

Овчинников Александр Константинович

**ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ РОЛЬ
СПОРОБАКТЕРИНА В СХЕМАХ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗ У ТЕЛЯТ**

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2004

Работа выполнена в кафедрах эпизоотологии и паразитологии, физиологии и патофизиологии ФГОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет», в Октябрьской межрайонной ветеринарной лаборатории

Научные руководители: заслуженный ветеринарный врач РФ,
 доктор ветеринарных наук, профессор
Жданов Петр Иванович

 заслуженный деятель науки РФ,
 доктор ветеринарных наук, профессор
Мешков Виктор Михайлович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
 Андреева Альфия Васильевна

 кандидат биологических наук
Хазипов Руستم Барисович

Ведущая организация – ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Защита состоится 3 декабря 2004 на заседании диссертационного совета Д. 220.003.03. при ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет» (450001. г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 34)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»

Автореферат разослан 3 ноября 2004 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических
наук, профессор

Маннапова
Рамзия Тимергалеевна

4807

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Сальмонеллез, поражая преимущественно телят 10-30-дневного возраста, наносит значительный экономический ущерб хозяйствам (Архангельский И.И., Баданин Н.В., 1960; Ахмедов А.М., 1971; Маннапова Р.Т., 1996). Сальмонеллезный процесс, как сообщают В.П. Урбан и соавт. (1996), может протекать спорадически или с большим охватом поголовья, сопровождаясь высокой летальностью.

В системе противосальмонеллезных мероприятий основной упор делается на вакцинопрофилактику болезни (Корсакова Е.Н., 2001). При этом если телят получают от неиммунизированных коров, вакцинацию их проводят в 10-дневном возрасте, с последующей ревакцинацией через 10 дней. Телят, получивших колостральный иммунитет, прививают вакциной против паратифа (сальмонеллеза) в 20-дневном возрасте. Несмотря на такую тактику, сальмонеллез у телят имеет широкое распространение в хозяйствах Тюльганского и Октябрьского районов Оренбургской области (Данные отчетности РУВ за период 1990-2000 гг.).

В последние годы при лечении животных с преимущественным поражением пищеварительной системы, в том числе и инфекционной этиологии, используются пробиотики (Жданов П.И., 1994; Тараканов Б.В., 2000; Малик Н.И., Панин Л.П., 2001). Они содействуют восстановлению кишечного биоценоза, нарушенного болезнью.

Основываясь на положительном опыте применения споробактерина, изготовленного на основе *B. subtilis*, для профилактики болезней молодняка (Жданов П.И., 1994; Михин Г.Г., 1996; Старухин П.П. и соавт, 1996), мы поставили перед собой

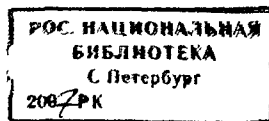
1.2 цель – проверить эффективность применения споробактерина новорожденным телятам в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллезной инфекции в стационарно неблагополучных хозяйствах.

При реализации поставленной цели решались следующие задачи – испытывалось антагонистическое действие споробактерина по отношению к *S. enteritidis* – основному возбудителю сальмонеллеза у телят Оренбургской области. Проведялось антагонистическое действие в двух вариантах: *in vitro* – методом совместного культивирования обоих видов микроорганизмов на МПБ и методом штриховых посевов на среде Гаузе № 2; *in vivo* – на мышах при создании экспериментальной модели сальмонеллеза.

- проверялась иммуномодулирующая роль споробактерина у кроликов при вакцинации их против сальмонеллеза;

- определялась продолжительность курсов назначения споробактерина новорожденным телятам при вакцинации их против сальмонеллеза в 10-, 20-, 30- и 40-дневном возрасте;

- изучались факторы неспецифической защиты организма месячных телят, а также динамика поствакцинальных антител при различных дозах и схемах предварительного назначения им споробактерина;



- рассчитывалась экономическая эффективность применения споробактерина в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллеза у телят.

1.3. Научная новизна проведенных исследований состоит в том, что, во-первых для получения прочного и продолжительного поствакцинального противосальмонеллезного иммунитета предложено предварительное курсовое назначение споробактерина вакцинируемым телятам.

Во-вторых, научно обосновано проведение активной иммунизации телят против сальмонеллеза в 20-30-дневном возрасте, при условии ежедневного приема ими с молозивом (молоком) споробактерина.

В-третьих, созданы предпосылки для управления сальмонеллезным процессом в хозяйствах, стационарно неблагополучных по этой инфекции.

1.4. Теоретическая и практическая значимость работы. Учение об инфекционном и эпизоотическом сальмонеллезном процессах пополнилось новыми данными, которые должны учитываться специалистами соответствующего профиля при разработке рекомендаций по специфической профилактике данной болезни; при подготовке и переподготовке специалистов ветеринарной медицины; при написании монографической литературы.

Многолетний опыт применения споробактерина в хозяйствах, разводящих крупный рогатый скот симментальской и красной степной пород убедительно доказал, что это позволяет повысить устойчивость организма к болезням вообще и к сальмонеллезу, в частности, то есть воздействовать на третье звено эпизоотического процесса, разрывая эпизоотическую цепь.

