной устойчивостью, была достоверно выше у изолятов, полученных от телят из экологически неблагополучных хозяйств. В различные годы, по нашим данным, выделялись культуры кишечной палочки, которые проявляли устойчивость к 7-8 антибактериальным препаратам, тогда как эшерихий из экологически благополучных районов были устойчивы к 2-4 препаратам.

Испытание антибиотикоустойчивости эшерихий, выделенных из хозяйств с различной экологической нагрузкой, представлено в (табл. 4).

Анализируя представленные результаты, следует отметить, что наиболее высокой антимикробной активностью обладали препараты из группы цефалоспоринов и фторхинолонов.

4. Испытание антибиотикоустойчивости эшерихий, выделенных от больных и павших телят

| Название препарата | ДЗЗР эшерихий из ЭНР, мм | | ДЗЗР эшерихий из ЭБР, мм | |
|--------------------|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | КБТ | КПМ | КБТ | КПМ |
| Хлорамфеникол | 18,20±0,2 | 16,40±0,5 | 22,05±0,4 | 20,20±0,3 |
| Эритромицин | 17,01±1,2 | 16,10±1,5 | 20,10±0,8 | 21,50±0,9 |
| Тетрациклин | 7,50±0,1 | 3,0±0,1 | 13,0±0,1 | 8,50±0,1 |
| Стрептомицин | 10,20±0,3 | 9,0±0,3 | 16,20±0,3 | 15,0±0,3 |
| Неомицин | 8,02±1,1 | 7,20±0,4 | 15,0±1,0 | 13,20±0,5 |
| Цефазолин | 20,20±0,2 | 24,0±0,1 | 22,20±0,5 | 23,80±0,5 |
| Байтрил | 21,30±0,1 | 23,10±0,5 | 25,30±1,1 | 24,12±0,7 |
| Канамицин | 10,40±1,0 | 10,20±1,2 | 18,30±0,8 | 15,20±0,1 |

Копроштаммы эшерихий, выделенные от больных и павших телят, проявили более высокую резистентность (R) в отношении целого ряда фармакологических препаратов: неомицину, стрептомицину, эритромицину и т.д., при этом устойчивость эшерихий к противомикробным препаратам была всегда достоверно выше у культур, выделенных у телят в экологически неблагополучных хозяйствах ($P < 0,01$).

Известно, что термостабильному энтеротоксину эшерихий (ТСЭ) отводится ведущая роль в патогенезе кишечной формы колибактериоза, так как он вызывает усиленный выход жидкости и электролитов из энтероцитов, через повышение уровня циклического 3,5-гунозинмонофосфата (цГМФ), что обуславливает обезвоживание организма и развитие симптома диареи.

В результате проведенных исследований по изучению биологической активности возбудителей эшерихиоза, установили тенденцию к широкому распространению в хозяйствах Сибирского региона энтеротоксигенных эшерихий. Так, в животноводческих хозяйствах ЛН-центральных районов Красноярского края, относящихся к ЭНР, обнаружили достаточно высокий уровень энтеротоксигенности среди энтеропатогенных эшерихий, выделенных от телят.

Так в этих хозяйствах среди копроштаммов эшерихий от болы-оих и павших телят обнаружили до 65,5% продуцентов термостабильно-го энтеротоксина, тогда как в хозяйствах южной зоны, относящихся к ЭБР, этот показатель не превысил 32,6% (P < 0,01).

Среди штаммов эшерихий, полученных от клинически здоровых телят, энтеротоксигенными оказались 8,9% и 0% соответственно (P < 0,05). Следует отметить, что среди эшерихий, выделенных из воды открытых водоемов и воды хозяйственно-питьевого назначения, не было зарегистрировано ни одного энтеротоксигенного штамма.

3.6. Влияние природного энтеросорбента (цеолита) на сохранность и естественную резистентность новорожденных телят. Учитывая, что при острых желудочно-кишечных болезнях доминируют признаки общей интоксикации, в комплексе лечебно-профилактических мер особое место отводили дезинтоксикационным методам, основанным на энтеросорбции. Целью данного исследования явилась оценка профилактической активности местного цеолита (сахаптина) и препарата Ветом 1.1 при диареях новорожденных телят, а также их влияние на естественную резистентность. Влияние испытуемых препаратов на физиологическое состояние новорожденных телят устанавливали по приросту живой массы, клиническим, гематологическим и иммунологическим показателям. При анализе гематологических показателей у подопытных и контрольных животных установлено, что в суточном возрасте достоверные различия практически отсутствовали.

