

На правах рукописи



ИВАНОВА ОЛЬГА МИХАЙЛОВНА

**ДЕЙСТВИЕ АНТГЕЛЬМИНТИКОВ НА МИКРОБНЫЙ И
ИММУННЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ
В РЕГИОНЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

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

**А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Благовещенск 2004

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Бурятской государственной сельскохозяйственной академии имени В. Р. Филиппова.

- Научный руководитель: - доктор ветеринарных наук,
профессор Цыдыпов В.
- Официальные оппоненты: - доктор ветеринарных наук,
профессор Р.М. Салимов
- кандидат ветеринарных наук
А.И. Сорокина

Ведущая организация: Государственное научное учреждение Научно-исследовательский институт ветеринарии Восточной Сибири СО РАСХН
(г.Чита)

Защита диссертации состоится «10 ноября» 2004г. в 14 часов на заседании диссертационного совета КМ 220.027.01 в Дальневосточном государственном аграрном университете по адресу: 675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ДальГАУ

Автореферат разослан « 5 » октябрь 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор ветеринарных наук, профессор



Н.М. Мандро

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последнее время появилась необходимость комплексно-системного подхода к ветеринарно-санитарным мероприятиям в профилактике инвазионных и инфекционных заболеваний с позиции ветеринарной экологии (Гуславский И.И. с соавт., 1998). Появились работы, которые указывают на возникновение заболеваний ассоциативного характера, имеющие инвазионное и инфекционное начало (Панасюк Д.И., 1978). Этиологические причины их стоят на различных уровнях иерархической лестницы и находятся в тесной трофической и биологической связи между собой, а вызываемые ими патологии зачастую связаны с состоянием экологической ситуации.

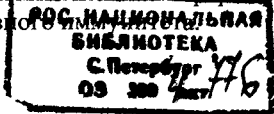
В работах ряда авторов (Мамедова Ф.Х., 1984; Голубков В.Ф., Величкин П.А., 1970; Плиева А.М., Даугалиева Э.Х., 1983) указывается роль инвазионного процесса в запуске механизмов инфекции. Выявлено микробоносительство гельминтами, которое впоследствии становится фактором передачи инфекции. Применяемые сегодня в профилактической и лечебной работе антгельминтики широкого спектра действия не индифферентны для иммунного и микробного статуса животных, они вызывают иммунодефицитные состояния и супрессии микробного статуса организма (Малахова Е.И., Фролова Н.П., 1980; Третьяков А.М., 2001).

В связи с этим, изучение влияния антгельминтиков широкого спектра действия на микробный и иммунный статус организма животных представляет научный и практический интерес. В тоже время разработка и внедрение комплексного системного подхода в профилактике инвазионных и инфекционных заболеваний приобрело высокую актуальность с позиции ветеринарной экологии.

Цель и задачи исследований. Целью настоящего исследования является изучение влияния антгельминтиков на микробный и иммунный статус организма животных, на биологические свойства микроорганизмов микробного ценоза желудочно-кишечного тракта, проведение коррекции микрофлоры бифидосодержащими препаратами после дегельминтизации и разработка методов одновременной дегельминтизации и микробной санации антгельминтиками и антибиотиками.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить микроэкологические нарушения в кишечнике под влиянием антгельминтиков на микробный статус желудочно-кишечного тракта.
2. Оценить влияние антгельминтиков на биологические свойства микробов.
3. Изучить влияние лечебной дегельминтизации на формирование поствакцинального противолептоспирозного иммунитета.



4. Провести коррекцию микрофлоры кишечника овец бифидосодержащим средством после дегельминтизации авертином.

5. Усовершенствовать методы санации микробоносительства антгельминтиками и антибиотиками.

Научная новизна. Впервые в регионе озера Байкал было изучено влияние антгельминтиков на микробиоценоз кишечника и иммунный статус организма животных, и выявлено их негативное воздействие. Проведен микробиологический мониторинг представителей кишечной микрофлоры свиней, изучены биологические свойства бактерий, их персистентные характеристики и изменчивость после воздействия антгельминтика аверсект-2. Разработан методический подход в санации микробоносительства патогенных микробов с помощью антгельминтиков.

Практическая значимость. Результаты исследований расширяют представление о степени влияния антгельминтиков на микробный и иммунный статус организма овец, свиней и кроликов. Полученные данные показывают, что у животных наблюдаются нарушения в микробиоценозе кишечника под действием этих препаратов, что свидетельствует о возможности возникновения вторичных инфекций и иммунодефицитного состояния. Применение препарата «Био-бифивит» животным после дегельминтизации способствует восстановлению индигенной микрофлоры в короткие сроки. Полученные данные о действии антгельминтиков на стимуляцию роста некоторых патогенных микробов *in vitro* позволяют проводить подбор антгельминтиков с учетом возможного формирования инфекционного начала при дегельминтизации и обострения эпизоотической ситуации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Микробиологические изменения в кишечнике овец, свиней и кроликов в результате дегельминтизации.
2. Изменение биологических свойств и антибиотикочувствительности микроорганизмов под действием антгельминтиков в условиях *in vitro*.
3. Применение бифидосодержащего средства «Био-бифивит» овцам после дегельминтизации авертином.
4. Влияние антгельминтиков аверсект-2 и сантел на формирование поствакцинального противолептоспирозного иммунитета у овец.
5. Влияние аверсекта-2 на изменение видового состава, персистентных и гемолитических свойств кишечной микрофлоры свиньи.
6. Усовершенствование методов санации микробоносительства антгельминтиками.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на международной научно-практической конференции «Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных», посвященной 90-летию профессора В.Р.Филиппова (Улан-Удэ, 2003); в материалах научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов «Проблемы и пер-

спективы развития агропромышленного комплекса Байкальского региона» (Улан-Удэ, 2003); на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии (Ульяновск, 2003); в материалах ежегодной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса Забайкалья» (Улан-Удэ, 2003); в материалах Сибирской международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2004).

Публикации. Основные результаты научных исследований отражены в 8 печатных работах.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 161 страницах компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 19 рисунками. Список литературы включает 194 источника, из них 55 иностранных.

