

На правах рукописи

Шпонько Юрий Борисович

**ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ,  
ПРОФИЛАКТИКА И ТЕРАПИЯ ДИАРЕЙ  
ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ**

16 00 01 - диагностика болезней и терапия животных

16 00 03 - ветеринарная микробиология, эпизоотология,  
вирусология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук



Воронеж - 2007

Работа выполнена в Краснодарском научно-исследовательском ветеринарном институте Россельхозакадемии

Научные руководители

доктор ветеринарных наук,  
**Басова Наталья Юрьевна**  
кандидат ветеринарных наук  
**Колденко Наталья Владимировна**

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук, доцент  
**Никулин Иван Алексеевич**  
кандидат ветеринарных наук  
**Лебедев Максим Игоревич**

Ведущая организация

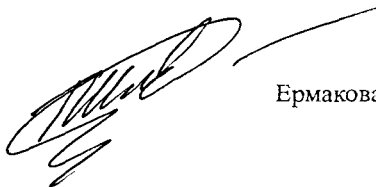
Северо-Кавказский зональный  
научно-исследовательский  
ветеринарный институт

Защита состоится «25» мая 2007 г в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 006 004 01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии (394087, г Воронеж, ул Ломоносова, 114-б)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИВИПФиТ

Автореферат разослан «24» апреля 2007 г

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Ермакова Т И

# 1. Общая характеристика работы

**Актуальность гемы** Одной из актуальнейших проблем современного животноводства является сохранность молодняка сельскохозяйственных животных. Гибель новорожденных происходит главным образом вследствие болезней желудочно-кишечного тракта, а колибактериоз (эшерихиоз) занимает значительное место среди заболеваний данной группы (Полоцкий Ю. Е., Бондаренко В. М., 1986, Ургуев К. Р., Нажалов М. Н., 1998, Сидоров М. А., Субботин В. В., 1999). Несмотря на более чем вековой промежуток времени со дня открытия этиологической роли кишечной палочки в развитии диарей у новорожденных животных и внедрения массовых вакцинаций, эшерихиоз телят и поросят по-прежнему остается одной из наиболее острых проблем в ветеринарии. Наличие у *E. coli* ряда биологических свойств и, прежде всего, большого набора серологических вариантов, факторов адгезии и колонизации, способности токсинообразования, инвазивной активности, устойчивости к различным антибактериальным препаратам обеспечивает этому микроорганизму широкое распространение и циркуляцию в организме животных и во внешней среде (Коляков Я. Е., 1974, Урбан В. П., Наиманов И. Л., 1984, Зароза В. Г., 1991). Именно эти обстоятельства являются основной причиной недостаточно высокой эффективности коммерческих вакцин и традиционно осуществляемой этиотропной терапии.

Поэтому, изучение биологических свойств, факторов патогенности и выяснения этиологии и распространения колибактериоза телят и поросят на территории Краснодарского края, а также совершенствование экспресс-методов лабораторной диагностики токсинообразования и других факторов патогенности у *E. coli* является вопросом злободневным, решение которого позволит рекомендовать практике более эффективные средства и меры борьбы и профилактики кишечных инфекций.

**Цель и задачи исследований.** Основной целью работы было изучение распространения диарей телят и поросят, биологических свойств и факторов патогенности *E. coli*, циркулирующих на фермах Краснодарского края, а также изыскание средств специфической терапии, профилактики и методов лабораторной диагностики. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- изучить распространение и этиологическую структуру желудочно-кишечных болезней телят и поросят в хозяйствах края
- изучить биологические свойства и факторы патогенности изолятов *E. coli*, выделенных от телят и поросят
- разработать альтернативные методы индикации токсинообразования у *E. coli* с помощью биотестирования токсигенности *E. coli* и реакции коагуликации (РКА на планшетах)

- изучить возможность применения модифицированной сорбитоловой среды для дифференциации *E. coli* O157
- разработать комплексную этиотропную и патогенетическую профилактику и терапию при желудочно-кишечных заболеваниях телят и поросят на территории Краснодарского края

**Научная новизна.** Изучены распространение, этиологическая структура желудочно-кишечных болезней телят и поросят на фермах Краснодарского края биологические свойства и факторы патогенности *E. coli*, выделенных от молодняка сельскохозяйственных животных. Впервые для установления токсигенных свойств *E. coli* использовали инфузии стилоний и реакцию коагулирования (РКА на планшетах). Для дифференциации *E. coli* O157 разработана и использована модифицированная сорбитоловая среда. Разработана комплексная система профилактики и лечения эшерихиозов молодняка сельскохозяйственных животных с использованием иммунофана, кормовой добавки «Гидрогемол» и гипериммунной антитоксической сыворотки и инактивированных антигенов из местных штаммов бактерий, полученных с учетом факторов патогенности *E. coli*.

**Практическая значимость.** Установлено распространение диарей телят и поросят на территории Краснодарского края и этиологическая структура возбудителей, изучены некоторые механизмы развития колибактериоза с учетом биологических свойств и факторов патогенности, встречающихся штаммов *E. coli*. Разработан, испытан и предложен на практике метод индикации токсинообразования у *E. coli* (биотестирование на стилониях). На способ изучения токсигенности кишечной палочки получен патент РФ № 2262529 от 20 октября 2005 года. Для выявления образования шигатоксинов применена реакция коагулирования (РКА на планшетах). Для ускоренной дифференциации патогенных *E. coli* O157 предложена модифицированная сорбитоловая среда. На способ приготовления питательной среды для выявления кишечной палочки серотипа O157 получен патент РФ № 2273661 от 10 апреля 2006 года. Разработана комплексная высокоэффективная система профилактики и лечения колибактериоза телят и поросят с учетом серологического профиля и токсигенности возбудителей, циркулирующих на территории Краснодарского края.

**Апробация работы.** Основные материалы диссертационной работы доложены и получили одобрение на Ученом совете Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института, научной конференции, посвященной 80-летию Кубанского государственного аграрного университета (Краснодар, 2002 г.), совещаниях зооветспециалистов Тимашевского, Каневского, Ейского и других районов Краснодарского края.

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 7 научных работ

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- распространение и этиологическая структура диареи телят и поросят в хозяйствах Краснодарского края
- биологические свойства и факторы патогенности изолятов *E. coli*, выделенных от телят и поросят на территории Краснодарского края
- метод индикации токсинообразования у *E. coli* с помощью биотестирования (инфузории-стилонихии) токсигенности *E. coli*, применение реакции коагутинации (РКА на плашкетах) и полимеразно-цепной реакции для обнаружения образования шигатоксинов у *E. coli* и модифицированная сорбитоловая среда для ускоренной дифференциации *E. coli* O157
- комплексная этиотропная и патогенетическая профилактика и терапия при диареях телят и поросят

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста, иллюстрирована 36 таблицами и 12 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, выводов и практических предложений. Список литературы содержит 163 источника, из которых 72 иностранных.

## **2. Собственные исследования**

### **2.1. Материалы и методы исследований**

Работа выполнена в соответствии с государственным планом научных исследований по заданию 06 02 01, утвержденному Российской Академией сельскохозяйственных наук на 2000-2005 годы в лабораториях микологии, микробиологии Краснодарского НИВИ.

При выполнении диссертационной работы проведено 10 научно-производственных опытов, при этом использовано 685 белых крыс, 745 белых мышей, 2140 телят, 2474 поросят, 10 лошадей. Проведено 1250 бактериологических, 1180 серологических, 860 токсико-биологических, 2540 патологоанатомических исследований проб из различных хозяйств края.

Распространение острых кишечных заболеваний у молодняка крупного крупного рогатого скота и свиней в хозяйствах Краснодарского края изучали путем анализа данных краевой ветеринарной отчетности и собственных исследований за 5 лет. Бактериологические исследования проводили общепринятыми методами, согласно «Методическим указаниям по диагностике колибактериоза животных и птицы (1991)» и «Методическим указаниям по диагностике смешанной кишечной инфекции, (1991)» с использованием коммерческих сред и тест-систем СИБ, ПБДЭ, ММТЕ 1 и 2, производства Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии и ИПО «Аллерген» (г. Ставрополь).