Из полученных данных видно, что в контрольной группе заболеваемость новорожденных телят острыми кишечными болезнями составила 100%, в то время как в опытных группах она достигала всего 10-40%. Представленные результаты свидетельствуют также о том, что сохранность и продуктивность поголовья за весь период наблюдения оказались выше в группе животных, где использовались в комплексе сахаптин и Ветом 1.1.

Картина крови у новорожденных телят в первые 14 дней отражала характер протекающих в организме биохимических процессов (табл. 5).

5. Динамика гематологических показателей новорожденных телят

| Показатель | Возраст телят, дни | Группа телят | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|--------------|--------------|
| | | Первая (контроль) | Вторая | Третья |
| Гемоглобин, г/л | 1 | 111,3 ± 0,53 | 110,9 ± 0,56 | 111,1 ± 0,82 |
| | 5 | 100,1 ± 0,66 | 105,6 ± 0,83 | 107,3 ± 0,58 |
| | 10 | 90,1 ± 0,45 | 106,8 ± 0,57 | 111,6 ± 0,54 |
| | 14 | 90,3 ± 0,50 | 111,0 ± 0,28 | 113,5 ± 0,28 |
| Эритроциты, 10 ¹² /л | 1 | 8,30 ± 0,32 | 8,36 ± 0,09 | 8,43 ± 0,09 |
| | 5 | 6,64 ± 0,14 | 6,31 ± 0,24 | 6,69 ± 0,12 |
| | 10 | 6,51 ± 0,02 | 6,67 ± 0,16 | 6,80 ± 0,18 |
| | 14 | 6,59 ± 0,07 | 6,79 ± 0,12 | 7,33 ± 0,25 |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 1 | 8,73 ± 0,13 | 8,60 ± 0,11 | 8,75 ± 0,08 |
| | 5 | 7,87 ± 0,11 | 8,63 ± 0,12 | 8,73 ± 0,12 |
| | 10 | 7,16 ± 0,20 | 8,18 ± 0,03 | 8,23 ± 0,03 |
| | 14 | 7,12 ± 0,01 | 7,80 ± 0,04 | 8,01 ± 0,05 |

Так, в первые 5 дней в контрольной группе установлено достоверное снижение гемоглобина и эритроцитов, что связано, на наш взгляд, с переходом на легочный тип дыхания, в связи с этим необходимостью в прежнем объеме гемоглобина и эритроцитов отпадает. У телят, получавших цеолиты, а также цеолиты + Ветом 1.1, с 5-дневного возраста наблюдали увеличение содержания гемоглобина, эритроцитоз и лейкоцитоз, которые достигали пределов физиологической нормы. Следует отметить, что по данным показателям между опытными группами и контролем в указанные возрастные периоды различия были статистически достоверны.

Бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) в контрольной и опытных группах увеличивалась в зависимости от возраста. Следует отметить, что самый высокий уровень БАСК во все возрастные периоды статистически достоверно ($P < 0,01$) имели телята 3-й группы, в рацион которых включали цеолиты + Ветом 1:1. При этом в 14-дневном возрасте БАСК 3-й опытной группы составила 46,3%, что на 12,1% больше, чем в контрольной группе.

Лизоцимная активность сыворотки крови у испытуемых животных уже на 5-й день наблюдений в опытных группах достоверно превышала аналогичный показатель у сверстников в контрольной группе. Такая закономерность сохранялась до конца наблюдений. Лизоцимная активность является одним из важнейших факторов неспецифического иммунитета. Он синтезируется и секретируется гранулоцитами, моноцитами и макрофагами. Лизоцим обладает способностью ферментативно расщеплять полисахариды, входящие в состав оболочки микробных клеток, а также вызывает мобилизацию других неспецифических защитных факторов организма. Поэтому в сыворотке крови лизоцим играет двоякую роль, он оказывает антимикробное действие на широкий спектр микробов и косвенно его уровень позволяет оценить клеточный иммунитет.

Испытуемые препараты оказывали положительное влияние на клеточное звено неспецифической резистентности, о чем свидетельствует фагоцитарная активность нейтрофилов. Уровень фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов в 3-й опытной группе составил 43%, что на 7% выше, чем в контрольной группе ($P < 0,01$).

Уровень лизосомально-катионного теста (ЛКТ) в крови новорожденных телят в суточном возрасте находился в пределах 1,05-1,32 ед. При анализе этого показателя у испытуемых животных установлено, что он был статистически выше в опытных группах ($P < 0,01$). ЛКТ позволяет судить о содержании неферментных и ферментных катионных белков, обладающих сильным бактерицидным действием, основанным на нарушении структуры и функции клеточных мембран в бактериальных клетках.