Номер государственной регистрации темы: 01.9.70005.375

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал и методы исследований

Работу проводили с 2001 по 2004 год на кафедре микробиологии, вирусологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, кафедре паразитологии и фармакологии БГСХА имени В.Р.Филиппова, а также в бактериологическом и серологическом отделах Бурятской республиканской научно-производственной ветеринарной лаборатории.

Материал для исследований брали в хозяйствах Мухоршибирского и Тарбагатайского районах. Для бактериологического исследования копрограммы отбирали пробы свежевыделенных фекалий кроликов, свиней и овец. Все микробиологические манипуляции проводили с соблюдением правил стерильности. Фекалии, взятые до утреннего кормления в пробирки с 1 мл физиологического раствора, разводили им же до конечного соотношения к весу фекалий 1:9, после гомогенизации полученную взвесь подвергали последовательным десятикратным разведениям со сменной пипеток в физиологическом растворе от 10^1 до 10^{10} . Затем из каждого разведения материал засевали по 0,1 мл на чашки с твердыми питательными средами с последующим растиранием шпателем, по 1 мл в пробирки с полужидкой, питательной средой. Учет результатов проводили для аэробных бактерий через 24-48 ч и для анаэробных через 48-96 ч культивирования при 37° в условиях микроаэротата. Схема посева материала на питательные среды представлена в таблице 1.

Подсчет количества каждого вида микроорганизмов в 1 г фекалий проводили по формуле $M=N \cdot 10^{n-1}$, где M—число микробов в 1 г; N— количество выросших колоний на чашке или в пробирке; n—степень разведения материала. С целью установления видовой принадлежности и изучения биохимических свойств, выделенных микроорганизмов, их изолировали в чистой культуре, отбирая, колонии лежащие отдельно друг от друга. Выделение и родовую идентификацию осуществляли в соответствии с методиками, изложенными в методической рекомендации 1986 г., и в методике К.К. Раевского, В.М. Добрынина, В.И. Кочеровец (1997).

Таблица 1 Схема посева материала на питательные среды

Питательная среда	Микроорганизмы, выделенные с данной среды	Разведение высеваемого материала												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
среда Блаурокка	бифидобактерии		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
агар Эндо	энтеробактерии		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
агар Плоскирева	сальмонеллы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
желточно-солевой агар	стафилококки		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5% кровяной агар	гемолизирующая кокковая и энтеропатогенная флора		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
среда Левина	протей	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
агар Сабуро	дрожжеподобные грибы		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
агар Вильсон-Блера	клостридии		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Для подсчета бифидобактерий разведения фекалий вводили в свежередуцированную среду Блаурокка в модификации Г.И. Гончаровой (1968), разлитую в пробирки высоким столбиком (не меньше 10 мл), колонии бифидобактерий вырастали в виде характерных образований в нижней части посевной среды. При необходимости пастеровской пипеткой отбирали отдельные колонии, которые подвергали микроскопированию. Окраску препаратов проводили по Граму. Грамположительные клетки с характерными образованиями на концах, рассматривались как принадлежащие к роду *Bifidobacterium*. Для подсчета клостридиальных форм бактерий 0,1 мл каждого разведения добавляли в расплавленную и охлажденную до 56 ° среду Вильсон-Блера. После перемешивания среда с посевами в высоком столбике оставалась при комнатной температуре до застывания. Учет результатов осуществляли по количеству черных колоний в толще питательной среды. Микробы семейства *Enterobacteriaceae* выделяли на средах Эндо, Плоскирева и Левина. На основании морфологии колоний и данных микроскопирования посчитывали

Влияние антгельминтиков на микробный и иммунный статус организма животных в регионе озера Байкал



Рис. 1 Схема исследований

количество кишечных палочек, сальмонелл и протей. Изоляцию стафилококков проводили на желточно-солевом агаре, содержащем 7,5% NaCl, и последующим микроскопированием выросших колоний. Бактерии округлой формы с характерным гроздевидным расположением были отнесены к роду *Staphylococcus*. Для выделения грибов использовали среду Сабуро с тетрациклином (45 мг/л). Выросшие грамположительные крупные круглой или овальной формы клетки с диаметром 2,5-6 мкм, дающие на среде Сабуро бесцветные или слабоокрашенные колонии круглой формы в аэробных условиях при 37 °, были отнесены к грибам рода *Candida*. Для определения количества гемолизирующей энтеропатогенной микрофлоры применяли 5%-ный кровяной МПА. Подсчету подвергались те колонии микроорганизмов, которые образовывали зону гемолиза.

Схема исследования отражена на рисунке 1.

Изучение морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических, гемолитических свойств, выделенных микроорганизмов из кишечника свиньи производили с применением методов общей микробиологии (Биргер М.О., 1983; Герхард Ф., 1983; Антонов Б.И., 1986).

При идентификации и дифференциации микробов применяли систему индикаторных бумажек (СИБ) Горьковского НИИ эпидемиологии Минздрава РФ и планшеты мультимикротестов ММТ-1.

Чувствительность микроорганизмов к различным антибиотикам определяли методом диффузии в агаре с использованием официальных дисков согласно "Методическим указаниям по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам" (МЗ СССР 10.03.83 N 267583).

Антилизосимную активность (АЛА) определяли по модифицированной методике О.В. Бухарина с соавт. (1997). Для определения АИА микроорганизмов использовали метод С.А. Печеркиной с соавт. (1982); В.Ю. Соколова, А.В. Тарасевича (1992). Определение ДНК-азной активности микроорганизмов проводили по методу В. Карпова (1985).

Для определения патогенных свойств изучали способность микроорганизмов лизировать эритроциты, и вызывать гибель лабораторных животных.

Следующим этапом исследований было изучение динамики роста микробных штаммов музейных культур в присутствии антгельминтиков. Для этого готовили мясопептонный бульон, содержащий 1%-ный раствор испытуемых антгельминтиков, куда вносили 1 мл 500 миллионной взвеси микробных культур. Контролем служила среда с микробной культурой без антгельминтика. Изменение роста определяли по показателю оптической плотности путем нефелометрии на приборе КФК-2, с использованием светофильтра в 590 нм с кюветой рабочей длины 10 мм. Все наблюдения вели в течение 48-72 часов с 6-ти часовым интервалом.