Выделенные культуры идентифицировали на основании данных официальных справочников. Патогенность изолированных от телят и поросят полевых штаммов *E. coli* и других бактерий устанавливали при внутрибрюшинном заражении белых мышей взвесью суточных агаровых культур.

Чувствительность бактерий к антибиотикам и химиопрепаратам определяли, используя метод диффузии в агар (луночковый метод), где оценку чувствительности осуществляли по диаметру зоны задержки роста тест-культуры, и количественный метод серийных разведений в жидкой питательной среде, где чувствительность к препарату оценивали по показателю минимальной подавляющей концентрации, выраженной в мкг/мл.

Серотипизацию по О-антигену полевых штаммов *E. coli* проводили с помощью набора коли-сывороток производства Армавирской биофабрики, а по пилевым антигенам с помощью адгезивных коли-сывороток производства ВНИИ прикладной микробиологии (г. Оболensk).

Изучение колициногенной активности *E. coli* проводили следующим образом: чистую культуру с косячка пересевали на чашку Петри с мясопептонным агаром (МПА). После инкубации в термостате при  $t=37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов, выросшие колонии обрабатывали паром хлороформа (15-20 сек) и заливали слоем 0,7 мм МПА, смешанного с 0,1 мл взвеси суточной культуры индикаторного штамма *Escherichia coli* K-12. При наличии в образцах колициногенных колоний эшерихии вокруг них формировались зоны задержки роста на фоне сплошного газона индикаторной культуры. Обнаружение фимбрий проводили смешиванием на предметном стекле равных объемов (по одной капле) 0,85%-ного раствора NaCl, взвеси эритроцитов и суспензии испытуемых клеток *E. coli*. Параллельно ставили реакцию с аналогичными компонентами, но вместо 0,85%-ного раствора NaCl использовали 1,5-2%-ный раствор D-маннозы. На основании РГА адгезины классифицировали на 2 разновидности (фимбрии 1 типа, общие или неспецифические адгезины и фимбрии 2 типа или специфические адгезины). Для выявления реакцией гематглютинации фимбрий 1-го типа и их дифференциации от специфических адгезинов использовали эритроциты барана и кролика.

Для выявления шигатоксинов *E. coli* применяли реакцию коагглютинации (РКА на планшетах). При этом использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ), бульонная культура *E. coli* 174 (9) - продуцирующая VT-1, VT-2, LT, CNF, б-гемолизин, *E. coli* O157, *E. coli* 546 (16) продуцирующая VT-2, LT, в качестве контроля (К) - 1%-ную взвесь стафилококка для реакции коагглютинации РКА и диагностикум (Д) - 1%-антишигатоксический (произведен в ГИСК им. Л.А. Тарасевича для лабораторных испытаний).

Для индикации энтерогеморрагической *E. coli* O157 были модифи-

цированы имеющиеся среды Эндо с сорбитом, разработанная и выпускаемая государственным научным центром прикладной микробиологии, г Оболенск, агар Мак-Конки с сорбитом (SMAC-agar), выпускаемый фирмой Sifin (Германия)

При определении токсичности *E. coli* был применен способ биотестирования токсичности с помощью инфузорий по Д.О. Виноховоду, (1995) В нашем случае смешивали питательные среды, содержащие суточные культуры инфузорий (стилоники) и фильтраты кишечной палочки различных сроков инкубации

При получении поливалентной гипериммунной сыворотки для лечения телят и поросят использовали лошадей-доноров В качестве бактериального антигена для индукции процесса антителообразования у лошадей-доноров использованы инаktivированные формалином культуры *E. coli*, выделенные от телят и поросят в острой стадии болезни Бактериальный антиген вводили в нарастающих дозах 5-10-15-20-25-30-35-40 мл с интервалом 5 дней Для активации гуморального ответа применяли иммуностимулятор - имунофан в дозе 4 мл на животное Через 14 дней после последнего введения антигенов у животных из яремной вены, соблюдая правила асептики и антисептики, брали кровь в количестве 1% от живой массы Сыворотку готовили по общепринятым методикам Полученную сыворотку консервировали 5% раствором фенола до 0,5% конечной концентрации У полученной сыворотки проверяли титры антител к *E. coli* в реакции агглютинации (РА), стерильность и безвредность Превентивную активность полученной сыворотки определяли на беспородных белых мышах, согласно «Методическим указаниям по биохимическим и иммунологическим методам использования клеток их компонентов и других биологических субстратов», М 1980 Для изучения профилактического действия имунофана, КД «полученной гипериммунной сыворотки поставили серию опытов на новорожденных телятах (29-32 кг) и поросятах (1,8-1,9 кг) По принципу аналогов было сформировано 2 группы телят по 150 голов и поросят по 250 голов Животным опытных групп вводили исследуемую гипериммунную сыворотку против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных внутримышечно в дозе 1 мл на 1 кг веса Телятам и поросятам контрольной группы поливалентную сыворотку против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных (Армавирская биофабрика), согласно наставлению Для изучения терапевтической эффективности полученную сыворотку животным опытных групп вводили внутримышечно в дозе 2 мл на 1 кг массы тела В качестве контроля использовали поливалентную сыворотку против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных (Армавирская биофабрика), согласно наставлению, в лечебных дозах и антибактериальные препараты, используемые в хозяйстве после определения чувствительности к ним выделенной

микрофлоры. В опыте было использовано 30 телят и 100, поросят больных эшерихиозом.

Математическую и биометрическую обработку полученных цифровых данных исследований проводили с помощью программы Microsoft Excel 2000 на компьютере с процессором Pentium 4, степень достоверности «Р» устанавливали по распределению Стьюдента.

### **3. Результаты исследований**

#### **3.1. Распространение эшерихиоза телят и поросят на фермах Краснодарского края**

Проведенный анализ статистической отчетности краевого управления ветеринарии показал, что на фермах Кубани за шесть лет (1999-2004 гг.) было получено 1634,2 тыс. телят и 10058,9 тыс. поросят, из которых колибактериозом заболело 11369 телят и 39581 поросят, летальность при данном заболевании составила у телят 2711 (23,8%) голов, у поросят 11485 (29,0%). Это значит, что из числа заболевших колибактериозом погибал каждый четвертый теленок и третий поросенок.

Острые кишечные заболевания, как телят, так и поросят продолжают диагностироваться как диспепсия, то есть заболевание неинфекционного характера. Анализ данных Краснодарской межобластной ветеринарной лаборатории и районных лабораторий края за 1999-2004 гг., указывает на высокий процент поражения эшерихиозом молодняка телят и поросят в хозяйствах края. Из общего количества исследованного за шесть лет патматериала от крупного рогатого скота количество положительных результатов по годам исследования в среднем составило 48,4%, от свиней – 44,8% соответственно. Больше половины всех положительных результатов от поступившего на исследование патматериала по сравнению с другими инфекционными заболеваниями у телят (до 67,2 %) и поросят (до 56,0 %) приходится на колибактериоз.

Анализ полученных данных свидетельствует, что заболевание широко распространено в хозяйствах Краснодарского края и является одной из причин гибели телят и поросят в период новорожденности. Сложившаяся ситуация обусловлена тем, что специалисты хозяйств не уделяют должного внимания диагностике, профилактике и лечению диарейных заболеваний.