Использование природного энтеросорбента - цеолита - для профилактики желудочно-кишечных болезней позволило повысить сохранность новорожденных телят. Цеолиты в желудочно-кишечном тракте под действием ферментов отдают катионы подвижных форм

микроэлементов в состав химуса, тем самым регулируют минеральный обмен. Минеральные вещества, прямым и косвенным путем действуя на клетки крипт и ворсинок, активизируют синтез мукополисахаридов, а соответственно образование соединительной ткани и эпителия. Минеральные вещества цеолитов способствовали лучшему использованию питательных веществ. Цеолиты адсорбируют на своей поверхности максимум кишечной микрофлоры и способствуют выделению ее из организма, в результате происходит снижение интоксикации. О положительном влиянии добавок цеолита в сочетании с Ветом 1.1 свидетельствуют данные учета заболеваемости, сохранности и прироста живой массы.

Следует также отметить, что цеолиты + Ветом 1.1 оказывали позитивное влияние на становление факторов естественной резистентности новорожденных телят, что составляет первую линию обороны при инфекции, причем иммунобиологическое созревание в опытных группах протекало интенсивнее контроля.

3.7. Пути оптимизации эколого-микробиологического мониторинга за эшерихиозами новорожденных телят. В современных условиях получения, выращивания и использования продуктивных новорожденных животных (с учетом кризиса экосистемы и антропогенных аномалий внешней среды) возникла необходимость в разработке нового подхода к пониманию причин возникновения и развития патологии у сельскохозяйственных животных, позволяющего с учетом эколого-адаптационных позиций представить современную стратегию защиты их организма. В качестве одного из критериев анализа риска антропогенных предпосылок возникновения желудочно-кишечных болезней у новорожденных телят нами разработана и предлагается для использования новая концептуальная модель эпизоотологического надзора за острыми кишечными инфекциями (ОКИ) в системе эколого-микробиологического мониторинга. Она представляет собой детерминированную систему наблюдения за основными наиболее значимыми факторами, позволяющими существенно снизить уровень заболеваемости новорожденных животных.

В представленном алгоритме особое внимание отводится анализу состояния внешней окружающей среды, в которой особое значение отводится содержанию приоритетных экотоксикантов. В регионах с напряженной экологической ситуацией решающим фактором в возникновении желудочно-кишечных заболеваний у телят, в первую очередь эшерихиоза, являются систематические неблагоприятные воздействия экотоксикантов малой интенсивности в различных комбинациях (тяжелые металлы с микотоксинами, нитратами и нитритами, метаболитами и изомерами устойчивых органических загрязнителей, радионуклидами др.) на метаболический гомеостаз в функциональной системе «животное (мать) - плод - приплод». Учитывая состояние агроэкосистемы региона по совокупности антропогенных нагрузок с выделением доминантных экологических факторов, становится возможным устанавливать прогнозируемые уровни экологического риска заболеваемости новорожденных телят.

Для установления возможной массовой заболеваемости желудочно-кишечными инфекциями новорожденных телят, а также выявления причин болезни, полезно использовать прогнозирование здоровья приплода. Прогнозирование ожидаемого приплода можно осуществлять по уровню полноценности и сбалансированности кормления сухостойных коров, а также по показателям крови (развернутый биохимический анализ) стельных коров-матерей за 15-60 дней до отела. Кроме того, в системе противозпизоотического надзора важное значение должно быть отведено диагностике субклинических маститов у коров в сухостойный период. В случае постановки диагноза на мастит принимать незамедлительные меры по санации молочной железы. В системе микробиологического мониторинга значительное внимание отводится бактериальной обсемененности животноводческих помещений и предметов ухода за телятами (ПУТ) (сосковые поилки, водосточники, мелозиво). При стационарном неблагополучии хозяйства по эшерихиозу обязательно исследуют коров матерей-бактерионосителей.

Результаты микробиологического (бактериологического) исследования должны включать диагностические тесты по целому спектру факторов вирулентности эшерихий и других условно-патогенных бактерий (гемолитическая и адгезивная активность, энтеротоксигенность и антибиотикоустойчивость). Очень важно при этом учитывать роль циркулирующих рото- и коронавирусов, а также исключать наличие криптоспориidioзов. Учитывая результаты оперативного и ретроспективного эпизоотологического анализа, устанавливают эпизоотологические приоритеты по профилактике острых кишечных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие антропогенных факторов на агроэкосистему животноводческих хозяйств Сибирского региона достигло опасных уровней, что создает сложную ветеринарно-экологическую ситуацию, связанную с комбинированным их влиянием, и способствует рождению нежизнеспособного приплода, увеличению желудочно-кишечных патологий у новорожденных телят.