Для изучения влияния антгельминтиков на активность антибиотиков культуры высевали на чашки Петри с МПА до момента культивирования их

в присутствии антгельминтиков и после через каждые шесть часов с применением стандартных дисков антибиотиков.

Серотипизацию к антигенным серогруппам лептоспир проводили по общепринятой методике описанной в книге «Лабораторные исследования в ветеринарии» (Антонова В.Я., Блинова П.Н., 1971).

Идентификацию выделенных культур микробов проводили по определителям Берджи (1997), Циона (1948)

Микро-и макрофотографирование проводили с помощью фотоаппарата «Зенит» с применением микрофотонасадки МФН-10 и цифрового фотоаппарата марки «Fugi Finerix 4500». Экспериментальный материал обрабатывали методом вариационной статистики на кафедре информатики и вычислительной техники БГСХА.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Изменение количественного и качественного состава микрофлоры кишечника свиней под влиянием антгельминтика аверсект-2

Исследования проводили в СПК «Искра» Тарбагатайского района на пяти свиньях в возрасте двух месяцев, живой массой 15-20 кг. Животных дегельминтизировали инъекционным препаратом аверсект-2 подкожно в дозе 1 мл на 33 кг массы тела. Исследование фекалий животных проводили до, и после дегельминтизации на 1,3,5 и 15 день.

В результате проведенных исследований нами установлено (табл.2), что в кишечнике свиней под влиянием антгельминтика аверсект-2 достоверно сокращалось количество энтеробактерий через сутки после дегельминтизации. Количество этих микробов на 15-й день исследования снижалось от $(1888 \pm 793,3) 10^6$ до $(0,05 \pm 0,033) 10^6$ микробных клеток в 1г. Достоверно уменьшалось количество бифидобактерий от $(407 \pm 10,9) 10^4$ до $(1,6 \pm 0,21) 10^4$, гемолизирующей микрофлоры от $(33 \pm 8,8) 10^5$ до $(0,3 \pm 0,04) 10^5$, стафилококков от $(6830 \pm 40,3) 10^3$ до $(4,6 \pm 2,7) 10^3$. К пятому дню исследования достоверно возрастало число клостридий по сравнению с исходным количеством. На дрожжеподобные грибы и сальмонеллы антгельминтик влияния не оказывал.

2.2.2 Влияние антгельминтика сантел на микрофлору кишечника овец

Исследования проводили на трех овцах забайкальской, тонкорунной породы, в возрасте 3 года живой массой 35 кг. Сантел вводили в дозе 3,5 мл на животное. Исследование проб фекалий овец проводили до, и после дегельминтизации на пятые и 15-е сутки. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Антгельминтик сантел в кишечнике овец изменял количественный и качественный состав микрофлоры. Под действие препарата на пятый день

Таблица 2. Влияние аверсекта-2 на состав микрофлоры кишечника свиней, lg КОЕ/г

Микробы	Сроки дегельминтизации				
	исходное количество, $M \pm m$	через 1 сутки, $M \pm m$	через 3-е суток, $M \pm m$	через 5 суток, $M \pm m$	через 15 суток, $M \pm m$
сальмонеллы	$(1,8 \pm 1,1) 10^3$	$(0,35 \pm 0,11) 10^3$	$(1,4 \pm 0,8) 10^3$	$(2,9 \pm 1,6) 10^3$	$(0,8 \pm 0,17) 10^3$
энтеробактерии	$(1888 \pm 793,3) 10^6$	$(0,04 \pm 0,006) 10^6 *$	$(0,03 \pm 0,018) 10^6 *$	$(0,1 \pm 0,05) 10^6 *$	$(0,05 \pm 0,033) 10^6 *$
гемолизирующая микрофлора	$(33 \pm 8,8) 10^5$	$(3,6 \pm 1,7) 10^5 ***$	$(3,5 \pm 2,3) 10^5 ***$	$(6,7 \pm 3,8) 10^5 *$	$(0,3 \pm 0,04) 10^5 *$
клостридии	$(3,0 \pm 1,3) 10^5$	$(0,7 \pm 0,3) 10^5$	$(3,6 \pm 0,82) 10^5$	$(10,7 \pm 2,5) 10^5 *$	0
дрожжеподобные грибы	$(4,5 \pm 21,21) 10^6$	$(22,0 \pm 21,30) 10^6$	$(3,0 \pm 0,48) 10^6$	$(3,4 \pm 1,19) 10^6$	$(4,6 \pm 2,21) 10^6$
стафилококки	$(6830 \pm 40,3) 10^3$	$(0,2 \pm 0,06) 10^3 ***$	$(173 \pm 205) 10^3 ***$	$(5,4 \pm 5,7) 10^3 ***$	$(4,6 \pm 2,7) 10^3 ***$
бифидобактерии	$(407 \pm 10,9) 10^4$	$(2,0 \pm 0,39) 10^4 ***$	$(2,3 \pm 0,23) 10^4 ***$	$(4,3 \pm 1,89) 10^4 ***$	$(1,6 \pm 0,21) 10^4 ***$

Примечание: достоверность различий с исходным количеством * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, $n = 5$

Таблица 3. Динамика микрофлоры кишечника овец под действием антгельминтика сантел, Ig КОЕ/г