1.5. Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: Международном симпозиуме «Социально-экономические, политические и экологические проблемы в сельском хозяйстве России и стран СНГ: История и современность» (Оренбург, 2004); Российской научно-практической конференции, посвященной 50-летию освоения целинных земель, 15-17 сентября 2004 года, г. Оренбург (Оренбург, 2004); расширенном заседании кафедр эпизоотологии и паразитологии, физиологии и патофизиологии ФГОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет» (2004)., научных конференциях факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Оренбургского ГАУ (2001-2004).

1.6. Публикации результатов исследований. По результатам исследований вышло 4 научные работы, опубликованные в материалах научно-практических конференций, симпозиумов и трудах научных учреждений.

1.7. Основные научные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Споробактерин, изготовленный на основе *B. subtilis* шт. 534, обладает антагонистическим действием по отношению к *S. enteritidis*, что подтверждается экспериментами как *in vitro*, так и *in vivo*.

2. Споробактерин жидкий проявляет иммуномодулирующий эффект при вакцинации кроликов против сальмонеллеза.

3. При длительном (3-4-недельном) применении новорожденным телятам и телятам молочного периода споробактерин повышает устойчивость их организма

к болезням, и позволяет получить более напряженный поствакцинальный иммунитет, т.е. воздействует на третье звено эпизоотической цепи.

4. При использовании споробактерина в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллеза телят на каждый вложенный рубль можно получить от 5 до 14 рублей дохода.

1.8. Объем и структура диссертации. Диссертация включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, выводы, предложения производству, список литературы, который содержит 270 наименований, в т.ч. 78 иностранных авторов. Работа изложена на 130 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 10 таблицами, 25 рисунками.

III. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материал и методы исследования

Работа проводилась в период с 1999 по 2004 годы в кафедрах эпизоотологии и паразитологии, физиологии и патофизиологии ФГОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет», в Октябрьской межрайонной ветеринарной лаборатории, а также в трех хозяйствах Тюльганского и Октябрьского районов Оренбургской области. Общая схема экспериментов приводится в таблице 1.

Из нее следует, что работа проходила в три этапа. На первом из них *in vitro* и *in vivo* устанавливалась антагонистическая активность *B. subtilis* шт. 534 на основе которой готовился споробактерин (10-млрд. взвесь в 1-7% растворе NaCl), по отношению к *S. enteritidis*, чаще всего вызывающей сальмонеллез у телят. При этом применяли метод совместного культивирования и метод штриховых посевов на среде Гаузе № 2 (Биргер М.О. и соавт., 1982; Сидоров М.А. и соавт., 1995). Антагонистическое действие споробактерина *in vivo* проверяли на мышах с живой массой $16,0 \pm 1,00$ граммов. Десятидневный курс назначения споробактерина начинали в день заражения, через одни и двое суток после заражения летальной дозой сальмонелл. За подопытными животными вели ежедневное клиническое наблюдение. В случае заболевания мышей, учитывали время появления симптомов болезни, продолжительность переболевания, сроки выздоровления больных, а если они погибали, - то результаты патологоанатомического вскрытия. Для объективности исследования больных и наиболее характерные изменения в трупах заснимали на фотопленку.

Второй этап исследований был посвящен изучению иммуномодулирующей роли споробактерина при вакцинации кроликов против сальмонеллеза. С этой целью десяти кроликам, массой тела $2000,0 \pm 20,00$ граммов, споробактерин вводили *per os* перед вакцинацией в течение 20 дней подряд и еще 10 дней после нее (до ревакцинации), т.е. общий курс назначения им составлял 30 дней (первая опытная группа). Кроликам-аналогам второй группы испытуемый препарат применялся в течение десяти суток до и после вакцинации (курс - 20 дней).

1. Схема опытов

№ № п/п	Задача исследования	Место проведения	Объект исследования	Метод исследования	Кол-во проб, животных	Варианты назначения споробактерина животным	Сроки исследования	Оценочные критерии
I	Определение антагонистической активности <i>B subtilis</i> шт. 534 и <i>S enteritidis</i>	Оренбургский ГАУ, Октябрьская ветлаборатория	культуры микроорганизмов	бактериологический				
	1 in vitro	-----/-----		совместное культивирование	12	Одновременно с ATCC 25 923 штаммом <i>S enteritidis</i>	12,18,20,24, 48,72,96 час	Кол-во колоний
				штриховых посевов	29	После 1-5-суточного подращивания <i>B subtilis</i> на среде Гаузе № 2	18,24,48, 60 часов	Зона задержки роста
II	2 in vivo	-----/-----	-----/----- мыши	биологический	40, в т ч 10 контрольных	1 в момент заражения 2 через сутки 3 двое суток после заражения, 10 дней подряд	ежедневно в течение 10 суток	Заболеемость, тяжесть болезни, летальность
	Изучение иммуномодулирующей роли споробактерина при вакцинации	-----/-----	вакцина против паратифа телят, кролики	эпизоотологический, серологический (РА)	40, в т ч 10 контрольных	1 за 20 дней до вакцинации и 10 суток после нее 2 за 10 дней до и после вакцинации 3 в день вакцинации и 10 суток после нее	Фон через 10,30,60,90, 120,150,180 и 210 суток после вакцинации	Клинический статус, титр антител