2. Проведенное ранжирование территории региона по совокупности антропогенных нагрузок позволило составить эколого-эпизоотологическую карту в компьютерном варианте, отражающую взаимосвязь интенсивности антропогенных нагрузок с заболеваемостью телят ОКЗ по территории региона.

3. Установлена прямая корреляционная зависимость гибели телят от загрязнения природной окружающей среды, при этом потенцированное действие антропогенных факторов в 5-10 раз превышает повреждающий эффект, который они могут причинить в отдельности.

4. Установлена патогенетическая взаимосвязь между заболеваемостью коров субклиническими колиформными маститами в молокозивный период и заболеваемостью новорожденных телят энтеритами. Из секрета вымени коров выделены следующие виды микробов: *Str. pyogenes*, *Str. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*.

Выделенные штаммы эшерихий от коров при маститах и от телят при энтероколитах отнесены к серотипам 0115 (3%), 026 (2%).

5. Микробная колонизация у новорожденных телят сопровождается характерным распределением отдельных видов микроорганизмов по изучаемым биотопам (кишечник, ротоглотка). Установлено явление микробной интерференции, т.е. взаимоотношений микроорганизмов, когда один из них препятствует колонизации других (колонизационная резистентность КР). При этом определяющими факторами, влияющими на процесс формирования микрoэкологического статуса у новорожденных телят, являются экологические факторы конкретного хозяйства. Низкая колонизационная резистентность определяет группу риска новорожденных телят по развитию острых кишечных инфекций.

6. Установлена этиологическая значимость основных инфекционных агентов, циркулирующих у новорожденных телят при острых кишечных инфекциях в хозяйствах с различной экологической нагрузкой, при этом ведущая роль в сообществах принадлежала кишечной палочке. При исследовании биоматериалов на эшерихиозную инфекцию выделены 743 культуры микроорганизмов, которые по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам отнесены к следующим видам: *Escherichia coli* (454 - 60,1%), *Proteus vulgaris* (95 - 13%), *Proteus merabilis* (45 - 6%), *Pseudomonas aeruginosa* (55 - 7,5%), *Klebsiella pneumonia* (20 - 2,6%), *Morganella morganii* (40 - 5,3%), *Staphylococcus aureus* (22 - 2,9%), *Clostridium perfringens* (12 - 1,6%) и некоторым другим.

На основании полученных результатов разработан специальный алгоритм эшерихиоза новорожденных телят, экотоксиканты + избыток (недостаток) микроэлементов — стресс — свободнорадикальная органопатология — низкая неспецифическая сопротивляемость организма + энтеропатогенные и энтеротоксикогенные эшерихии + ассоцианты (условно-патогенная микрофлора + ротавирусы + коронавирусы + криптоспоридии) = эшерихиоз.

7. Клиническая картина кишечных инфекций у новорожденных телят характеризовалась рядом общих клинических симптомов независимо от формы заболевания, выраженности интоксикационного синдрома, и чаще всего зависела от тяжести заболевания и достоверно была продолжительнее в хозяйствах из экологически неблагоприятных районов.

В лейкоцитарной формуле больных телят из обеих групп районов отмечался нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом ядра влево, характеризующийся появлением миелоцитов с увеличением количества юных и палочкоядерных нейтрофилов, что характерно для септических форм эшерихиоза. Количество эозинофилов достоверно снижено ($P < 0,05$).

8. Фагоцитарная активность у здоровых однодневных телят из ЭБР составила $39 \pm 0,19\%$, фагоцитарное число - $2,90 \pm 0,07$, фагоцитарный индекс - $7,44 \pm 0,10$. Перечисленные показатели у телят этой же возрастной группы из ЭНР равнялись соответственно $24 \pm 0,15\%$,

1,75±0,03 и 7,29±0,06, то есть фагоцитарная активность нейтрофилов оказалась ниже на 13%, а фагоцитарное число и фагоцитарный индекс существенно не отличались.

9. Содержание катионного белка (КБ) в нейтрофильных гранулоцитах у новорожденных телят из ЭНР со среднетяжелой формой эшерихиоза в остром периоде составила $0,81 \pm 0,07$, что на 23,9% ниже, чем у здоровых телят в тех же хозяйствах ($1,05 \pm 0,02$). У больных телят из хозяйств ЭБР содержание катионного белка (КБ) составило $0,98 \pm 0,20$. В период выздоровления содержание катионного белка увеличивалось в среднем на 17%, разница показателя была достоверной ($P < 0,05$). У здоровых телят из хозяйств ЭБР содержание катионного белка в нейтрофилах было выше ($1,34 \pm 0,16$), чем у здоровых телят ($1,05 \pm 0,02$) из ЭНР.