Микробы	Сроки дегельминтизации		
	исходное количество, $M \pm m$	через 5 суток, $M \pm m$	через 15 суток, $M \pm m$
сальмонеллы	$(14,0 \pm 0,12) \cdot 10^3$	$(4,7 \pm 3,8) \cdot 10^3$	$(0,1 \pm 0,13) \cdot 10^3$ ***
энтеробактерии	$(2,0 \pm 1,6) \cdot 10^6$	$(85,5 \pm 0,88) \cdot 10^{6***}$	$(53,0 \pm 42,3) \cdot 10^6$
гемолизирующая микрофлора	$(0,4 \pm 0,09) \cdot 10^3$	$(7,5 \pm 0,88) \cdot 10^3$ *	0
клостридии	$(1,0 \pm 0,03) \cdot 10^6$	$(3,5 \pm 0,09) \cdot 10^{6**}$	0
дрожжеподобные грибы	0	$(2,0 \pm 0,53) \cdot 10^{6***}$	$(25,5 \pm 0,88) \cdot 10^{6***}$
стафилококки	$(13,0 \pm 3,36) \cdot 10^4$	$(0,03 \pm 0,006) \cdot 10^4$ *	0
бифидобактерии	$(400 \pm 108,8) \cdot 10^3$	$(9,1 \pm 5,42) \cdot 10^3$ *	$(112,0 \pm 83,12) \cdot 10^3$

Примечание: достоверность различий с исходным количеством * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, $n = 3$

Таблица 4. Изменение микрофлоры кишечника овец под действием антгельминтика авертин, lg КОЕ/г

Микробы	Сроки дегельминтизации		
	исходное количество, M±m	через 1 суток, M±m	через 5 суток, M±m
сальмонеллы	$(6,5 \pm 1,7) \cdot 10^3$	$(17,9 \pm 13,4) \cdot 10^3$	$(7,9 \pm 1,96) \cdot 10^3$
энтеробактерии	$(8,25 \pm 4,07) \cdot 10^7$	$(3,1 \pm 2,31) \cdot 10^7$	$(399,5 \pm 93,3) \cdot 10^{7**}$
гемолизирующая микрофлора	$(6,6 \pm 2,50) \cdot 10^4$	0	$(2,5 \pm 2,4) \cdot 10^4$
клостридии	$(2,6 \pm 1,40) \cdot 10^5$	$(8,6 \pm 1,70) \cdot 10^{5*}$	$(30,0 \pm 5,6) \cdot 10^{5***}$
дрожжеподобные грибы	$(5,3 \pm 2,50) \cdot 10^5$	$(5,5 \pm 3,08) \cdot 10^5$	$(350,0 \pm 8,85) \cdot 10^{5****}$
стафилококки	$(3,0 \pm 0,84) \cdot 10^4$	0	$(2,0 \pm 0,76) \cdot 10^4$
бифидобактерии	$(350 \pm 14,2) \cdot 10^5$	$(2,7 \pm 1,50) \cdot 10^{5****}$	$(0,5 \pm 0,26) \cdot 10^{6****}$

Примечание: достоверность различий с исходным количеством *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, n = 4

исследования достоверно сокращалось количество бифидобактерий от $(400 \pm 108,8) 10^3$ до $(9,1 \pm 5,42) 10^3$ микробных клеток в 1г фекалий, стафилококков от $(13,0 \pm 3,36) 10^4$ до $(0,03 \pm 0,006) 10^4$, увеличивалось число энтеробактерий, клостридий и дрожжеподобных грибов. На 15-е сутки исследования происходило достоверное снижение числа сальмонелл от $(14,0 \pm 0,12) 10^3$ до $(0,1 \pm 0,13) 10^3$, увеличение дрожжеподобных грибов и исчезали гемолизирующая микрофлора, клостридии и стафилококки.

2.2.3 Динамика количественного и качественного состава микрофлоры кишечника овец под влиянием антгельминтика авертин

Опыт проводили на четырех спонтанно инвазированных овцах двухлетнего возраста, живой массой около 40 кг.

При дегельминтизации животных использовали антгельминтик авертин, который вводили подкожно в дозе 0,8 мл на кг массы тела. Копрологическое исследование проводили до дегельминтизации и на первые и пятые сутки.

В результате проведенных исследований получили следующие данные (табл. 4).

Через сутки после дегельминтизации овец авертином в микрофлоре кишечника происходили следующие изменения: число бифидобактерий достоверно сокращалось с $(350 \pm 14,16) 10^5$ до $(2,7 \pm 1,5) 10^5$, увеличивалось количество клостридий с $(2,6 \pm 1,4) 10^5$ до $(8,6 \pm 1,7) 10^5$, исчезали гемолизирующая микрофлора и стафилококки.

На 5-й день исследования продолжало достоверно сокращаться количество бифидобактерий, возрастало число клостридий, достоверно увеличилось число энтеробактерий с $(8,25 \pm 4,07) 10^7$ до $(399,5 \pm 93,3) 10^7$, дрожжеподобных грибов с $(5,3 \pm 2,5) 10^5$ до $(320,0 \pm 8,85) 10^5$. Отмечали восстановление гемолизирующей микрофлоры и стафилококков. На сальмонеллы, в численном отношении авертин достоверного изменения не оказывал.

Таким образом, при экспериментальной дегельминтизации аверсект-2, сантел и авертин изменяет соотношение ранее сложившегося микробного баланса в организме свиней и овец в сторону снижения полезной микрофлоры (бифидобактерий) при одновременном увеличении числа условно патогенных бактерий, создавая предпосылки к дисбиотическому состоянию в кишечнике животных.

2.2.4 Влияние беламизола и аверсекта-2 на биологическую характеристику *Escherichia coli* in vitro

Культивирование возбудителя эшерихиоза в присутствии антгельминтиков беламизола-20 и аверсекта-2 оказало влияние на динамику роста *E. coli* (рис.2).

Влияние антгельминтиков на рост in vitro было неадекватным. Рост культуры в присутствии беламизола во все сроки исследования по показателям оптической плотности был ниже контроля (без антгельминтика).

Антгельминтик аверсект-2 существенного влияния на рост *E.coli* не оказывал. Показатели оптической плотности практически совпадали с контрольными показателями.