№ № п/п	Задача исследования	Место проведе- ния	Объект исследова- ния	Метод исследования	Кол-во животных	Варианты назначения споробактерина жи- вотным	Сроки ис- следования	Оценоч- ные кри- терии
III	Применение спо- робактерина в системе специфиче- ской вакцино- профилактике сальмонеллеза те- лят	ООО «Димитро- во» Тюльганского района, март 1999- сентябрь 2000 г	Телята сим- ментальной породы, вак- цина против паратифа те- лят	Клинический, эпизо- отологический, гема- тологический, биохи- мический, фагоцитоз, БАС, ЛАС, бета- литическ , компле- ментарная	164, в т ч 52 контрольных	5 мл 2 раза в сутки 1) 10 дней подряд 2) 20 дней подряд 3) 30 дней подряд	с рождения до 5-и ме- сяцев В месячном возрасте	клинико- гемато- логиче- ский ста- тус, фак- торы ес- тествен- ной рез- стентно- сти
		Колхоз им Чка- лова Тюльганско- го района, фев- раль-октябрь 2001 г	Телята крас- ной степной породы, вак- цина против паратифа те- лят	серологический (РА) -----//-----	152, в т ч 44 контрольных	3 мл 3 раза в сутки а) 10 суток б) 20 суток в) 30 суток	Фон через 10,30,60,90 суток -----//-----	Титр ан- тител -----//-----
		ЗАО «Нива» Ока- тябрьского рай- она, февраль – июнь 2004 г.	-----//-----	-----//-----	40, в т ч 13 контрольных	3 мл 3 раза в сутки а) 20 суток б) 30 суток	-----//-----	-----//-----

Примечание вакцинация всех подопытных телят, принадлежащих ООО «Димитрово» и колхозу им Чкалова, проводилась в четыре срока – 10-, 20-, 30- и 40-дневном возрасте На каждый срок ставилась самостоятельная серия В ЗАО «Нива» поставлено две серии с испытанием вакцинации в 20- и 30-дневном возрасте телят

Животным третьей группы споробактерин назначался в течение десяти суток после вакцинации, т.е. между вакцинацией и ревакцинацией. Особи контрольной группы препарат не получали, их вакцинировали, а через десять суток – ревакцинировали. Кроликам всех подопытных групп применяли вакцину против паратифа телят. За ними вели ежедневное клиническое наблюдение в течение семимесяцев. У них определяли титр противосальмонеллезных антител принятым в серологической практике методом (Антонов Б.И. и соавт., 1986). Исследования проводили перед вакцинацией, а потом через 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180 и 210 суток после нее.

Третий этап экспериментов был поставлен в натуральных условиях производства с отработкой доз и курсов назначения споробактерина телятам, которые в дальнейшем подлежали вакцинации против сальмонеллеза. Причем изучались разные сроки проведения вакцинации – в 10-, 20-, 30- и 40-дневном возрасте телят симментальской и красной степной пород. Первым из них споробактерин назначался 2 раза в сутки по 5 мл на прием, а вторым – 3 раза по 3 мл. Что же касается методологических подходов к продолжительности курсов назначения споробактерина, пути введения препарата, то они во всех сериях были одинаковыми. А именно: препарат начинали применять с рождения телят и в течение последующих 10 (первая опытная группа), 20 (вторая опытная) и 30 (третья опытная) суток его жизни, добавляя споробактерин к молозиву (молоку). Животные контрольной группы препарат не получали, но вакцинировались и ревакцинировались против сальмонеллеза в те же сроки, что и особи опытных групп. Во всех четырех сериях опытов, у животных обеих пород в месячном возрасте, общепринятым и в гематологии методом и, определяли количество эритроцитов и лейкоцитов в единице объема крови, содержание гемоглобина, лейкограмму, а в сыроворотке крови – общий белок (рефрактометрически) и гамма-глобулиновую фракцию – турбидиметрически (по Кондрахину И.П.). Кроме того, изучались гуморальные факторы неспецифической защиты – бактерицидная, лизоцимная, бета-литическая активности (по Бухарину О.В. и соавт.), комплементарная активность (по Вагнеру Г.Ф.). Фагоцитарную активность сегментоядерных нейтрофилов крови устанавливали по А.И. Иванову и Б.А. Чухловину.

Об иммуногенности вакцины судили по изменению титра противосальмонеллезных антител, проводя фоновое исследование, а затем повторяя их через 10, 30, 60 и 90 дней после вакцинации.

Весь экспериментальный материал в разрезе групп и серий подвергнут биометрической обработке с использованием компьютерных программ. Достоверность различий сравниваемых групп устанавливалась по таблицам Стьюдента.