#### **3.2 Биологические свойства и факторы патогенности изолятов *E. coli*, выделенных от телят и поросят на территории Краснодарского края**

##### **3.2.1. Серотиповый профиль изолятов *E. coli*, выделенных от телят и поросят**

Из числа установленных нами полевых штаммов, наиболее часто у телят встречаются эшерихии с поверхностным антигеном O15(10,93%), O9(8,64%), O20(7,92%), O78(7,31%), O8(5,70%), O18(5,47%), O26(4,91%)

и O2(4,27%) У поросят чаще выделяются эшерихии с поверхностным антигеном O26(8,87%), O8(8,12%), O103(6,31%), O138(5,81%), O101(5,26%), O15(4,78%), O18(4,17%) и O2(4,17%) Изучение серотипового профиля и факторов патогенности у сероваров *E. coli*, выделенных от новорожденных телят и поросят при диареях показал, что в этиологии заболевания участвуют разнообразные по соматическому O-антигену эшерихии Полученные данные позволяют объяснить в целом низкую эффективность в хозяйствах Краснодарского края таких вакцин как Коли-Вак, которую выпускают в двух вариантах первый вариант вакцины содержит эшерихии серогрупп 06, 09, 0138, 0139, 076, 0141, 0147, 0149 или эшерихии тех же серогрупп, обогащенные адгезивным антигеном K88 (Коли-Вак K88), для профилактики колибактериоза поросят, второй вариант вакцины содержит эшерихии серогрупп 06, 09, 015, 020, 026, 041, 055, 056, 076, 0101, 0115, 0117, 0119 или эшерихии тех же серогрупп, обогащенные адгезивным антигеном K99 (Коли-Вак K99), для профилактики колибактериоза телят и ягнят При сравнении антигенной структуры используемых вакцин с антигенной структурой возбудителей эшерихиоза было установлено, что в хозяйствах края *E. coli* серогрупп O9, O139, O76, O141, O147, O149 у поросят встречается в 0,7-3,38% случаев, *E. coli* серогрупп 041, 055, 056, 076, 0101, 0115, 0117, 0119 у телят выделяется в 1,67 - 2,85 % То есть, идет несовпадение структуры заболевания по серотиповому составу с вакциной Коли-Вак на 50-60% у поросят, и 30-40 % у телят

### **3.2.2 Адгезивная и колициногенная активность изолятов *E. coli*, циркулирующих на фермах Краснодарского края**

По данным авторов В Г Зароза, 1991, В А Бурлаков, 2002, М М Levine, 1984, W Н Ewing, 1986 и др , патогенные *E. coli* обладают факторами патогенности, одними из которых являются колициногенная и адгезивная активности С помощью антигенов адгезии энтеротоксигенные штаммы *E. coli* прикрепляются к эпителиальным клеткам кишечника, что позволяет им реализовать свои энтеропатогенные свойства, а с помощью колицинов - выживать в микробном сообществе, вытесняя неколициногенные штаммы

Обнаружение адгезинов (фимбрий) и установление их типов у эшерихий выделенных от поросят и телят на территории Краснодарского края проводили с помощью манозонезависимой реакции гематтотинации (РГА) Нами было протестировано 98 полевых штаммов *E. coli*, при этом установлено, что у 56 (57,1%) из них имелись фимбрии, а у остального количества 42 (43%) они отсутствовали У адгезинопозитивных сероваров в 42 (75%) случаев фимбрии были представлены 1 (общим) типом, и в 14 (25%)- 2 (специфическим) типом Из 98 изученных полевых штаммов *E. coli*, у 32 (32,7%) обнаружены колициногенная актив-

ность, а у 66 (67,3%) она отсутствовала. Было установлено, что все серовары, продуцирующие колицины, либо имели фимбрии 1 типа 18 (56,3%), либо их вообще не имели 14 (43,7%). Ни у одного полевого штамма *E. coli*, обладающего специфическими адгезинами, не обнаружена колициногенная активность, что позволяет предположить отсутствие способности их продуцирования эшерихиями с фимбриями 2 типа.

Таким образом, у 57,1% полевых штаммов *E. coli*, выделенных из патологического материала от молодняка крупного рогатого скота и свиней обнаружена способность к выработке адгезинов и колицинов.

По данным краевой ветлаборатории и результатам собственных исследований, за последние 5 лет установлена изменчивость состава адгезинов сероваров *E. coli*, выделенных от молодняка крупного рогатого скота и свиней. Специфические адгезины у *E. coli*, выделенных от телят, чаще всего представлены A20 - 706 (42,1%), K99-341 (20,3%), K88-311 (18,5%), 987P- 202 (12,0%) и реже всего F41-107 (6,4%). Специфические адгезины у *E. coli*, выделенных от поросят, чаще всего представлены K88 968 (46,4%), K99 487 (23,3%), A20 287 (13,8%), 987P 245 (11,7%) и реже всего F41-91 (4,4%). То есть в настоящее время ведущая роль в развитии эшерихиоза у телят принадлежит *E. coli* A20, а у поросят *E. coli* K88.

### 3 2.3. Гемолитическая активность изолятов *E. coli*

Одним из факторов патогенности штаммов *E. coli*, является цитотоксичность (гемолитическая активность). Гемолизины состоят из полипептидов и ЛПС (липополисахариды), обладают способностью лизировать эритроциты, но окончательно их роль в развитии ОКЗ не выяснена. Гемолитические свойства изолятов *E. coli*, выделенных от телят и поросят, обнаруживали - методом культивирования на кровяном агаре приготовленном четырьмя способами: 1) добавлением нативной крови барана с 5% глюкозы, 2) добавлением отмытых эритроцитов крови барана, 3) нативной крови кролика с 5% глюкозы, 4) добавлением отмытых эритроцитов крови кролика. В первом случае 2 мл дефибринированной крови барана добавляли к растопленному и остуженному до 45-50°C АГВ, затем разливали в чашки Петри. Во втором случае 2 мл дефебринированной крови барана смешивали с буферизированным физраствором и трехкратно центрифугировали (не более 1000 оборотов в мин.). В третьем и четвертом случаях вместо крови барана использовали кровь кролика. Чаще гемолитической активностью обладали штаммы *E. coli*, выделенные от поросят, которые, в зависимости от способа приготовления кровяного агара, в 35,4% - 43,7% случаев давали на кровяном агаре б-гемолиз, в 2,08% - 6,25% - а-гемолиз, а в 52,0% - 62,5 % случаев его не образовывали. От телят выделялось меньше гемолитических форм *E. coli*, б-гемолиз образовывали 19,0% - 33,3 %, а-гемолиз 2,3% - 4,7% и 64,2 - 80,9 % штаммов были не гемолитическими. При проведении опыта лучший результат был получен при использовании нативной крови бара-

на с 5% глюкозы, а также в случае добавления отмытых эритроцитов крови кролика (гемолиз четкий, не смазанный) При приготовлении кровяного агара вторым и третьим способом некоторые E coli, обладающие б-гемолитическими свойствами, из-за смазанности нечеткости картины, были отнесены к а-гемолитическим Но, учитывая технологию приготовления кровяного агара обоими способами (первым и четвертым), а именно затраты времени и реактивов на отмывание эритроцитов, проще использовать нативную кровь барана с добавлением 5 % глюкозы

### **3.2 4. Чувствительность E. coli к антибактериальным препаратам**

Нами изучена чувствительность 183 изолятов эшерихии выделенных от телят и поросят в различных хозяйствах края к антибактериальным препаратам, представляющих собой различные группы фармакологических средств Из 31 испытанного препарата всего 17 (54,8%) средств были высокоактивны по отношению к E coli выделенных от поросят (зона задержки роста свыше 25 мм), от телят соответственно-19 (61,2%) средств, что свидетельствует об устойчивости, выделенных сероваров E coli к ним

Не эффективными препаратами в отношении полевых штаммов E coli оказались как у телят, так и поросят оксациллин 100% у обоих видов животных, метициллин - 100% и 95,6% соответственно, ампиокс 100% и 90,7% 42% штаммов E coli не чувствительны и малочувствительны к 15 из 31 препаратов, 16% - к 10 антибактериальным препаратам, 16% к 5 антибактериальным препаратам, 6,4% - соответственно к 3 препаратам

Исследования антибиотикочувствительности у полевых штаммов эшерихий показало, что среди них имеется большое количество резистентных вариантов Это создает определенные трудности при проведении лечебных мероприятий при кишечных заболеваниях, вызванных E Coli

### **3.3 Разработка альтернативных методов индикации токсинообразования у E coli**

#### **3.3.1. Применения реакции коаггутинации для выявления у E.coli образования шигатоксина**

На следующем этапе нашей работы было изучение возможности применения реакции коаггутинации (РКА на планшетах) для индикации у E coli, способности выделять шигатоксины в питательный бульон с учетом различных сроков культивирования, поскольку они являются одним из факторов патогенности E coli, также эти данные необходимы при создании средств специфической профилактики Методика разработана в ГИСК имени Л А Тарасевича и предоставлена нам для проведения испытаний Результаты испытания указывают, что E coli 174(9) продуцирует шигатоксины со второго дня культивирования и не прекращает в течение семи дней причем не уменьшая концентрации Наибольшие