10. Разработан иммунохимический метод идентификации энтеротоксигенных эшерихий, продуцентов термостабильного энтеротоксина (ТСЭ), позволяющий проводить экспресс-диагностику токсигенных штаммов эшерихий в РДП и РИФ. Отработаны режимы препаративного накопления, выделения и очистки с последующим получением диагностической антитоксической сыворотки.

11. Полученная антитоксическая сыворотка обладала высокой активностью и специфичностью при идентификации антигенных Д-терминант эшерихий в РДП и РИФ. С другими гетерологичными токсигенными культурами *Klebsiella pneumoniae*, *Aer. hydrophila*, *Sal. typhimurium*, *Sal. enteritidis*, *Cl. perfringens*, *St. aureus* не установлено перекрестных серологических реакций.

12. Иммунохимические методы идентификации энтеротоксигенных эшерихий позволили выявить у больных телят в животноводческих хозяйствах эшерихий, продуценты термостабильного энтеротоксина среди эпизоотических штаммов. Уровень энтеротоксигенности эшерихий, выделенных у телят в хозяйствах Сибирского региона, в зависимости от экологического благополучия колебался от 32 до 66%, в Московской области - в пределах 62% .

13. Установлена высокая межпопуляционная вариабельность эшерихий, которая адекватна спектру абиогенно-биотических факторов, сложившихся в конкретной биологической нише, по комплексу биологических характеристик (персистенность, гемолитическая и адгезивная активность, антибиотикоустойчивость и энтеротоксигенность) и увеличивалась вдоль оси экопопов: внешняя среда - здоровые телята - больные телята в зависимости от экологической нагрузки в хозяйстве ($P < 0,05$).

14. При применении энтеросорбентов (цеолита сахатин, сахатин + Ветом 1.1) с профилактической целью заболеваемость у новорожденных телят в опытных группах составила 10-40%, что на 60-90% ниже, чем в контроле.

На фоне применения энтеросорбента отдельно и в комплексе с Ветом 1.1 в крови телят опытных групп отмечалось повышение по-

казателей БАСК, фагоцитарной активности, а также уровня лизосомально-катионной активности (ЛКТ) в крови новорожденных телят ($P < 0,01$).

15. Теоретически обоснована концептуальная модель по эколого-микробиологическому мониторингу в системе противоэпизоотического надзора за острыми кишечными инфекциями новорожденных телят.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты научно-исследовательской работы использованы при разработке методических рекомендаций по иммунохимической идентификации энтеротоксигенных эшерихий, продуцентов термостабильного энтеротоксина (одобренных ВАСХНИЛ, - 1985. - 21 с.) Получено авторское свидетельство на способ получения термостабильного энтеротоксина эшерихий (А.с. 1220177 СССР, МКИ С12К1/04).

2. Разработаны методические рекомендации по определению факторов естественной резистентности новорожденных телят с использованием современных методов исследования (утверждены на заседании подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО РАСХН. 2003 - Красноярск, 2004. - 70 с), которые используются в работе бактериологического и биохимического отделов Красноярской краевой ветеринарной лабораторией и Хакасской Республиканской ветеринарной лабораторией (справка о внедрении № 29/3 от 5.02.04; акт о внедрении от 15.04.04).

3. Ветеринарной практике рекомендуется комплексная система эколо-микробиологического мониторинга при стационарном неблагополучии новорожденных телят острыми кишечными инфекциями. Для этого разработана концептуальная модель эпизоотологического надзора за эшерихиозами в системе противоэпизоотического наблюдения. В хозяйствах, неблагополучных по эшерихиозу, целесообразно проводить комплексное бактериологическое исследование с учетом выявления биологических характеристик возбудителя (персистенция, гемолитическая и адгезивная активность, антибиотикоустойчивость и энтеротоксигенность) и параметров внешней среды. При этом следует учитывать роль других условно-патогенных бактерий, выделяемых в ассоциатах, на фоне соблюдения технологических приемов разрыва эпизоотологической цепи.

Разработаны методические рекомендации по желудочно-кишечным болезням новорожденных телят в условиях Сибири: особенности эпизоотологии, патогенеза, характер клинического проявления, меры профилактики и борьбы (утверждены на заседании подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО РАСХН. - Новосибирск, - 2004. - 90 с).

4. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе по курсу «Ветеринарной микробиологии и иммунологии» в сельскохозяйственных вузах по специальности 310801

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ковальчук Н.М.** Очистка термостабильного энтеротоксина эшерихий / Ковальчук Н.М., Подкопаев В.М. МВА. - М., 1983. - 6 с. - Деп. в ВНИИТЭ-ИСХ 15.06.83, № 184-83.
2. **Ковальчук Н.М.** Подбор питательных сред и методов культивирования эшерихий для накопления термостабильного энтеротоксина / Ковальчук Н.М. МВА. - М., 1983. - 8 с. - Деп. в ВНИИТЭИСХ 27.07.83, № 184-83.
3. **Ковальчук Н.М., Подкопаев В.М., Петровская В.Г., Флуер Ф.С** Выделение термостабильного энтеротоксина эшерихий *E. coli* // Хроматография в биологии и медицине: Тезисы науч. конф. / АН СССР, отделение общей и технической химии. - М., 1983. - С. 82-83.
4. А. с. 1220177 СССР, МКИ С 12 К1/04. Способ получения термостабильного энтеротоксина эшерихий / Ковальчук Н.М., Подкопаев В.М. - № 3544782; Заявлено 24.01.83; опубл. 30.08.85; бюл. № 12. - 2 с.
5. **Ковальчук Н.М.:** Получение антисыворотки к термостабильному энтеротоксину эшерихий // Пути повышения эффективности сельскохозяйственного производства Восточной Сибири: Мат-лы II зон. науч.-произв. конф. мол. уч. и спец. - Красноярск, 1987. - С. 158-159.
6. **Турицына Е.Г., Ковальчук Н.М., Кадошников В.И.** и др. Патоморфология вирусно-бактериальной инфекции птиц в эксперименте // Пути повышения эффективности сельскохозяйственного производства Восточной Сибири: Мат-лы III зон. науч.-произв. конф. мол. уч. и спец. - Красноярск, 1989. - С. 41-42.
7. **Кадошников В.И., Ковальчук Н.М., Щеглова Е.Ю.** и др. Изучение иммуногенных свойств различных фракций бактерий и вирусов с целью создания вакцин // Пути повышения эффективности сельскохозяйственного производства Восточной Сибири: Мат-лы III зон. науч.-произв. конф. мол. уч. и спец. - Красноярск, 1989. - С. 42-43.
8. **Ковальчук Н.М., Кадошников В.И., Турицына Е.Г.** и др. Способы обнаружения и оценки токсигенности возбудителей инфекционных болезней молодняка сельскохозяйственных животных // Пути повышения эффективности сельскохозяйственного производства Восточной Сибири: Мат-лы III зон. науч.-произв. конф. мол. уч. и спец. - Красноярск, 1989. - С. 44-45.
9. **Кадошников В.И.**, Ковальчук Н.М., Щеглова, Е.Ю. Использование иммунологических методов в оценке иммуногена инфекционных болезней // Пути повышения эффективности сельскохозяйственного производства Восточной Сибири: Мат-лы III зон. науч.-произв. конф. мол. уч. и спец. - Красноярск, 1989. - С. 45-46.
10. **Ковальчук Н.М.** Влияние белково-витаминного кормового продукта на факторы естественной резистентности у телят: Мат-лы. науч.-техн. конф. - Омск, 1989. - С. 98.
11. **Ковальчук Н.М., Кунгаа Л.Б.** Изучение некоторых патогенных свойств эшерихий, выделенных от новорожденных телят при диареях // Молодежь и научно-технический прогресс: Мат-лы краев, конф. - Красноярск, 1990. - С. 104.
12. **Ковальчук Н.М., Втюрина Е.И., Донкова Н.В.** Оптимизация мероприятий, способствующих повышению резистентности молодняка // Резер-

вы увеличения производства свинины: Мат-лы Всесоюз. науч.-техн. совещ. 15-16 октября 1991 г. - Витебск, 1991. - С. 45-46.

13. Ковальчук Н.М., Донкова Н.В. Использование препаратов вилочковой железы у телят при гипотрофиях, осложненных бактериальной инфекцией // Использование гормональных препаратов в животноводстве: Мат-лы Всесоюз. науч.-техн. конф. - М., 1991. - С. 164-165.

14. Ковальчук Н.М., Тарарина Л.И. Опыт лечения телят при ассоциированной инфекции, вызванной энтеротоксигенными микроорганизмам.' // Проблемы болезней молодняка: Мат-лы Всесоюз. науч.-техн. конф. - Воронеж, 1991.-С. 24-25.