2.2. Результаты собственных исследований и их обсуждение

2.2.1. Определение антагонистической активности споробактерина *in vitro* методом совместного культивирования

После внесения в пробирки с МПБ стандартизованных взвесей споробактерина и *S. enteritidis* и инкубирования в термостате, оценку численности остав-

шихся в живых сальмонелл давали в течение 96 часов на 12, 18, 24, 48, 72 и 96 часу совместного культивирования. В результате анализа полученных при этом данных, установили, что в период с 12 по 18 час произошло сокращение численности сальмонелл в смешанной культуре на 1,02 млрд./мл, тогда как в монокультуре – на 0,32 млрд./мл. Разница как между этими значениями, так и результатами по бикультуре на 12 часов, высокодостоверна ($p < 0,001$). Поскольку в составе препарата *B. subtilis* преимущественно находится в споровой форме (отсюда и название его – споробактерин), требовалось время (более 12 часов) для вегетации. Именно в процессе прорастания спор в среду выделяются биологически активные вещества, которые и обеспечивают антагонистический эффект. Этот эффект проявляется во все временные сроки (24, 48, 72 и 96 часов), потому что количество живых сальмонелл снижалось с $15,55 \pm 0,039$ млрд./мл на 18 часов до $0,86 \pm 0,027$ млрд./мл на конец наблюдения. Между тем численность живых сальмонелл уменьшалась и в монокультуре, но менее стремительно, что вполне объяснимо с точки зрения закономерности роста микроорганизмов на несменяемых питательных средах. Таким образом, проведенные исследования убедили нас в существовании антагонизма между *B. subtilis* и *S. enteritidis* – основным возбудителем сальмонеллеза телят.

2.2.2. Определение антагонистической активности споробактерина *in vitro* методом штриховых посевов

Получив столь обнадеживающие результаты, мы решили выяснить, в какие сроки вегетации *B. subtilis* выделяет бактерицидные факторы, и в течение какого времени они сохраняются в среде культивирования. Используя метод штриховых посевов на среде Гаузе № 2, мы имели возможность ответить на эти вопросы. В частности, нами установлено, что наибольшая зона задержки роста сальмонелл – $11,5 \pm 0,18$ мм, сформировалась в чашках, где предварительное подращивание *B. subtilis* велось в течение 48 часов. Несколько меньше – $9,5 \pm 0,056$ мм, этот результат оказался в пробах после суточного подращивания. Третий результат по рассматриваемому параметру – $4,99 \pm 0,075$ мм – при 60-часовом подращивании *B. subtilis*. На основании этих данных считаем, что первые порции антагонистических факторов поступают в среду культивирования *B. subtilis* к 18 часу, в дальнейшем вплоть до 48 часов идет увеличение их количества, а к 60 часу – резкое снижение. Отсюда, для получения специфического действия споробактерина, животным его надо назначать ежедневно или, в крайнем случае, один раз в двое суток.

2.2.3 Определение антагонистической активности споробактерина *in vivo*

Работу проводили на мышах, заражая их летальной дозой (LD_{100}) *S. enteritidis* шт. ATCC 25923. В качестве протектора использовали курсовое назначение споробактерина. В ходе анализа полученных материалов, мы установили, что в первой опытной группе, представителям которой споробактерин начали вводить

в день экспериментального заражения сальмонеллами, больных не было вообще, то есть споробактерин здесь обеспечил 100% профилактический эффект. Во второй опытной группе, где курс назначения споробактерина был начат спустя одни сутки после инфицирования животных сальмонеллами, заболело и выздоровело двое мышей. Продолжительность болезни здесь составила $9,6 \pm 0,640$ против $108,0 \pm 0,400$ часа в контроле. Заболеваемость во второй группе равнялась 20%, что существенно ($p < 0,001$) меньше контроля, профилактическая эффективность – 80%, а терапевтическая – 100%. Иная ситуация сложилась в третьей группе, в которой споробактерин стали применять мышам через двое суток после заражения. Здесь заболели все 10 мышей, но тяжесть болезни у них была разной. Двое мышей выздоровели в течение 2-3 суток, трое – 4 суток, а пятеро – 5 суток. Средняя продолжительность болезни – 100,8 часа. Следовательно, споробактерин в этой группе проявил 100% лечебную эффективность. В контрольной группе также заболели все 10 животных. Болезнь у них проявлялась токсикозом и острым течением, на 4-5-е сутки заболевшие погибали. Итак, в данной группе отмечена 100% заболеваемость и такая же летальность.

Резюмируя по этому этапу исследования, можно сказать, что споробактерин, будучи своевременно назначенным инфицированным сальмонеллами животным, способен упредить клиническое проявление сальмонеллезного процесса. В тех же случаях, когда препарат назначался на стадии инкубационного или продромального развития сальмонеллезного процесса, он ослаблял клиническое проявление сальмонеллеза и в конечном счете содействовал выздоровлению заболевших. Мы разделяем точку зрения В.И. Никитенко (1990), который считает, что *B. subtilis* шт. 534 в организме животных и человека продуцирует антибиотические вещества с широким спектром действия, а также протеолитические ферменты. Последние могли вызвать разрушение О-антигена, который обеспечивает весь симптомокомплекс при сальмонеллезе (Ахмедов А.М., 1971; Bergey's, 1974).

2.3 Изучение иммуномодулирующей роли споробактерина при вакцинации

Основываясь на положительных результатах своих исследований по применению споробактерина при экспериментальной сальмонеллезной инфекции у мышей, мы посчитали, что споробактерин может проявить иммуномодулирующее действие и при вакцинации животных против сальмонеллеза. Для проверки этой гипотезы поставили эксперимент на кроликах, а потом и телятах. Анализ полученных при этом результатов у кроликов показал, что более активно синтез антител шел у особей первой опытной группы, которых вакцинировали на фоне 30-суточного назначения споробактерина.