титры достигают 1 16384 Е coli O157 выделяет шигатоксины со второго дня максимума (титр 1 65536) достигает на 5 день культивирования, а затем снижает их продукцию Е coli 546 (16) продуцирует шигатоксины начиная с первого дня наибольшей величины достигает на второй день культивирования (титр 1 65536) и не снижает количества их продукции в течение шести дней

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования реакции коаггутинации для обнаружения продуцирования шигатоксинов токсигенными Е coli, а также определения сроков их максимального выделения

### **3 3 2. Применение модифицированной сорбитоловой среды для дифференциации Е. coli O157**

Для медицины и ветеринарии огромное значение имеет ускоренная индикация энтерогеморрагической Е coli O157 одной из биологических особенностей данной бактерии является неспособность ее, в отличие от других кишечных палочек усваивать сорбит В связи с чем, были разработаны и предложены питательные среды для лабораторной диагностики модифицированная среда Эндо с сорбитом, она же питательная среда для выделения и дифференциации O157 Н7 сухая (сорбитол O157 Н7 агар), разработанная и выпускаемая государственным научным центром прикладной микробиологии, города Оболенск, агар Мак-Конки с сорбитом (SMAC-агар), выпускаемый фирмой Sifin (Германия) Эти среды содержат в качестве углевода сорбит, а в качестве индикатора изменения рН среды- в первом случае - фуксин основной, во втором - нейтральный красной с фиолетовым красным Способы приготовления указанных сред являются сложными и для их приготовления необходимы дефицитные дорогостоящие компоненты, полученные среды чувствительны к свету и теплу и сами по себе могут изменять свои цвет, ввиду чего готовые среды рекомендуется использовать в день приготовления, бактерии со слабой ферментативной активностью могут быть ошибочно учтены как сорбит (-), так как для этих вариантов требуется более продолжительная инкубация в процессе которой изменяется цвет самой среды, кроме того, импортная среда в 3-4 раза дороже отечественной

Нами разработан метод приготовления сорбитоловой среды, соответствующий необходимым требованиям микробиологических исследований, что достигается тем, что в качестве питательной среды используется агар АГВ (панкреатический гидролизат кильки, натрия хлорид, крахмал, агар, динатрия фосфат), Выпускаемый НПО «Питательные среды» (г Махачкала), сорбит и индикатор, представляющий собой водный раствор кислого фуксина и бромтимолового синего Первоначально сухие ингридиенты среды разводятся в воде и доводятся до кипения, фильтруется, после чего устанавливается рН 7,0-7,4, вводится индикатор, затем готовая среда разливается по флаконам и автоклавируется при 0,5 атм ,

в течение 20 минут. Расплавленную и охлажденную до 45-50°C среду разливают в чашки Петри. Индикатор готовится по прописи, 0,5 г Кислого фуксина растворяется в 16 мл 1%-ного раствора гидроксида натрия, к полученному раствору добавляют 84 мл дистиллированной воды и 0,4 бромтимолового синего. Количественные значения ввода в среду сорбита, кислого фуксина и бромтимолового синего подобраны экспериментально.

Полученная среда стабильна при воздействии солнечного или электрического света, обладает четким дифференцирующим свойством, позволяющим достоверно различать сорбит (-) и сорбит (+) бактерии. Среда может использоваться при первичной дифференциации *E. coli* O157 от других серотипов кишечной палочки, поскольку 70-80% случаев является сорбит (-). Готовая среда имеет оливково-зеленый цвет, прозрачная на просвете, штаммы кишечной палочки расщепляющие сорбит уже через 15-18 часов после посева, образуют на ней непрозрачные желтого или оранжевого цвета колонии с изменением цвета среды вокруг колонии из оливково-зеленого в желто-оранжевую. Сорбит (-) *E. coli* (O157) к тому же сроку образуют непрозрачные зеленовато-голубые колонии, на фоне неизменной, оливково-зеленого цвета среды.

### 3.3.3 Способ биотестирования токсигенности *E. coli*

Применяемые в настоящее время методы для выявления токсигенных кишечных палочек весьма трудоемки, дорогостоящи и трудновоспроизводимы, а значит мало востребованы. Целью нашей работы являлся поиск и разработка простого, экономичного, легко воспроизводимого, гуманного и достоверного метода определения токсигенности *E. coli*. В качестве объекта для тестирования токсигенности *E. coli* были выбраны инфузории, которые в настоящее время используют для индикации в кормах и пищевых продуктах токсикантов химического и грибного происхождения. В эксперименте изучалось 4 вида инфузорий-парамеции стилонихии, колподы и тетрахимены. После ряда испытаний мы пришли к выводу, что в данном опыте можно использовать только инфузорий-стилонихии, так как только они оказались чувствительными к выделяемым токсинам *E. coli*. Все остальные инфузории не только не погибали, но и размножались в присутствии бульонной культуры кишечной палочки, даже при высоких ее концентрациях. Также большим плюсом является и то, что при гибели стилонихий происходит их лизис, то есть полный распад, что весьма удобно при их подсчете. Предварительно, с помощью метода полимеразноцепной реакции (ПЦР), были подобраны штаммы *E. coli* имеющие гены, отвечающие за выработку токсинов у штамма 196 - за энтерогемолизин, у 173 - за выработку только пигафоксина, у 174(9) - за выработку гемолизина, нескротизирующего и пниатоксина. Контролем служил штамм *E. coli* -M-17 используемый в качестве пробиотического препарата и поступающий в аптечную сеть под названием

«колибактерин», он не обладает патогенными и токсигенными свойствами. В качестве отрицательного контроля использовался стерильный питательный бульон Хоттингера. В предварительных исследованиях было подобрано оптимальное соотношение бульонов и среды культивирования инфузорий, которое составило 1:3 (то есть на одну каплю питательного бульона три капли среды культивирования инфузорий), что позволило максимально снизить процент ошибки. На предметное стекло вносится среда с инфузориями (суточная культура), проводится их подсчет (для удобства подсчета желательнее, чтоб количество стилопнихий составило 10-20 штук), при помощи бинокулярной лупы или микроскопа (при увеличении 2X8), и добавляется исследуемая бульонная культура *E. coli*. Через 5 минут производится предварительный просмотр и подсчет количества инфузорий (для того чтобы избежать влияния различных факторов окружающей среды). Стекла с исследуемым материалом помещают в предварительно приготовленные чашки Петри, а затем в термостат с оптимальной для культивирования инфузорий (18-23°C). По истечении 2-х часов производится окончательный подсчет числа живых инфузорий, который сравнивается с первоначальным значением. Для получения достоверных данных опыт дублируется 3-5 раз, затем высчитывается средний показатель. Чем выше процент лизированных (погибших) микроорганизмов, тем более токсичной является культуральная среда, а исследуемый штамм, соответственно – токсигенным. Кроме того, провели исследования по выявлению влияния сроков инкубации на токсичность культуральной среды. Тест-культуры инкубировали в течение 72 часов, через каждые 24 часа осуществляли контроль уровня токсичности. Количество стилопнихий после их инкубации в присутствии бактериальной культуры *E. coli* способной продуцировать некротизирующий, шигатоксин и гемолизины составляет 45-55%. Количество погибших стилопнихий после контакта со средой культивирования *E. coli*, продуцирующих только шигатоксины – 23-26%. Количество лизированных инфузорий после контакта со средой культивирования *E. coli*, продуцирующих только гемолизин – 10-11%. Количество спонтанно погибших и после контакта со средой культивирования *E. coli*-M-17 (непатогенного) – 0-5%. Результаты проведенных опытов показали, что инфузорий можно использовать в качестве модели для тестирования токсигенных свойств *E. coli*. Использование бульона Хоттингера в опыте является наиболее предпочтительным, поскольку на такой питательной среде как мясопептонный бульон, основной среде культивирования бактерий, продукция токсинов этой бактерией не столь выражена. Метод позволяет определить время накопления максимального количества токсинов, выделяемых колонией *E. coli* в процессе ее жизнедеятельности в питательную среду. Так, например, штамм имеющий ген отвечающий за выработку только шигатоксинов, максимально продуцировал токсин по истечению 24 часов его культивирования, а штамм, обладающий образованием

гемолизинов, шиготоксинов и некротизирующим фактором - по истечении трех суток (72 часа культивирования в питательном бульоне)

Таким образом, новизна предложения заключается в возможности осуществления биотестирования токсигенности кишечной палочки за счет культивирования инфузорий совместно с бульонной культурой кишечной палочки, а также возможности контроля уровня токсичности, что можно использовать при приготовлении вакцин из местных штаммов. На изобретение способа биотестирования токсигенности кишечной палочки получен патент РФ № 2262529 от 20 октября 2005 года.