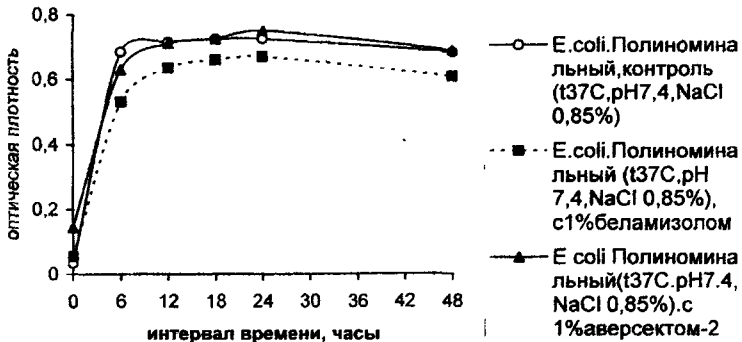


Рис. 2 Влияние беламизола и аверсекта-2 на рост *E. coli*

Изучение изменения чувствительности к антибиотикам *E.coli* под влиянием аверсекта-2 и беламизола проводили в динамике в течение 24 часов через каждые шесть часов (табл. 5). Под влиянием антгельминтика беламизол постепенно нарастала чувствительность культуры к ампициллину с $13,1 \pm 0,06$ мм в контроле до $20,6 \pm 0,17$ мм к 24-м часам культивирования, к канамицину с $12,2 \pm 1,03$ мм до $18,8 \pm 0,81$ мм, к левомицитину с $15,1 \pm 0,07$ мм до $26,3 \pm 0,93$ мм, к стрептомицину с $7,2 \pm 2,18$ мм до $16,5 \pm 0,79$ мм, к тетрациклину с $14,1 \pm 0,92$ мм до $20,3 \pm 1,21$ мм.

Аверсект-2 также приводил к повышению чувствительности культуры к данным антибиотикам, с незначительными колебаниями в сторону снижения чувствительности к 18-часам культивирования, а к 24-м часам чувствительность вновь повышалась.

Таблица 5. Влияние антгельминтиков на активность антибиотиков по отношению к микробной культуре *E. Coli*

Антгельминтик	Задержка роста <i>E.coli</i> в миллиметрам, $M \pm m$					
	время, часы	ампициллин	канамицин	левомицетин	стрептомицин	тетрациклин
Контроль	0	13,1±0,06	12,2±0,07	15,1±0,07	7,2±2,18	14,1±0,92
беламизол	6	13,6±0,03	12,1±0,83	16,2±0,84	8,2±3,17	13,8±0,71
	12	17,0±0,12	15,9±0,62	19,3±0,13	5,5±4,75	14,1±0,23
	18	20,1±0,14	15,0±1,12	19,8±0,74	12,3±2,27	17,2±0,91
	24	20,6±0,17	18,8±0,81	26,3±0,93	16,5±0,79	20,3±1,21
аверсект	6	15,2±0,13	11,3±0,08	16,8±0,21	11,3±0,25	14,2±0,07
	12	20,0±1,06	15,3±0,91	23,4±1,86	16,2±0,74	21,3±0,98
	18	19,1±0,81	12,2±0,75	21,5±0,96	14,8±0,92	15,2±0,71
	24	19,6±0,73	18,4±0,65	24,2±2,03	15,4±0,41	21,8±0,64

2.2.5. Влияние дегельминтизации на уровень антителообразования при вакцинации овец против лептоспироза

В данном разделе работы изучено влияние антгельминтиков сантел и аверсект-2 на антителообразование при иммунизации овец против лептоспироза.

Для этой цели были сформированы три группы овец по три животных в каждой. В первую группу входили животные, которые вакцинировали вакциной против лептоспироза второй вариант, но не подвергали обработке антгельминтиками и служили контролем, вторая группа животных была обработана антгельминтиком сантел на четвертый день после вакцинации вакциной против лептоспироза, третьей группе вводили аверсект-2, также на четвертый день после вакцинации.

При исследовании сыворотки крови овец через 8, 10, 13, 20 дней после вакцинации и проведенной дегельминтизации средний уровень титров антител к антигенам серовариантов лептоспир по группам животных составил: в контрольной группе средний титр к серогруппе Тарассови равнялся – 1:133,33, в третьей группе животных – 1:100,00, а во второй группе животных антитела к группе Тарассови не выявлены. К антигену серогруппы Помона в контрольной группе средний титр антител составил – 1:66,67, во второй группе – 1:100,00 и в третьей группе – 1:66,67. Антитела к антигенам серогруппы Гриппотифоза выявлены во второй и третьей группах животных (1:66,67 и 1:133,33 соответственно). Антитела к антигенам Иктерогеморрагия в титре 1:33,30, Поланд- 1:50,00 и Кабура-1:66,67 выявили только у живог-

ных обработанных аверсектом. На рисунке 3 показана динамика образования антител после применения антгельминтиков.

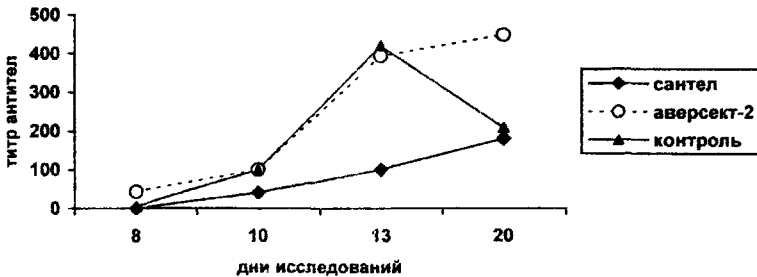


Рис 3 Динамика образования антител после применения антгельминтиков

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что наиболее выраженное антителообразование выявлено у животных третьей группы к антигенам всех серогрупп, в тоже время наблюдается наиболее выраженное угнетение уровня антителообразования у животных, обработанных антгельминтиком сантел, что подтверждается отсутствием антителообразования у животных за исключением серогрупп Помона и Гриппотифоза.

2.2.6. Коррекция микробиоценоза желудочно-кишечного тракта овец после дегельминтизации препаратом «Био-бифивит»

Опыты проводили на овцах, в возрасте 2 года, живой массой 35 кг. Животные были разделены на две группы (контрольную и опытную) по три овцы в каждой. Упитанность животных была средней. Температура тела находилась в пределах физиологической нормы для данного вида и возраста животных. Фекалии у всех опытных животных были полужидкой консистенции несформированными, с прожилками слизи. При копрологических исследованиях в одном грамме фекалий было обнаружено 57 ± 9 яиц трихостронгилид, при этом преобладали яйца нематодирусов.