Примечательно, что у них был не только высокий титр (1:400), но и сохранялся он на этом уровне 4 месяца. Между тем у кроликов, получавших споробактерин в течение 20 дней, высокий титр (1:400) антител обнаруживался на протяжении только трех месяцев. У представителей третьей и четвертой контрольных групп иммуногенез шел почти однотипно по интенсивности (максимум составил 1:200), но в опытной группе титр антител на уровне 1:100 продержался на один

месяц больше. Эти результаты созвучны тем, которые в свое время получил В.И. Никитенко (1990) и объяснил это явлением транслокации бацилл – проникновением из желудочно-кишечного тракта в кровь и лимфу бактерий, вследствие чего активизируются защитные реакции макроорганизма в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры. В.В. Подберезным, Н.И. Полянцевым (1994) было установлено, что под действием пробиотика наблюдается гиперплазия лимфоидной ткани с увеличением численности макрофагов, а также плазматических клеток. Последние, как известно, преобразуют гамма-глобулины сыворотки крови в иммунные глобулины (антитела).

Итак, на лабораторных животных было убедительно показано, что 30-суточное применение споробактерина перед вакцинацией против сальмонеллеза способствует формированию довольно продолжительного (более семи месяцев) и напряженного поствакцинального иммунитета. Теперь предстояло проверить целесообразность подобного подхода к вакцинации в стационарно неблагополучных по сальмонеллезу телят хозяйствах.

2.4. Применение споробактерина в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллеза телят

2.4.1. Результаты исследований в ООО «Димитрово» Тюльганского района

Анализ гематологических, биохимических параметров, а также клеточных и гуморальных факторов неспецифической защиты организма, убедил нас в том, что в одноименных группах, но в разные серии, получены однотипные результаты, поэтому мы их объединили и рассматриваем в консолидированном виде для соответствующих групп. В таблице 2 представлены эти данные.

2. Гематологические показатели у подопытных телят симментальской породы в месячном возрасте

Гематологический показатель		Исследуемая группа телят							
		1-я опытная		2-я опытная		3-я опытная		4-я контрольная	
		$\bar{X} \pm S\bar{X}$		$\bar{X} \pm S\bar{X}$		$\bar{X} \pm S\bar{X}$		$\bar{X} \pm S\bar{X}$	
Эритроциты, Т/л		7,48	0,093	7,73	0,056	7,90	0,069	7,04	0,040
Лейкоциты, Г/л		11,03	0,011	10,56	0,026	9,43	0,020	12,07	0,014
Гемоглобин, г/л		109,87	0,602	111,88	0,487	116,55	0,285	104,73	0,110
Нейтрофилы	палочкоядерные, %	4,45	0,009	4,54	0,010	4,30	0,026	5,48	0,018
	сегментоядерные, %	20,12	0,027	19,82	0,035	20,47	0,019	23,75	0,038
	Лимфоциты, %	74,49	0,069	74,50	0,038	74,05	0,035	66,78	0,053

Из данных табл. 2, следует, что показатели красной крови у телят опытных групп были существенно лучше, чем у животных контрольной группы. Причем чем больше по времени применялся им споробактерин, тем выше рассматриваемые показатели. Отсюда есть существенные различия и внутри опытных групп – между первой и второй, первой и третьей, второй и третьей. Считаем, что такой эффект обусловлен действием продуктов жизнедеятельности *B. subtilis* на эритроидный росток миелопоэза. Отчего лучше идет образование дефинитивных форм эритроцитов.

Изменения количества лейкоцитов шли в прямо противоположном направлении. В частности, численность лейкоцитов в единице объема крови была наивысшей у контрольных животных, а существенно меньшей, но оптимальной – в опытных группах. У телят третьей группы лейкоцитов было меньше, чем у особей первой и второй, а во второй – чем у животных первой группы. Менялся и видовой состав лейкоцитов. Так, под действием споробактерина больше стало лимфоцитов ($p < 0,001$) и меньше – палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, чем в контроле. По всей видимости, продукты, выделяемые *B. subtilis*, влияют и на клетки-предшественники лимфоцитопоэза, оптимизируя их дифференцировку.

Изучение белкового состава сыворотки крови и факторов неспецифической защиты организма подопытных телят обнаружило изменение и этих показателей (табл. 3).

3. Биохимические показатели и факторы неспецифической защиты организма подопытных телят месячного возраста

Изучаемый показатель	Исследуемая группа							
	1-я опытная		2-я опытная		3-я опытная		4-я контрольная	
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$		$\bar{X} \pm S\bar{x}$		$\bar{X} \pm S\bar{x}$		$\bar{X} \pm S\bar{x}$	
Общий белок сыворотки, г/л	71,08	0,111	72,32	0,444	75,79	0,621	67,54	0,221
Гамма-глобулин, г/л	10,11	0,025	10,62	0,018	13,07	0,051	8,02	0,013
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	42,27	0,002	43,15	0,003	43,78	0,001	39,46	0,001
БАС, %	40,72	0,117	42,73	0,050	43,19	0,045	32,49	0,158
ЛАС, %	6,55	0,012	5,85	0,033	5,68	0,012	7,99	0,025
Бета-литическая активность, %	8,95	0,017	10,15	0,021	10,84	0,024	7,27	0,031
Комплементарная активность, %	29,36	0,302	32,52	0,501	34,87	0,391	21,65	0,698

Так, уровень общего белка и гамма-глобулинов в сыворотке крови телят опытных групп достоверно возрос. Полагаем, что это обусловлено лучшим усвоением составных частей корма и образованием *B. subtilis* незаменимых аминокислот.