### **3.4. Разработка комплексной этиопатогенетической профилактики и терапии при диареях телят и поросят в Краснодарском крае**

#### **3.4.1. Эффективность имунофана при диареях молодняка сельскохозяйственных животных**

Современная ветеринария имеет широкий выбор лекарственных средств, но, несмотря на это эффективность терапевтических мероприятий против эшерихиоза молодняка остается на низком уровне. По нашему мнению основной причиной этого является нерациональное использование антибактериальных препаратов без определения чувствительности и выдерживания схем лечения, что ведет к антибиотикоустойчивости штаммов и повышению патогенности *E. coli*. Также зачастую не учитывается структура заболевания при применении вакцин и сывороток, патогенез болезни, не проводится дезинфекция помещений и принцип падающего кормления больных животных. Поэтому с учетом изложенного были разработаны схемы профилактики и терапии колибактериоза телят и поросят, включающие применение имунофана, КД «Гидрогемола» и гипериммунной антигистаминической поливалентной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных, полученной при гипериммунизации лошадей гидроокисью алюминия вакциной из местных штаммов сконструированной с учетом факторов патогенности *E. coli*.

Имунофан применяли при лечении новорожденных телят с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Для проведения опыта подбирали животных с клинической картиной болезни, сопровождающейся нарушениями обменных процессов с симптомами диареи. Предварительно проводили анализ анамнестических данных, результатов диспансерного обследования стада крупного рогатого скота, условий его кормления, содержания, эксплуатации. При исследовании больных телят определяли массу их тела, выраженность сосательного рефлекса, состояние видимых слизистых оболочек, кожи, наличие или отсутствие явлений обезвоживания, интоксикации, гипо- или гипертермии, расстройств дыхания, пищеварения, патологических изменений в деятельности органов мочеполовой и нервной систем. При этом учитывали результаты лабораторных исследований крови телят и матерей. Заболевшими считали телят со

сниженной живой массой, слабой выраженностью подкожной клетчатки, бледностью видимых слизистых оболочек, заторможенностью сосательного рефлекса, учащением дыхательных движений и ослаблением везикулярного дыхания, уменьшением в крови гемоглобина и эритроцитов, снижением показателей естественной резистентности организма на фоне диарей

В первой серии опытов подобрали 40 телят с более или менее одинаковыми клиническим статусом. По принципу аналогов больных телят разделили на две группы по 20 голов в каждой. Одна группа телят была опытной, другая контрольной. Телята обеих групп находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Телят лечили с применением метода, принятого в хозяйстве - под кожу вводили кровь здоровой коровы из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Наряду с гемотерапией им подкожно вводили имунофан в дозе 0,7 мг/кг. В контроле проводили только гемотерапию. У телят происходило улучшение общего состояния. Сосательный рефлекс восстанавливался, аппетит улучшался, уменьшались расстройства ЖКТ. Повышался нервно-мышечный тонус. Нормализовались основные клинические показатели (температура, пульс, дыхание). Повышение уровня гемоглобина и эритроцитов свидетельствовало об активизации эритропоэза и исчезновении анемии. Произошли позитивные сдвиги в обмене веществ. У опытных телят по сравнению с контрольными увеличилось содержание общего белка на 5,9% ( $p < 0,05$ ) и каротина на 13,6% ( $p < 0,05$ ) в сыворотке крови. Имунофан благоприятно повлиял на показатели естественной резистентности организма телят. Бактерицидная активность сыворотки крови возросла на 32,1% ( $p < 0,05$ ), лизоцимная - на 72,9% ( $p < 0,05$ ). На 52,4% ( $p < 0,05$ ) увеличилась фагоцитарная активность нейтрофилов.

У телят опытной группы по сравнению с контролем масса тела в конце опыта была выше. Однако говорить о нормализации живой массы у телят обеих групп нет оснований. Масса опытных и контрольных телят не достигла величин, характерных для здоровых телят того же возраста. Гемотерапия, сочетаемая с подкожным введением имунофана, предохраняла телят от диспепсии и бронхопневмонии. Среди телят опытной группы не наблюдалось респираторных и желудочно-кишечных болезней. В контрольной группе животных зарегистрировано два случая бронхопневмонии, четыре случая простой диспепсии.

Таким образом, имунофан в комплексе с другими терапевтическими средствами, эффективен при лечении желудочно-кишечных заболеваний телят. Терапевтическое действие имунофана (тимогексина) оценивали при лечении телят с желудочно-кишечными заболеваниями. Опытную группу больных телят с респираторной патологией в количестве 24 голов лечили общепринятыми методами (антибиотики, сульфаниламидные препараты и т.п.) и дополнительно инъецировали имунофан (тимогексин) в дозе 100 мкг/гол. в течение 4-6 дней. Контрольную группу больных

телят (20 голов) лечили аналогичными методами без применения имунофана. Оценку действия имунофана проводили по срокам течения заболевания и количеству отхода телят (табл. 1)

Таблица 1

Эффективность применения имунофана  
при лечении желудочно-кишечных заболеваний телят

| Группа      | Кол-во голов | Выздоровело | Отход | Длительность болезни |
|-------------|--------------|-------------|-------|----------------------|
| Опытная     | 24           | 24          | 0     | 4-9 дней             |
| Контрольная | 20           | 18          | 2     | 6-15 дней            |

Использование имунофана при лечении больных желудочно - кишечными заболеваниями позволяет сократить сроки течения болезни и усилить эффективность действия других химиотерапевтических средств.

При проведении широких производственных испытаний тимогексина территории Краснодарского края получены следующие данные (табл. 2) - при профилактике желудочно-кишечных заболеваний у телят на откорме эффективность применения имунофана характеризуется следующими цифрами: заболеваемость сократилась в 23 раза.

Таблица 2

Профилактическая эффективность имунофана при  
желудочно-кишечных заболеваниях у телят

| Группа      | Кол-во живогных | Заболело, гол | Заболеваемость, % | Среднесуточные привесы, г | Вынужденно убито, гол |
|-------------|-----------------|---------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|
| Опытная     | 762             | 16            | 2                 | 717                       | 12                    |
| Контрольная | 942             | 566           | 60                | 557                       | 127                   |

Падеж сократился в 10,5 раз (под падежом подразумевается сумма вынужденно убитых и павших животных). Необходимо отметить, что среднесуточные привесы в опытной группе возросли в среднем на 159 грамм. Аналогичные данные были получены при испытаниях препарата на поросятах и приведены в табл. 3.

Таблица 3

Эффективность профилактики желудочно-кишечных заболеваний  
поросят имунофаном

| Группа      | Кол-во животных | Заболело, гол | Заболеваемость, % | Среднесуточные привесы, г |
|-------------|-----------------|---------------|-------------------|---------------------------|
| Опытная     | 68              | 0             | 0                 | 346                       |
| Контрольная | 72              | 16            | 42                | 271                       |

Необходимо отметить, что привесы поросят при одинаковом рационе увеличились в среднем на 75 г в сутки. Таким образом, данные экспериментов однозначно свидетельствуют о высокой эффективности имунофана, как профилактического ветеринарного препарата.

Применение имунофана в дозе 1 - 1,5 мл/гол при иммунизации поросят против сальмонеллеза (бивалентной вакциной против сальмонеллеза свиней из аттенуированных штаммов *S typhimurium* № 3 и *S cholerae-suis* № 9) и колибактериоза (ОКЗ) способствует усилению иммунных реакций в организме животных.