15. Ковальчук Н.М. Случай ассоциированной инфекции молодняка крупного рогатого скота // Наука - сельскохозяйственному производству: Мат-лы науч. конф. - Красноярск, 1993. - С. 30.

16. Ковальчук Н.М., Немкова Н.П. Проблема иммунодефицита у новорожденных телят при дисбактериозах // Наука - сельскохозяйственному производству: Мат-лы науч. конф. - Красноярск, 1993. - С. 31.

17. Ковальчук Н.М. Ассоциированные инфекции молодняка крупного рогатого скота // Гигиена, ветеринария и экология животноводства: Мат-лы Всерос. науч.-произв. конф. - Чебоксары, 1994. -С. 204.

18. Ковальчук Н.М. Диареи раннего постнатального периода у телят // Наука - сельскохозяйственному производству: Мат-лы науч. конф. - Красноярск, 1995. - С. 33-34.

19. Ковальчук Н.М. Роль энтеропатогенных и энтероинвазивных штаммов эшерихий при колибактериозе телят // Технологии неистощительного землепользования: Мат-лы науч. конф. - Красноярск, 1997. - С. 39-40.

20. Ковальчук, Н.М., Кадошникова Т.С., Сачкова Е.П. Диагностика желудочно-кишечных инфекций (колибактериоза и сальмонеллеза) у молодняка сельскохозяйственных животных: Метод, указания. - Красноярск, 1998. - 16 с.

21. Ковальчук, Н.М., Нефедов В.П., Борсук Т.Н. Проблема диагност \langle са лечения и профилактики колибактериоза телят в хозяйствах Канского района // Реконструкция гомеостаза: Сб. науч. тр. IX Международ, симпоз. / КНЦ СО РАН - Красноярск, 1998. - С. 34-38.

22. Ковальчук Н.М. К вопросу циркуляции энтеротоксигенных и энтероинвазивных штаммов эшерихий, выделяемых у телят при колибактериозе // Реконструкция гомеостаза: Сб. науч. тр. IX Международ, симпоз. / КНЦ СО РАН - Красноярск, 1998. - С. 31-34.

23. Ковальчук Н.М. Роль энтеротоксигенных и энтероинвазивных штаммов эшерихий, выделенных у телят в зонах экологического неблагополучия // Вестн. КрасГАУ. - 1999. - Вып. 4. - С. 83-84.

24. Ковальчук Н.М. Антигенная вариабельность и патогенность эшерихий как адаптация бактерий в симбиозе с макроорганизмом // Достижения науки и техники - развитию сибирских регионов: Мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. с международ, участием. - Красноярск, 1999. - С. 110.

25. Ковальчук Н.М., Карапунарлы С.Ш., Замятин К.А. Микрофлора пещер окрестностей г. Красноярска // Студенческая наука - городу и краю: Сб. мат-лов науч.-практ. конф. - Красноярск, 2000. - С. 53.

26. Ковальчук Н.М., Нестеренко Н. Н., Шапченкова Т.В. Оценка эпизоотической ситуации у молодняка сельскохозяйственных животных в усле аиях экологического неблагополучия // Инфекционные и инвазионные болезни - Мат-лы Международ, науч. конф. -Казань, 2000. - С. 74-75.

27. Ковальчук Н.М. Изучение некоторых физико-химических свойств термостабильного энтеротоксина эшерихий // Вестн. КрасГАУ. - 2000. - Вып. 6. - С. 92-94.

28. Ковальчук Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология-Метод указания- Красноярск, 2000. - 52 с.

29. Ковальчук Н.М., Карапунарлы С.Ш., Замятин,К.А. Изучение микрофлоры пещер из окрестностей г. Красноярска // Экология и проблемы защиты окружающей среды: Мат-лы Всерос. науч. конф. - Красноярск, 2000. - С. 123.

30. Ковальчук Н.М. Актуальные аспекты эшерихиоза у сельскохозяйственных животных // Вестн. КрасГАУ. - 2001. - Вып. 7. - С. 59-62.

31. Ковальчук Н.М. Правила отбора, консервирования и пересылки образцов для микробиологических исследований: Метод указания. - Красноярск, 2001. -29 с.

32. Ковальчук Н.М. Антигенная вариабельность и вирулентность эпизоотических штаммов эшерихий // Природные и интеллектуальные ресурсы Сибири (Сибресурс-7-2001): Мат-лы VII Международ, науч.-практ. конф. - Барнаул-Томск, 2001: - С. 269- 271.