кислот, которые и используются белоксинтезирующим и структурам и печени, лимфоузлов и др. в качестве пластического материала. На оптимизацию перевариваемости корма при приеме пробиотиков указывали Н.Е. Ездаков (1976); В.В. Смирнов и соавт. (1982); П.И. Жданов, В.А. Сечин (1994).

Модулирующее действие споробактерина сказалось на клеточном и гуморальном звеньях неспецифической защиты организма. Причем, если активность фагоцитов, бактерицидного фактора, бета-лизина и системы комплемента существенно возросла при приеме споробактерина, то лизоцимная активность сыворотки крови – снизилась. Такой расклад мы объясняем адекватностью реагирования организма телят опытных групп.

Известно, что острые кишечные болезни (ОКЗ) чаще возникают в раннем возрасте, а острые респираторные заболевания – в 15-20-дневном возрасте (Девришов Д.А., 2000). Отсюда повышение бактерицидной активности сыворотки крови, сдерживающей развитие грамотрицательной микрофлоры (Бухарин О.В. и соавт., 1979), а также бета-литической активности, обеспечивающей защиту от спорообразующих микроорганизмов (Бухарин О.В., Васильев Н.В., 1974), становится как нельзя кстати.

Представление о динамике специфического гуморального ответа у подопытных животных в разрезе серий, можно получить при знакомстве с диаграммами 1-4. Из данных рисунка 1 следует, что у представителей всех групп фон был отрицательным, а через 10 суток после вакцинации титр антител был невысоким (1:50). В 30- и 60-дневном возрасте он стал на порядок выше, а максимум в этой серии (1:200) пришелся на 90 день после вакцинации.



Рис. 1. Динамика титра противосальмонеллезных антител у подопытных телят в первой серии.

При вакцинации телят в 20-дневном возрасте иммунный ответ оказался более содержательным, а именно уже при исследовании через 10 суток после вакцинации у особей опытных групп титр антител составил 1:100, а затем – 1:200. При двух последующих исследованиях во второй и третьей группах он равнялся 1:400, что существенно отличало его от аналогичного показателя в контроле и первой опытной группе.

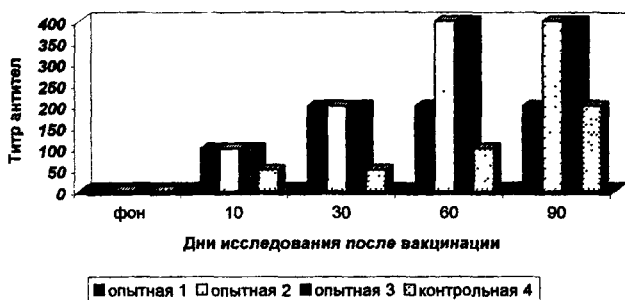


Рис. 2. Динамика титра антител у подопытных телят во второй серии.

При фоновом исследовании в месячном возрасте (рис.3) телята контрольной группы реагировали положительно. У них шла реакция в титре 1:50. Это может быть связано со спонтанным инфицированием их, что трудно исключить в стационарно неблагополучных по сальмонеллезу хозяйствах. В дальнейшем, как у представителей этой, так и опытных групп, иммунотитр протекал, как и в предыдущей серии, с той лишь разницей, что в эту серию во второй и третьей опытных группах создавался более высокий уровень антител – они обнаруживались даже в разведении сыворотки 1:800.



Рис. 3. Динамика титра противосальмонеллезных антител у подопытных телят в третьей серии.

В четвертой серии (рис. 4) ситуация по контрольным животным в исходном состоянии сложилась такой же, что и в третьей серии. Однако в течение ближайших двух месяцев после вакцинации у них иммунотитр шел более активно, отчетливо уровень антител достиг самых высоких за все серии экспериментов значений – 1:400 ($p < 0,001$). Из этого следует, что к 40-дневному возрасту телят симментальской породы, очевидно, наступает функциональная зрелость иммунной системы.



Рис. 4. Динамика титра противосальмонеллезных антител у подопытных телят в четвертой серии.

Назначение споробактерина, как свидетельствуют данные по второй и третьей опытным группам, способствует более качественному становлению – начиная со второго исследования представители этих групп по уровню антител существенно превосходили своих сверстников из первой опытной и контрольной групп. Важно отметить, что при такой схеме вакцинации формируется не только напряженный, но и более продолжительный иммунитет.

Итак, на качество иммунного ответа у подопытных телят влиял возраст, в котором проводилась вакцинация (чем моложе, тем слабее – подобное наблюдение имел и Д.А. Девришов, 2000), и продолжительность курса назначения споробактерина (при 10-дневном курсе эффект слабее, при 20-30-дневном – лучше).