#### **3.4.1. Применение кормовой добавки «Гидрогемол» при диареях поросят и ее биологическое действие на организм**

Было проведено производственное испытание кормовой добавки (КД) «Гидрогемол» с целью профилактики диарей у поросят. Гидрогемол испытывали по 3 схемам. По схеме №1 гидрогемол получали 375 поросят, который задавали, начиная с первого дня отъема и на протяжении 10 дней в дозе 2,5-4,0 мл/кг массы тела. По схеме №2 - КД получали 393 поросенка, который начинали вводить в корма за 3 дня до отъема в дозе 6 мл/кг массы тела животного, а в последующие 10 дней карантина эту дозу последовательно уменьшали до 2 мл/кг. По схеме №3 гидрогемол получали 405 поросят, который начинали давать за 3 дня до отъема в дозе 2 мл/кг, а после отъема дозу добавки увеличивали до 6 мл/кг на 6,7 сутки карантина и вновь ее снижали к 10 дню до 2 мл/кг. Суточная доза кормовой добавки, равномерно распределялась в течение суток (утром, днем и вечером). Данные испытаний представлены в табл. 24, из данных которой видно, что число заболевших в опытных группах на 25,5 - 34,6%, а количество павших в 3,0 - 4,8 раза меньше, чем в контрольных группах. Анализ данных заболеваемости поросят при отъеме в опытных и контрольных группах животных, показал, что существует четкая динамика нарастания заболеваемости поросят к 6 дню отъема, с последующим затуханием к 9 дню и новой волной заболевших на 10 день отъема. Максимальный пик заболевших приходится на 6 сутки во всех

группах поросят, но в опытных группах животных не было отмечено резкого пика заболеваемости, в этот день заболевало не более 9,2% поросят, тогда как в контрольных группах - 15,7%. Кроме этого в опытных группах имеется тенденция снижения заболеваемости поросят к 10 дню отъема. Тогда как в контрольных группах, наоборот, на 10 сутки карантина возникала новая волна заболеваемости поросят диареей. В контрольных группах диарею у животных отмечали, на протяжении всего карантина. При этом испражнения имели вид жидких (водянистых), темно-коричневых или черных масс, с примесью крови и слизи. Заболевание 9,4% случаев заканчивалось истощением и гибелью животных. В этих же группах на 10-14 сутки карантина регистрировали появление у 4,7% животных отежной болезни со 100% летальным исходом (при несвоевременно оказанной медикаментозной помощи). В опытных группах заболевание протекало за 2-3 дня, и характеризовалось более легкой формой, с минимальным обезвоживанием и истощением. Летальных случаев с клиникой первичных явлений и отеков среди поросят опытных групп не было.

До карантина и по достижении поросятами возраста 60-днев был проведена перевеска подопытных и контрольных животных. Средний вес поросят опытных групп до опыта был примерно одинаков 9,4 и 9,3 кг. Однако после срока наблюдения средняя масса поросенка из опытных групп была на 2,9 кг больше, чем в контрольных группах, и составила в среднем  $16,8 \pm 0,57$  кг. Это значит, что ежедневный прирост живой массы тела каждого подопытного поросенка был в среднем выше на 164,6 г по отношению к контрольным животным. Наибольший среднесуточный прирост массы тела (458,8 г) наблюдался у поросят, которым вводили КД «Гидрогемол» по схеме №3, в других опытных группах данный показатель был ниже и составил в группе, где вводился гидрогемол по схеме №1-394,1 г, а по схеме №2- 447,1 г.

Испытания гидрогемола на значительном поголовье поросят-отъемышей показали, что он благотворно влияет на организм молодых животных, способствует значительному снижению заболеваемости и летальности от заболеваний, сопровождающихся диареей за счет сохранения у них высокого уровня кишечных симбионтов, нормализации и активации обменных процессов и факторов иммунорезистентности, улучшение аппетита и поедаемости корма, и, как следствие, повышению привесов. Биологическое действие КД «Гидрогемол» изучали на поросятах отъемышах (возраст 30-45 дней). В хозяйстве отъем поросят проводится в 35-дневном возрасте, сопровождается массовыми заболеваниями диарейной формой колибактериоза. Поэтому по принципу аналогов были подобраны две группы поросят, опытной группе - задавали препарат в смеси с кормом 2 раза в день в дозе 2,5-4,0 мл/кг по схеме 3 дня до и в течение 10 дней после отъема, а контрольная группа оставалась на основном рационе. Биологическое влияние КД «Гидрогемол» на организм

поросят-отъемышей, контролировали по динамике изменений кишечного микробиоценоза, гематологических, иммунологических и биохимических показателей крови, а также по приросту живой массы тела животных

Изучение влияния КД «Гидрогемол» на кишечный микробиоценоз поросят показало, что у поросят опытной группы, в отличие от контрольных животных, у которых количество эшерихий имело четкую тенденцию к повышению с  $\lg 7,8 \pm 0,28$  КОЕ/г до  $\lg 12,5 \pm 0,32$  КОЕ/г на 10 день отъема с незначительным снижением к 14 дню до  $\lg 11,8 \pm 0,64$  КОЕ/г, численность эшерихии возросла только до  $\lg 9,4 \pm 0,34$  КОЕ/г на 3 день отъема, с последующим закономерным снижением до  $\lg 8,4 \pm 0,17$  КОЕ/г к 14 суткам. Такая же тенденция отмечается и в содержании гемолитических форм эшерихий, так при равном их количестве у поросят обеих групп за 3 дня до отъема  $\lg 7,4 \pm 0,11$  КОЕ/г, у животных контрольной группы к 10 дню они увеличились до  $\lg 12,2 \pm 0,39$  КОЕ/г с последующим незначительным снижением к 14 дню до  $\lg 11,8 \pm 0,63$  КОЕ/г, а у подопытных животных, напротив, рост числа этих форм кишечной палочки происходит только до 3 дня, а к 14 дню снижается до  $\lg 8,0 \pm 0,32$  КОЕ/г. В результате действия кормовой добавки у поросят опытных групп, снижается не только численность гемолитических эшерихий, но и меняются их гемолитические свойства - преобладают не  $\beta$ -гемолитические, а  $\alpha$ -гемолитические формы эшерихий. Также теряют гемолитическую активность энтерококки, хотя их содержание в кишечнике подопытных поросят на период исследований достоверно не отличается, от поросят контрольной группы. Содержание стафилококков и клостридий напротив, в обеих группах растет до 6 дня и закономерно по мере выздоровления снижается к 14 дню отъема, но количество стафилококков в опытной группе поросят под действием препарата на 6, 10, 14 день было достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже на 20,8%, 36,4%, 20,0%, а клостридий в эти же дни на 22,6%, 7,6%, и 36,0% соответственно. Кормовая добавка так же оказывала позитивное влияние и на количественный состав симбионтной микрофлоры (рисунок 8). Так если у поросят-отъемышей контрольной группы к 6 дню отъема, отмечалось снижение молочнокислых стрептококков до  $\lg 7,3 \pm 0,25$  КОЕ/г, лакто-бактерии -  $\lg 5,7 \pm 0,53$  КОЕ/г и бифидумбактерий -  $\lg 8,0 \pm 0,50$  КОЕ/г, что совпадает с пиком массовых диарей в этот период времени. По мере выздоровления к 14 дню отъема количество молочнокислых стрептококков повысилось до  $\lg 7,7 \pm 0,47$  КОЕ/г, лактобактерий -  $\lg 7,7 \pm 0,22$  КОЕ/г и бифидумбактерий -  $\lg 9,3 \pm 0,47$  КОЕ/г. У поросят-отъемышей получавших с профилактической целью «Гидрогемол» уровень данных бактерий на протяжении опыта оставался стабильно высоким: молочнокислых стрептококков -  $\lg 9,6 \pm 0,57$ - $10,9 \pm 0,33$  КОЕ/г, лактобактерии  $\lg 9,5 \pm 0,14$ - $10,6 \pm 0,25$  КОЕ/г и бифидумбактерий  $\lg 9,9 \pm 0,10$ - $10,3 \pm 0,07$  КОЕ/г.

Таким образом, из полученных данных видно, что применение гидрогемол в составе основного рациона пороссятам в дозе 2,5 - 4,0 мл/кг по схеме 3 дня до и 10 дней после отъема их от матерей, препятствует не только чрезмерному размножению в кишечнике  $\beta$ -гемолитических эшерихий, но и угнетает ее патогенные свойства (выработку гемолизина), что является весьма важным свойством препарата. Кроме того, кормовая добавка сдерживает рост условно патогенных бактерий, таких как стафилококки, клостридии и энтерококки, причем у последних подавляет гемолитические свойства, но в то же время, стимулирует развитие и размножение собственной симбионтной микрофлоры, в частности лактококков, лакто- и бифидумбактерий. Следовательно, гидрогемол, оказывая благотворное действие на полезную микробиоту кишечного тракта поросят, поддерживает на высоком уровне колонизационную резистентность, тем самым препятствует развитию острых кишечных инфекций, в основе которых лежат глубокие нарушения микрoэкологического равновесия.