Опытным животным с лечебной целью задавали бифидосодержащее средство «Био-бифивит». Это комплекс, состоящий из 2 штаммов микроорганизмов *B. longum* В 379М и *B. bifidum* 1, изготовленный на основе стерильного обезжиренного коровьего молока. Препарат смешивали с небольшим количеством воды, *per os* в дозе 2,0 мл/кг массы животного два раза в сутки, начиная с третьего дня после дегельминтизации в течение 12 дней подряд. Были проведены микробиологические исследования фекалий животных до, и после лечения данным средством на 3,7 и 15-й дни (табл.6).

Таблица 6. Состав кишечной микрофлоры овец, Ig КОЕ/г

Микробы	Сроки дегельминтизации			
	исходное количество, М±m	через 3 суток, М±m	через 7 суток, М±m	через 15 суток, М±m
Контрольная группа				
сальмонеллы	$(0,8 \pm 0,15) 10^5$	$(1,9 \pm 0,79) 10^5$	$(0,1 \pm 0,02) 10^5$	$(0,04 \pm 0,02) 10^5$
энтеробактерии	$(52,1 \pm 7,4) 10^5$	$(0,08 \pm 0,008) 10^{5*}$	$(1,9 \pm 1,80) 10^{5*}$	$(0,5 \pm 0,14) 10^{5*}$
гемолизирующая микрофлора	$(15,5 \pm 9,73) 10^3$	$(1,9 \pm 2,71) 10^3$	$(0,1 \pm 0,23) 10^3$	0
клостридии	$(39,0 \pm 26,5) 10^3$	$(0,6 \pm 0,39) 10^3$	$(2,0 \pm 1,76) 10^3$	$(45,0 \pm 30,01) 10^4$
дрожжеподобные грибы	$(24,5 \pm 20,35) 10^4$	$(0,12 \pm 0,21) 10^4$	$(0,12 \pm 0,14) 10^4$	$(0,3 \pm 0,42) 10^4$
стафилококки	$(14,5 \pm 2,7) 10^3$	$(38,5 \pm 4,42) 10^3 *$	$(0,01 \pm 0,015) 10^{1*}$	0
бифидобактерии	$(7,8 \pm 7,4) 10^6$	$(0,05 \pm 0,005) 10^6$	$(0,03 \pm 0,047) 10^6$	$(0,04 \pm 0,08) 10^6$
Опытная группа				
сальмонеллы	$(49,5 \pm 25,66) 10^3$	$(5,8 \pm 0,88) 10^3$	$(0,4 \pm 0,09) 10^3$	0
энтеробактерии	$(35,5 \pm 30,97) 10^5$	$(0,5 \pm 0,15) 10^5$	$(8,2 \pm 4,42) 10^5$	$(52,0 \pm 7,07) 10^5$
гемолизирующая микрофлора	$(5,4 \pm 4,41) 10^4$	$(1,5 \pm 2,56) 10^4$	$(1,9 \pm 1,23) 10^4$	0
клостридии	$(4,5 \pm 0,35) 10^4$	$(0,3 \pm 0,3) 10^{4*}$	$(0,004 \pm 0,0015) 10^{4**}$	0
дрожжеподобные грибы	$(5,7 \pm 2,92) 10^4$	$(0,8 \pm 0,77) 10^4$	$(0,04 \pm 0,023) 10^4$	0
стафилококки	$(20,9 \pm 19,64) 10^4$	$(0,04 \pm 0,13) 10^4$	0	0
бифидобактерии	$(0,3 \pm 0,01) 10^6$	$(0,05 \pm 0,021) 10^6$	$(6,5 \pm 5,92) 10^6$	$(64,5 \pm 8,85) 10^{6*}$

Примечание: достоверность различий с исходным количеством *P<0,05; **P<0,01, n = 3

Контрольные животные не получали бифидосодержащее средство

В контрольной группе животных на третьи сутки после дегельминтизации авертином уменьшалось количество бифидобактерий, гемолизирующей микрофлоры, клостридий, дрожжеподобных грибов, увеличивалось число сальмонелл. Отмечалось достоверное увеличение числа стафилококков и уменьшение энтеробактерий. Исчезновение стафилококков и гемолизирующей микрофлоры отмечали на 15-е сутки исследования.

У животных, получавших бифидосодержащее средство после дегельминтизации авертином, в качественном и количественном составе микрофлоры кишечника произошли позитивные изменения.

В опытной группе животных после дегельминтизации на третьи сутки отмечали снижение числа всех представителей данной микрофлоры, отмечали достоверное снижение количества клостридий. После применения животным препарата «Био-бифивит» продолжало достоверно сокращаться число клостридий и стафилококков. На 15-е сутки достоверно увеличивалось число бифидобактерий, не высевались сальмонеллы, гемолизирующая микрофлора, клостридии, дрожжеподобные грибы и стафилококки.

Результаты наших исследований показали, что используемый в практике для дегельминтизации препарат широкого спектра действия авертин приводит к изменению количественного и качественного состава микрофлоры кишечника овец. Применение препарата «Био-бифивит» в дозе 2,0 мл/кг массы тела в течение 12 дней подряд позволяет в короткие сроки нормализовать микрофлору кишечника овец, восстанавливая качественный и количественный состав кишечной флоры. Уже через пять дней после применения этого средства у овец наблюдали выделение сформированных фекалий. Дегельминтизация и одновременная коррекция нарушений микробиоценоза кишечника овец препаратом «Био-бифивит» ведет к нормализации состава кишечной микрофлоры и повышает колонизационную резистентность полезной микрофлоры в организме хозяина.

2.2.7. Динамика персистентных характеристик представителей кишечной микрофлоры свиньи под влиянием антгельминтика аверсект-2

В данном разделе работы нас интересовал вопрос изменчивости персистентных характеристик микроорганизмов кишечной флоры свиньи под влиянием антгельминтика аверсект-2 в динамике, так как, эти показатели являются наиболее достоверными в оценке степени потенциальной патогенности.