2.4.2. Результаты исследований в колхозе им. Чкалова Тюльганского района

В этом хозяйстве эксперимент был поставлен на телятах красной степной породы – второй по численности в Оренбургской области. Он также проводился в четыре серии, каждая из которых посвящена определенному сроку вакцинации (в 10-, 20-, 30- и 40-дневном возрасте). Учитывая меньшую массу тела телят этой породы при рождении, споробактерин назначали по 3 мл на прием, 3 раза в сутки.

Если в целом охарактеризовать результаты второго научно-производственного опыта, то они созвучны тем, которые были получены в первом. Породная принадлежность наложила некоторый отпечаток лишь на количественную сторону изучаемых параметров, не затрагивая закономерностей по сути явлений. Так, в этом эксперименте подтвердилось модулирующее действие споробактерина на красную и белую кровь, общий белок и гамма-глобулиновую фракцию, клеточные и гуморальные факторы неспецифической защиты, динамику противосальмонеллезных антител. А напряженность иммунитета зависела от возраста вакцинируемого животного и времени, в течение которого назначался перед этим споробактерин.

2.4.3. Результаты исследований в ЗАО «Нива» Октябрьского района

Эксперименты ставились на телятах красной степной породы в хозяйстве в экономическом отношении. Необходимость их проведения диктовалась желанием проверить еще раз, насколько жизненны предлагаемые нами схемы применения споробактерина в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллеза. Учитывая результаты двух экспериментов в хозяйствах Тюльганского района, здесь мы отказались от вакцинации животных в 10- и 40-дневном возрасте, а также от 10-дневного назначения споробактерина. В итоге эти эксперименты поставлены в две серии – 20- и 30-дневный возраст вакцинируемых телят, и на двух опытных и одной контрольной группах животных. Биометрическая обработка полученных при этом результатов и сравнительный анализ в разрезе хозяйств показали, что мы находимся на правильном пути. Отсюда в систему противосальмонеллезных мероприятий должны быть внесены коррективы в виде 20-30-суточного назначения споробактерина перед вакцинацией.

2.5. Экономическая эффективность применения споробактерина в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллеза

Расчеты по экономической эффективности делались по результатам эксперимента в ООО «Димитрово» Тюльганского района. При этом пользовались формулами, предлагаемыми И.Н. Никитиным и В.Ф. Воскобойником (1999). Ввиду высокой заболеваемости (45 из 52 телят) и гибели 18 животных в контрольной группе, хозяйство понесло убытки в сумме 55456,2 рубля. В первой опытной группе заболело 8 телят, из-за снижения прироста массы тела хозяйство недополучило 84 рубля, предотвращенный ущерб здесь составил 11547,67 рубля. На приобретение споробактерина затратили 1560 рублей. Отсюда экономический эффект равен 9987,7 руб., а экономическая эффективность – 6,4 рубля. Во второй и третьей опытных группах больных не было. В связи с этим предотвращенный ущерб исчислялся соответственно в 27291,8 и 16292,5 рубля. На приобретение споробактерина хозяйство затратило 1800 и 2700 рублей соответственно. Экономический эффект по второй опытной группе составил 14,2, а по третьей – 5,03 рубля. Таким образом, с экономической точки зрения более предпочтительным оказалось 20-суточное назначение споробактерина, с вакцинацией в 20-дневном возрасте и ревакцинацией через 10 дней.

III ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы для профилактики болезней полифакторной этиологии все чаще используются пробиотики (Жданов П.И., 1994; Малик Н.И., Панин Л.П., 2001). Одним из них является споробактерин, изготовленный на основе *B. subtilis* шт. 534 (Никитенко В.И., 1990). Препарат прошел хорошую лабораторную апробацию, но недостаточно используется в клинической практике. Благодаря работам П.И. Жданова (1994), П.П. Старухина и соавт. (1996), Г.Г. Михина (1996),

П.И. Жданова и соавт. (1998), Л.Г. Войтенко и соавт. (2000), А.В. Мазаева (2003) его используют в ветеринарной медицине для профилактики диспепсии телят, ОКЗ и ОРЗ молодняка, послеродовых эндометритов у коров, раневой инфекции. Вопрос о применении споробактерина в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллеза у телят оставался открытым. Для его решения и были предприняты настоящие исследования. Они включали: 1) изучение антагонистических свойств *B. subtilis* в отношении *S. enteritidis* – основного возбудителя сальмонеллеза телят (Савинкова Н.М., Мешков В.М., 1992; Маннапова Р.Т., 1996). Используя специальные микробиологические методики, удалось доказать наличие антагонизма между *B. subtilis* и *S. enteritidis*, определить в какие сроки вегетации начинается выделение веществ с такими свойствами, и в течение какого времени они сохраняются в среде. Помимо этого, решен вопрос об антагонистических отношениях изучаемых микроорганизмов в организме животных на экспериментальной модели сальмонеллеза. Показано, что одновременное с заражением назначение споробактерина предупреждает развитие сальмонеллезной инфекции. Если курс назначения споробактерина начинается через сутки и двое после инфицирования, заболевание не исключается, но больные всегда излечиваются.