В результате проведенных исследований, установлено, что кормовая добавка позитивно влияет на эритро- и лейкопоз, повышает насыщенность эритроцитов гемоглобином, что имеет важное значение в профилактике анемических процессов в период заболевания поросят колидиарей. Кроме того, гидрогемол не только способствует повышению общего количества лейкоцитов, но стабилизирует их популяционный состав, (в частности количество нейтрофилов и эозинофилов), а также сокращает срок созревания юных форм лимфоцитов.

Результаты опыта показали, что введение пороссятам в основной рацион КД «Гидрогемол» способствует повышению у них обмена веществ. В частности нормализует белковый, минеральный, углеводный и витаминный обмен, это позитивно отражается на факторах естественной резистентности поросят в период отъема и переболевания их колидиарей.

КД «Гидрогемол», стимулирует Т-, В-клеточное и фагоцитарное звено иммунитета, повышая их количественное содержание и функциональную активность. Так, если у поросят, которые после отъема от свиноматок были только на основном рационе, наблюдали снижение всех звеньев иммунитета приводящее к более широкому распространению колидиарей, а следовательно, к потере продуктивности, то у поросят, получавших гидрогемол как дополнение к основному рациону более высокое состояние иммунитета позволяло им активно противостоять болезни и сохранять свою продуктивность, о чем свидетельствовали результаты перевески поросят-отъемышей (табл. 4). Исходя из выше изложенных данных видно, что гидрогемол обладает многими полезными свойствами. Помимо вкусовых и питательных качеств, обеспечивающих высокую поедаемость кормов, а следовательно, более быстрый рост и развитие поросят, он оказывает пробиотическое действие за счет нормализации экосистемы желудочно-кишечного тракта, в результате стимулирования размножения собственных лакто- и бифидумбактерий и

угнетения условно патогенной и патогенной микрофлоры

Таблица 4

Влияние препарата на прирост живой массы тела поросят-отъемышей

| Показатель                                                                 | Опытная<br>(n=10) | Контрольная<br>(n=10) |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Общий вес до/после опыта, кг                                               | 88,0/123,0        | 88,1/117,0            |
| Средний вес одного поросенка<br>до/ после опыта, кг                        | 8,8/12,3          | 8,81/11,7             |
| Среднесуточный прирост жи-<br>вой массы тела по группе, кг<br>(за 13 дней) | 3,5               | 2,9                   |
| Среднесуточный прирост на<br>одно живогное, г (за 13 дней)                 | 269,2             | 222,3                 |

Кроме того, имея в своем составе биологически активные вещества (органические и аминокислоты, микро-, макроэлементы) кормовая добавка нормализует обмен веществ и тем самым повышает общую резистентность организма поросят, что является одним из ключевых моментов в профилактике колидиарей у поросят-отъемышей. Следует отметить, что гидрогемол является полностью регенерируемым продуктом, он не представляет угрозы ни для самих животных ни для окружающей среды и обслуживающего персонала. А высокая окупаемость предопределяет целесообразность внедрения гидрогемола в свиноводстве.

### **3.4.3 Применение антитоксической гипериммунной поливалентной сыворотки из местных штаммов против колибактериоза молодняка КРС и свиней**

Животных предназначенных для получения гипериммунной поливалентной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных предварительно исследовали на сальмонеллез, бруцеллез, туберкулез, пироплазмидозы и инфекционную анемию. В качестве бактериального антигена для индукции процесса антителообразования у лошадей - доноров была использована гидроокисьалюминиевая вакцина из местных штаммов *E. coli* O15, O9, O20, O78, O8, O18, O26, O2 для телят и O26, O8, O103, O138, O101, O15, O18, O2 для поросят, обладающих факторами адгезии K99, K88, F41, A20 и 987P, выделенных в хозяйстве от больных телят и поросят в острой стадии болезни. Культуры *E. coli*, отобранные для производства вакцины наиболее чаще выделялись от телят и поросят, а также обладали следующими фактора-

ми патогенности вырабатывали шигатоксины, некротизирующий токсин, гемолизины

Бактериальный антиген вводили подкожно, в область средней трети шеи и коленной складки в нарастающих дозах 5-10-15-20-25-30-35-40 мл с интервалом 5 дней в качестве иммуностимулятора использовался иммунофан в дозах 4 мл на животное. В результате гипериммунизации получили поливалентную сыворотку с титрами агглютининов от 1 8600 до 12400 для телят и поросят. Полученную сыворотку консервировали 5% раствором фенола до конечной концентрации 0,5%, отстаивали, фильтровали, расфасовывали во флаконы. После получения сыворотку контролировали на безвредность и стерильность по общепринятым методикам. Превентивную активность полученной поливалентной сыворотки из местных штаммов определяли на беспородных белых мышах живой массой 13-15 г. В качестве тест-культуры использовали выделенные штаммы *E. coli*.

Испытания лечебного и профилактического действия полученной поливалентной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных проведены в условиях МТФ №2 и СТФ №1 ОАО ГПЗ им. В. И. Чапаева.

В качестве сравнения использовались контрольные группы телят и поросят с клиническими признаками колибактериоза, которые лечились по традиционной сложившейся схеме с использованием таких средств как левомецитин, поливалентная сыворотка против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных (Армавирская биофабрика), настой ромашки аптечной, физраствор.

В случае колибактериоза телят в опытной группе применяли гипериммунную сыворотку против колибактериоза включающую серотипы O15, O9, O20, O78, O8, O18 и специфические адгезины *E. coli* K88, K99, A20, 987P и F41, внутримышечно в дозе 2 мл на 1 кг веса двукратно с интервалом 24 часа. Телят второй контрольной группы лечили с использованием левомецитина в дозе 20 мг/кг массы 3 раза в день за 30 минут до кормления, а также поливалентной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных (Армавирская биофабрика) в дозе 1 мл/кг веса дважды с интервалом 24 часа. В третьей контрольной группе телят лечили с применением левомецитина в дозе 20 мг/кг массы 3 раза в день и настоя ромашки аптечной (1:10) в дозе 5 мл/кг веса 3 раза в день за 30 мин до кормления. Во всех группах лечение начинали с исключения очередной выпойки молозива, а в последующие кормления его объем уменьшали в два раза и разбавляли равным количеством физиологического раствора. К прежнему количеству молозива возвращались постепенно с учетом клинического состояния. Наблюдение за животными вели в течение 15 дней.

В опытной группе в течение 3-5 дней выздоровели все животные, при этом продолжительность лечения составила  $4,35 \pm 0,32$  дня. В контроль-

ных группах, где применялись традиционные препараты и схемы их использования, выздоровели 80%-86,6% подопытных животных, продолжительность лечения была большей на 1,25 - 1,47 дня соответственно. Несмотря на применение поливалентной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных (Армавирская биофабрика) в первой и второй опытных группах погибло соответственно 1 и 2 теленка. Гибель телят и больший период лечения в третьей контрольной группе указывает на недостаточность применения только лишь антибиотиков и симптоматических средств терапии.

При колибактериозе поросят в опытной группе применяли гипериммунную поливалентную сыворотку против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных, включающую серотипы O26, O8, O103, O138, O101, O15 и специфические адгезины E coli K88, K99, A20, 987P и F41, внутримышечно в дозе 2 мл на 1 кг веса двукратно с интервалом 24 часа. Поросят второй контрольной группы лечили с использованием левомицетина в дозе 20 мг/кг массы 3 раза в день, а также поливалентной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных (Армавирская биофабрика) в дозе 1 мл/кг веса трижды с интервалом 24 часа. В третьей контрольной группе лечили с применением левомицетина в дозе 20 мг/кг массы 3 раза в день за 30 минут до кормления и физраствора. Наблюдение за животными вели в течение 15 дней. В первой опытной, второй и третьей контрольной погибло 3, 9 и 14 поросят соответственно, терапевтическая эффективность примененных схем составила 94%, 82% и 72%. Продолжительность лечения по группам в среднем составила  $3,1 \pm 0,41$ ,  $4,6 \pm 0,28$  и  $5,6 \pm 0,28$  дней соответственно.