Изменение персистентных характеристик и гемолитической активности некоторых культур, выделенных, до дегельминтизации и высеваемых в разные сроки после дегельминтизации выглядели следующим образом: Культура *Vac.subtilis* до дегельминтизации не обладала гемолитической, антиинтерфероновой активностями, и обладала антилизоцимной и ДНК-ной активно-

стями. Через сутки после дегельминтизации отмечали сомнительную реакцию на гемолиз эритроцитов, культура приобретала антиинтерфероновую активность, на третьи сутки приобретала гемолитическую активность с зоной просветления 1 мм, обладала антилизоцимной, антиинтерфероновой и ДНК-ной активностями.

Vac.mycoides до дегельминтизации обладала гемолитической (1 мм), антилизоцимной, антиинтерфероновой и ДНК-ной активностями. Через сутки после применения аверсекта отмечали усиление гемолитической активности культурой, зона гемолиза эритроцитов равнялась – 3 мм, культура утрачивала ДНК-ную активность, и сохраняла антилизоцимную и антиинтерфероновую активности. На 15-е сутки у культуры отмечали гемолитическую активность с зоной гемолиза-2 мм. и культура приобретала способность к ДНК-ной активности.

Vac.mascagens до дегельминтизации обладала гемолитической активностью, зона гемолиза составляла - 5 мм, причем культура не обладала антилизоцимной (зона задержки роста 11 мм), антиинтерфероновой (зона задержки роста 14 мм) активностями и обладала сомнительной ДНК-ной активностью. Через сутки после дегельминтизации у культуры отмечали снижение гемолитической активности, зона гемолиза составляла – 1 мм, приобретение антилизоцимной, антиинтерфероновой активностей и потерю ДНК-ной активности.

Vac.laterosporus до дегельминтизации не обладала антиинтерфероновой (зона задержки роста 15 мм) активностью, обладала антилизоцимной, гемолитической (зона гемолиза 1,5 мм) и ДНК-ной активностями. Через сутки после дегельминтизации у культуры усиливалась гемолитическая активность, зона гемолиза составляла 2 мм, и проявлялась антиинтерфероновая активность. Через трое суток в показателях персистентных характеристик изменений не наблюдали. Через пять дней после дегельминтизации зона гемолиза составляла 2 мм, культура по-прежнему обладала антилизоцимной активностью и ДНК-ной, и теряла способность к антиинтерфероновой активности, зона задержки роста культуры составляла 18 мм.

Vac.circulens обладала гемолитической активностью (4 мм), способностью расти в присутствии в среде лизоцима и интерферона, и обладала ДНК-ной активностью. На третьи сутки выделения после дегельминтизации у культуры отмечали снижение гемолитической активности до 3 мм.

Культуру *Serratia liquefacies* высевали из кишечника только до дегельминтизации при этом она не обладала гемолитической, антилизоцимной, антиинтерфероновой активностями и обладала ДНК-ной активностью.

Vac.licheniformis высевали только до дегельминтизации, и культура проявляла способность гемолизировать эритроциты (1 мм), обладала антилизоцимной, антиинтерфероновой и ДНК-ной активностями.

Enterobacter aerogenes до дегельминтизации не проявляла способность к гемолитической активности, обладала антилизоцимной, антиинтерфероновой активностями и не обладала ДНК-ной. На третьи сутки выделения после применения антгельминтика культура обладала сомнительной реакцией на устойчивость к лизоциму, приобретала ДНК-ную активность. На пятые сутки отмечали потерю культурой к антилизоцимной активности, не способность лизировать эритроциты, и сохранение антиинтерфероновой и ДНК-ной активностей.

Enterococcus faecalis до дегельминтизации была не способна к гемолизу, обладала сомнительной реакцией на антилизоцимную и ДНК-ную активность, и обладала антиинтерфероновой активностью. Через трое суток выделения после действия антгельминтика гемолитическая активность отсутствовала, а антилизоцимной, антиинтерферонной активностями культура обладала и не обладала ДНК-ной. Через 15 дней культура приобретала способность гемолизировать эритроциты (1 мм) и ДНК-ную активность.

Таким образом, дегельминтизации свиней в нашем опыте приводит не только к нарушениям в микробиоценозе кишечника и способствует появлению разнообразных видов транзитной микрофлоры, изменяя ее видовой состав, но и вызывает изменение персистентных свойств и гемолитической активности микробов в организме свиней, усиливая их инвазивность.

ВЫВОДЫ

1. Применение антгельминтиков при дегельминтизации животных приводит к нарушениям состава нормальной микрофлоры кишечника кроликов, свиней и овец, вызывая достоверное снижение числа полезной микрофлоры (бифидобактерий) и увеличение числа условно-патогенной. Под влиянием аверсекта-2 в кишечнике свиней достоверно снижается число бифидобактерий от $(407 \pm 10,9) 10^4$ до $(1,6 \pm 0,21) 10^4$, стафилококков от $(6830 \pm 40,3) 10^3$ до $(94,6 \pm 2,7) 10^3$, гемолизирующей микрофлоры от $(33,0 \pm 8,80) 10^5$ до $(0,3 \pm 0,04) 10^5$ на 15-е сутки после дегельминтизации. На пятые сутки после дегельминтизации овец сантелом достоверно возрастает число энтеробактерий от $(2,0 \pm 1,6) 10^6$ до $(85,5 \pm 40,3) 10^5$ микробных клеток в 1г фекалий, гемолизирующей микрофлоры от $(0,4 \pm 0,09) 10^5$ до $(7,5 \pm 0,88) 10^5$, клостридий от $(1,0 \pm 0,03) 10^6$ до $3,5 \pm 0,09) 10^6$, снижается количество бифидобактерий от $(400 \pm 108,8) 10^3$ до $(9,1 \pm 0,09) 10^3$, грибы рода *Candida* на 15-е сутки достоверно увеличиваются от 0 до $(25,5 \pm 0,88) 10^6$.