33. Ковальчук Н.М., Шапченкова Т.Н. Особенности фагоцитарной активности нейтрофилов у новорожденных телят при острых кишечных инфекциях // Вестн. КрасГАУ. - 2002. - Вып. 8. - С.98-100.

34. Ковальчук Н.М. Использование природных минералов для профилактики желудочно-кишечных болезней телят // Достижения ветеринарной медицины - XXI веку: Мат-лы Международ, науч. конф. - Барнаул, 2002. - С. 149-152.

35. Ковальчук Н.М. Практикум по микробиологии. Ч. 1. Морфология и физиология микроорганизмов. - Красноярск, 2002. - 67 с.

36. Ковальчук Н.М., Лезова А.А. Эпизоотологические особенности эшерихиоза поросят в условиях Красноярского края // Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных: Мат-лы Международ, науч.-практ. конф. - Улан-Удэ, 2003. - **С. 120-121.**

37. Ковальчук Н.М. Проблемы эшерихиоза телят в условиях экологического неблагополучия // Инновационные технологии в аграрном образовании, науке и АПК России: Мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. - Ульяновск, 2003.-С. 229-231.

38. Ковальчук Н.М. Актуальные проблемы эшерихиоза телят в современных условиях экологического неблагополучия // Аграрная наука на рубеже веков: Мат-лы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию КрасГАУ. - Красноярск, 2003. - **С. 142-144.**

39. Ковальчук Н.М., Карапунарлы С.Ш. К вопросу диагностики и профилактики острых кишечных инфекций новорожденных телят // Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве, растениевс,стве и экономике: Мат-лы регион науч.-практ. конф. - Томск, 2003. - С. 84-d8.

40. Ковальчук Н.М. Комплексная оценка эшерихиоза телят в условиях экологического неблагополучия Красноярского фая // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии: Мат-лы Международ, науч.-практ. конф. - Оренбург, 2003. - С. 380-382.

41. Ковальчук Н.М. Этиологическое значение условно-патогенных бактерий при диареях новорожденных телят в хозяйствах южной зоны Красноярского края // Вестн. КрасГАУ. - 2003. - № 3. - С. 154-158.

42. Ковальчук Н.М. Современные представления о патогенезе желудочно-кишечных инфекций // Вестн. КрасГАУ. - 2004. - № 4. - С. 127-130.

43. Ковальчук Н.М. Методы определения показателей естественной резистентности у крупного рогатого скота: Методические рекомендации / Н.М. Ковальчук, С.А. Донков / РАСХН Сиб. отд-ние ИЭВСиДВ. - Красноярск, 2004. - 70 с.

44. Ковальчук Н.М. Влияние природного энтеросорбента на сохранность и естественную резистентность новорожденных телят // Ветеринария. - 2004. - № 4. - С. 45-47.

45. Ковальчук Н.М. Этиопатогенетическая взаимосвязь между маститом коров и энтероколитом у новорожденных телят в молочивный период // Молочное и мясное скотоводство. - 2004. - № 6. - С. 37-39.

46. Ковальчук Н.М. Экологические проблемы факторных инфекционных болезней новорожденных телят в современных условиях // Актуальные аспекты экологической, сравнительно-видовой, возрастной и экспериментальной морфологии: Мат-лы междунаро, науч.-практ. конф. - Улан-Удэ, 2004. - С. 98-99.

47. Ковальчук Н.М. Клиническое значение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при острых кишечных инфекциях новорожденных телят // Актуальные аспекты экологической, сравнительно-видовой, возрастной и экспериментальной морфологии: Мат-лы междунаро, науч.-практ. конф. - Улан-Удэ, 2004. - С. 95-98.

48. Эколо-этиологические аспекты колибактериоза телят в условиях Средней Сибири (научная монография). / Краснояр. гос. аграр. ун-т. - Красноярск, 2004. - 260 с.

49. Ковальчук Н.М. Желудочно-кишечные болезни новорожденных телят в условиях Сибири (особенности эпизоотологии, патогенез, характер клинического проявления и меры борьбы): Метод, реком./ Состав. Н.М. Ковальчук, А.С. Кашин, А.П. Гречкин, В.Н. Чулков, Н.Н. Шкиль / РАСХН Сиб. отделение ИЭВС и ДВ. - Барнаул, 2004, 90 с.

50. Ковальчук Н.М., Вольвачев В.Н. Дифференциальная диагностика острых кишечных заболеваний телят: Метод, пособие КИПК АПК. - Красноярск, 2004. - 21 с.

Сдано в производство 22.09.2004 г. Ризограф Тираж 100 Заказ 293

Издательско-полиграфический отдел
ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина.

109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

16428