Для определения профилактического действия гипериммунной поливалентной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных (КНИВИ) в сравнении с используемой в хозяйстве, в течение 2-х месяцев, было сформировано и обработано по две группы телят (150 голов) и поросят (250 голов). Испытуемую сыворотку вводили новорожденным телятам и пороссятам внутримышечно в дозе 1 мл на 1 кг веса двукратно с интервалом 24 часа.

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований нами установлено, что гипериммунные сыворотки для телят и поросят, где в качестве бактериального антигена использованы местные штаммы E coli, при лечении больных эшерихиозом телят и поросят на 6,7% и 12% соответственно эффективнее по сравнению с сывороткой применяемыми в данном хозяйстве ( $P < 0,05$ ). Профилактическая эффективность полученной сыворотки у телят оказалась на 16%, у поросят на 11,6% выше по сравнению с испытанным коммерческим препаратом ( $P < 0,05$ ).

## 4. Выводы

1 Заболеваемость эшерихиозом является одной из причин гибели телят и поросят в Краснодарском крае в период новорожденности и составляет в среднем 48,4 % у телят и 44,8% у поросят. Летальность 23,8 % и 29,0 % соответственно.

2 Наиболее часто от больных диареей телят выделяются *E. coli* с поверхностным антигеном O15 (10,93%), O9 (8,64%), O20 (7,92%), O78 (7,31%), O8 (5,70%), O18 (5,47%), а от поросят O26 (8,87%), O8 (8,12%), O103 (6,31%), O138 (5,81%), O101 (5,26%), O15 (4,78%).

Выделенные от телят и поросят культуры *E. coli* обладали специфическими факторами адгезии в 35,7% и 35,4% случаев соответственно, у телят они чаще всего были представлены A20 42,1%, K99 20,3% и K88 18,5%, у поросят K88 46,4%, K99 23,3% и A20 13,8%. В хозяйствах края ведущая роль в развитии эшерихиоза у телят принадлежит *E. coli* A20, а у поросят *E. coli* K88.

Полевые штаммы *E. coli*, выделенные от поросят, в 43,7% случаев обладали β-гемолитической и в 6,25% - α-гемолитической активностью. *E. coli*, выделенные от телят, β-гемолиз образовывали в 33,3 %, α-гемолиз 4,7%. Для выявления гемолизина *E. coli* использовать кровяной агар с 10% нативной крови барана и добавлением 5% глюкозы, позволяющий четко дифференцировать гемолитические изоляты *E. coli*.

3 Большинство культур *E. coli* высокорезистентно к антимикробным препаратам. Из 31 испытанного препарата 17 (54,8%) средств были высокоактивны по отношению к *E. coli*, выделенных от поросят, и 19 (61,2%) к *E. coli*, изолированных от телят. 42% изученных штаммов *E. coli* не чувствительны и малочувствительны, что свидетельствует о широкой антибиотикорезистентности *E. coli*, циркулирующих на территории Краснодарского края.

4 Высокочувствительный специфичный тест для выявления у *E. coli* продукции шигатоксинов реакция коагуляции (РКА на планшетах) с использованием диагностикума (Д) - 1% -антишигатоксический (произведен в институте им. Тарасевича для лабораторных испытаний) позволяет учитывать накопление шигатоксинов на разных сроках культивирования *E. coli*. Метод биотестирования токсигенности кишечной палочки с использованием инфузории-стилоники позволяет контролировать уровень токсичности и определять время накопления максимального количества токсинов, выделяемых *E. coli* в питательную среду в процессе ее жизнедеятельности.

5 Полученная среда для ускоренной индикации энтерогеморрагической *E. coli* O157 стабильна при воздействии солнечного или электрического света, позволяет достоверно различать сорбит (-) и сорбит (+) бактерии, что может использоваться при первичной дифференциации *E. coli* O157 от других серотипов кишечной палочки.

6 Применение имунофана совместно с вакцинами позволяет увеличить титры специфических антител, а также повысить продолжительность их циркуляции в организме животных, что значительно потенцирует действие данных биопрепаратов. Назначение имунофана телятам с нарушением функции желудочно-кишечного тракта в сочетании с гемотерапией позволило улучшить общее состояние животных, нормализовать основные клинические показатели, увеличить прирост массы тела (на 28,7%) и содержание общего белка (на 5,9%) и каротина (на 13,6%) в сыворотке крови. Бактерицидная активность сыворотки крови возросла на 32,1%, лизоцимная на 72,9% и фагоцитарная активность нейтрофилов на 52,4%.

7 Кормовая добавка «Гидрогемол» позитивно влияет на кишечный микробиоценоз, нормализует обмен веществ и стимулирует иммунитет. Применение КД «Гидрогемол» с профилактической целью по схеме 3 дня до отъема в дозе 2,5 мл/кг и 10 дней после отъема в дозе 4,0 мл/кг 2 раза в сутки снижает заболеваемость на 34,6%, а смертность в 6,8 раза. При этом среднесуточный привес увеличивается в 1,61 раза, окупаемость составляет 14,9 рублей на 1 рубль затрат.

8 Лечебная эффективность гипериммунных антитоксических поливалентных сывороток для получения которых использованы токсигенные штаммы *E. coli*, при колибактериозе телят и поросят была на 6,7% и 12% выше, чем при применении коммерческой сыворотки ( $P < 0,05$ ). Профилактическая эффективность ее была так же на 16% и 11,6% соответственно выше ( $P < 0,05$ ).

## 5. Практические предложения

1 Для повышения эффективности специфической профилактики и лечения больных колибактериозом животных применять антитоксические сыворотки, полученные путем гипериммунизации животных - доноров вакцинами из «местных» штаммов, в сочетании с имунофаном. Наряду с проведением ветеринарно-санитарных мероприятий, улучшением качества кормления, содержания и ухода за животными этиотропную и патогенетическую терапию осуществлять с применением сыворотки, иммуностимуляторов и биологически активных кормовых добавок.

2 При идентификации токсинообразующих *E. coli*, а также оптимизации сроков их культивирования для приготовления вакцин, использовать метод биотестирования токсигенности эшерихий на стилонихиях и реакцию коагулирования (РКА на планшетах), для ускоренной индикации энтерогеморрагической *E. coli* O157 применять усовершенствованную дифференциально-диагностическую среду.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

- 1 Шпонько Ю Б Адгезивная и колициногенная активность штаммов *E coli*, циркулирующих на фермах Краснодарского края/ Ю Б Шпонько // Матер пятой регион научно-практ конф молодых ученых «научное обеспечение агропромышленного комплекса» Краснодар -КГАУ-2003 -С 191-192
- 2 Терехов В И Серотиповой профиль и патогенные свойства эшерихий, выделенных от телят в Краснодарском крае / В И Терехов, Ю Б Шпонько // Материалы Междунар научно-практ конф , Ульяновск -2003 -С 114-115
- 3 Тельнов С Н Серотиповой профиль и антибиотико-чувствительность эшерихии выделенных от поросят больных колибактериозом, в хозяйствах Краснодарского края / С Н Тельнов, В И Терехов, Ю Б Шпонько и др // Материалы всероссийской научно-практ конф и межвузовского координационного совета «Свинина» , 2005 г-С 150-152
- 4 Шпонько Ю Б Применение модифицированной сорбитоловой среды для дифференциации *E coli* O157 / Ю Б Шпонько // Материалы Межд Научн Конференции посвященной 60-летию ГНУ КНИВИ, 2006 -С 255-257
- 5 Шпонько Ю Б Совершенствование методов лечения и профилактики эшерихиоза поросят / Ю Б Шпонько // Ветеринарная патология, 2007 -№1 (20)
- 6 Патент «Способ биотестирования токсигенности кишечной палочки» РФ № 2262529 от 20 октября 2005 года
- 7 Патент «Способ приготовления питательной среды для выявления кишечной палочки серотипа O157» РФ № 2273661 от 10 апреля 2006 года

Заказ № 138, Тираж - 100 экз

---

Опечатано в ООО "Полибиг - 1"  
г Краснодар, ул Дзержинского, 5, тел /факс (861) 21-555-35

---