2. Антгельминтик авертин усугубляет дисбиотические процессы в кишечнике овец, развившиеся на фоне инвазии, что вызывает достоверное уменьшение числа бифидобактерий и увеличение числа условно-патогенной микрофлоры (энтеробактерий, клостридий, дрожжеподобных грибов)

3. Антгельминтик беламазол в 1%-ной концентрации, в жидкой питательной среде (МПБ) подавляет рост *E. coli* и *St. aureus*. Аверсекта-2 и ивер-

тин усиливают рост *St.aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Str. Pneumoniae* Ивертин угнетает рост *St.aureus*. Совместное культивирование возбудителей инфекции с 1%-ным раствором антгельминтиков приводит к изменению чувствительности и устойчивости их к антибиотикам.

4. Вакцинация с последующей дегельминтизацией (с интервалом 4 дня) сопровождается формированием дисбиотического состояния и активизацией отдельных видов потенциально патогенных бактерий. Антгельминтик сантел оказывает иммунодепрессивное действие на выработку антител против лептоспироза в организме овец. а аверсект-2, напротив, действует как иммуностимулятор.

5. Применение бифидосодержащего средства «Био-бифивит» состоящего из 2 штаммов микроорганизмов *B. longum* В 379 М и *B. bifidum* 1 в дозе 2,0 мл/кг массы тела овцам после дегельминтизации авертином приводит к восстановлению нормальной микрофлоры кишечника овец в короткие сроки (через 5 дней после дегельминтизации).

6. Аверсект-2 в течение двух недель изменяет видовой состав микрофлоры кишечника свиней, способствуя появлению разнообразных родов транзитной микрофлоры (*Bacillus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Lemnosporella*, *Klebsiella*, *Listeria*) и персистентные характеристики и гемолитические свойства микроорганизмов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. С целью более выраженного лечебного эффекта и предупреждения негативных воздействий аверсекта-2, пиаветрина, авертина, сантела и клозальбена на иммунный и микробный статус животных мы предлагаем параллельно с антигельминтными препаратами использовать «Био-бифивит» в качестве средства, восстанавливающего нормальную микрофлору кишечника и повышающего иммунобиологическую реактивность.

2. Результаты исследования могут быть использованы в учебном процессе при чтении лекций по микробиологии и паразитологии и при написании справочных пособий и рекомендаций по профилактике и лечению дисбактериозов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 Иванова О.М. Динамика микрофлоры кишечника овец под действием антгельминтика сантел / О.М. Иванова //Проблемы и перспективы развития АПК Байкальского региона: Мат. науч.- практич. конф. молодых ученых и аспирантов (3-4 июня 2003).-Улан-Удэ: БГСХА, 2003.-С.18-19.

2. Иванова О.М. Влияние антгельминтиков на рост микроорганизмов *in vitro* / О.М. Иванова, С.М. Алексеева, В.Ц. Цыдыпов //Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Мат. междунар. науч.- практич. конф., посвящен-

ной 60-летию Ульяновской гос. с.-х. академии (25–26 сентября 2003 г.).- Ульяновск: УГСХА, 2003.-Т.1.-С 199-200.

3. Иванова О.М. Влияние аверсекта-2 на активность антибиотиков / О.М. Иванова, С.М. Алексеева, П.И. Евдокимов, В.Ц. Цыдыпов // Возрастная физиология и патология с.-х животных: Мат. междунар. научной конференции, посвященной 90-летию профессора В.Р. Филиппова (25–27 июня 2003 г.).- Улан-Удэ: БГСХА, 2003.-С.116-117.

4. Алексеева С.М. Рост некоторых возбудителей инфекций под действием препарата ивертин на территории озера Байкал / С.М. Алексеева, О.М. Иванова, В.Ц. Цыдыпов // Проблемы и перспективы развития АПК Байкальского региона: Мат. науч.- практич. конф. молодых ученых и аспирантов (3-4 июня 2003).-Улан-Удэ: БГСХА, 2003.-С.20-23.

5. Евдокимов П.И. Изменение количественного и качественного состава микрофлоры кишечника свиней под действием антгельминтика аверсект-2 / П.И. Евдокимов, О.М. Иванова, А.М. Третьяков, В.Ц. Цыдыпов // Состояние и перспективы развития АПК Забайкалья: Мат. ежегодной науч.-практич. конф..-Улан-Удэ: БГСХА, 2003.-С.61-64.

6. Алексеева С.М. Влияние антгельминтика ивермектина на рост некоторых возбудителей инфекции / С.М. Алексеева, О.М. Иванова, В.Ц. Цыдыпов //Актуальные проблемы ветеринарной медицины* Мат. междунар. науч.-практич. конф., посвященной 60-летию Ульяновской гос. с.-х. академии (25–26 сентября 2003 г.).- Ульяновск: УГСХА, 2003.-Т.1.-С.204-205.

7. Евдокимов П.И. Изменение качественного состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта овец под влиянием антгельминтика авертин / П.И. Евдокимов, О.М. Иванова, А.М. Третьяков, В.Ц. Цыдыпов // Состояние и перспективы развития АПК Забайкалья: Мат. ежегодной науч.- практич. конф..-Улан-Удэ: БГСХА, 2003.-С.64-67.

8. Иванова О.М. Динамика микрофлоры кишечника кроликов под влиянием антгельминтика пиаветрин / О.М. Иванова, В.А. Хребтовская, П.И. Евдокимов, В.Ц. Цыдыпов // Актуальные вопросы вет. Медицины: Мат. Сибирской междунар. науч.- практич. конференции (12–13 февраля, 2004 г.). - Новосибирск: НГАУ, 2004.-С.12-13.

Иванова Ольга Михайловна

ДЕЙСТВИЕ АНТГЕЛЬМИНТИКОВ НА МИКРОБНЫЙ И ИММУННЫЙ
СТАТУС ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ В РЕГИОНЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Автореферат

Лицензия ЛР 020427 от 25.04.1997 г.

Подписано к печати 30.09.2004 г. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$.

Уч.-изд. л. – 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 193.

Отпечатано на ротапринте издательства ДальГАУ
675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86

№19392

РНБ Русский фонд

2005-4

13050