2) изучение иммуномодулирующей роли споробактерина при вакцинации против сальмонеллеза показало, что напряженность и продолжительность гуморального специфического иммунитета зависят от того, в течение какого срока назначается споробактерин.

Заключительная часть работы проводилась в натуральных условиях неблагополучных по сальмонеллезу хозяйств на телятах двух самых представительных в Оренбуржье пород – симментальской и красной степной. Общая численность подопытных животных составила 356 голов. При этом отработывались разные дозы, кратность (в течение суток) и схемы применения споробактерина, а также апробировались различные сроки проведения вакцинации – в 10-, 20-, 30- и 40-дневном возрасте. Было убедительно показано, что споробактерин проявляет модулирующее действие на клетки-предшественники лимфоцито- и миелопоэза, белоксинтезирующую функцию печени, работу структур, обеспечивающих гуморальную неспецифическую защиту организма, а также иммуногенез. В этом смысле наши данные согласуются с результатами, полученными П.И. Ждановым (1994), Г.Г. Михиным (1996), П.П. Старухиным, В.М. Мешковым, П.И. Ждановым (1996), П.И. Ждановым и соавт. (1998, 2000), А.В. Мазаевым (2003). Что касается сроков проведения вакцинации телят против сальмонеллеза, то она, по нашим данным биологического и экономического плана, должна проводиться в 20- и 30-дневном возрасте с ревакцинацией через 10 суток, на фоне ежедневного перорального назначения споробактерина в течение 3-4 недель. Эта часть наших результатов созвучна концепции Д.А. Девришова (2000).

IV ВЫВОДЫ

1. В *subtilis* шт. 534 в процессе своей жизнедеятельности выделяет факторы, которые подавляют развитие *S. enteritidis* как *in vitro*, так и *in vivo*.

2. Курсовое назначение споробактерина мышам, заражённым высокопатогенным штаммом сальмонелл, обеспечивает 80-100 % профилактический и 100% терапевтический эффект в зависимости от того, в какие сроки после инфицирования начинается курс.

3. Вакцинация кроликов против сальмонеллёза (паратифа), проведённая на фоне предварительного назначения им споробактерина, приводит к формированию более прочного и продолжительного специфического иммунитета, чем в контроле.

4. Действие споробактерина на организм телят обеих пород, содержащихся в натуральных условиях трёх хозяйствующих субъектов, было однотипным.

5. Назначение споробактерина новорождённым телятам в течение 20-30 суток подряд, в дозе 90-100 млрд. микробных тел в сутки, оказывает модулирующее влияние на кровь, её биохимический состав, клеточные и гуморальные факторы неспецифической защиты организма, а также на уровень поствакцинальных анти-тел.

6. Отнесение сроков вакцинации интактных телят против сальмонеллёза на 30-40 день их жизни способствует выработке противосальмонеллёзных антител в более высоких титрах, чем при иммунизации в 10-дневном возрасте.

7. Применение споробактерина телятам экономически выгодно.

V ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Для улучшения сохранности поголовья телят и повышения их продуктивности предлагаем с рождения и до 20-30-дневного возраста, не делая перерывов, добавлять к скармливаемому им молозиву (молоку) споробактерин жидкий по 3 мл на приём, 3 раза в сутки.

2. Профилактическую вакцинацию телят против сальмонеллёза рекомендуем проводить в 20-30-дневном возрасте, предваряя ей курсовое назначение споробактерина с рождения и в течение 20-30 суток. При этом если вакцинация проводится на 20-й день жизни теленка, через 10 суток введение вакцины нужно повторить, а на 30-й день - без повторения.

VI СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жданов П.И., Овчинников А.К. Эффективность применения споробактерина при экспериментальном сальмонеллезе у мышей //Социально-экономические, политические и экологические проблемы в сельском хозяйстве России и стран СНГ: История и современность: Материалы международного симпозиума. – Ч. II. – Оренбург: Издат. центр ОГАУ, 2004. – С. 307-309.

2. Мешков В.М., Овчинников А.К. Специфическая профилактика сальмонеллеза у телят при назначении им споробактерина // Известия ОГАУ. – 2004. – 2. – С. 149-151.
3. Овчинников А.К. Последствия вакцинации телят против сальмонеллеза при назначении споробактерина по разным схемам // Научные и практические аспекты повышения производства сельскохозяйственной продукции. – Оренбург: ПМГ ВНИИМСа, 2004. – С. 103-105.
4. Овчинников А.К. Изучение антагонистических свойств *B. subtilis* 534 против культуры сальмонелл // Известия ОГАУ. – 2004. – 2. – С. 148-149.
5. Овчинников А.К. Иммуномодулирующая роль споробактерина при вакцинации против сальмонеллеза // Проблемы устойчивости биоресурсов: Теория и практика: Материалы Российской научно-практической конференции, посвященной 50-летию освоения целинных земель 15-17 сентября 2004 года, г. Оренбург. – Оренбург: Издат. центр ОГАУ, 2004. – (в печати).

Подписано в печать 28.10.04.

Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1. Печать оперативная.

Бумага офсетная. Гарнитура Times.

Заказ № 906-З. Тираж 100 экз.

Изготовлено ООО «Лань и К^о»

РНБ Русский фонд

2007-4
4807

03 : 31 2004