На правах рукописи

ЛОКТЕВА АННА СЕРГЕЕВНА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕ- И ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

ОМСК - 2023

2

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».

Научный руководитель: Плешакова Валентина Ивановна

доктор ветеринарных наук, профессор

Официальные оппоненты: Спиридонов Геннадий Николаевич

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией бактериальных патологий животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

Шкиль Николай Николаевич

доктор ветеринарных наук, доцент,

заведующий лабораторией по разработке новых методов лечения с применением препаратов в сверхмалых дозах Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное

учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»

Защита состоится «14» декабря 2023 года, в 10-00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.026.01 при ФГБОУ ВО Омский ГАУ по адресу: 644008, г. Омск, Институтская площадь, 1

Тел.: (3812) 24-15-35, факс (3812) 24-39-63, E-mail: aa.tarasenko@omgau.org

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО Омский ГАУ http://www.omgau.ru

Автореферат разослан « » 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

канд. ветеринар. наук

Тарасенко Анна Александровна

3

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из актуальных проблем современной ветеринарной науки и практики является обеспечение надежного эпизоотологического и ветеринарно-санитарного контроля животноводческой отрасли (А. А. Алиев, В. В. Семенютин, 2003; Б. Ф. Бессарабов с соавт., 2007; Н. И. Васина, Ю. И. Смолянинов, 2010; В. В. Черненок, 2019). Необходимо отметить, что эколого-технологические факторы, несоблюдение ветеринарно-санитарных и зоогигиенических требований при кормлении и содержании телят, организации отёлов, несвоевременность проведения специфических лечебно-профилактических мероприятий зачастую не позволяют получать новорождённых телят с высоким уровнем обмена веществ и резистентностью к инфекционным болезням (Г. Н. Спиридонов, 2007; А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, Т. А. Ерина, 2014; С. И. Джупина, 2015; А. С. Кашин, В. А. Колесников, 2017; З. З. Ильясова, Р. Т. Маннапова, 2020; С. А. Макавчик с соавт., 2021; А. В. Андреева, А. Ю. Башкиров, О. М. Алтынбеков, 2022; В. Ц. Цыдыпов с соавт., 2022).

Ряд исследователей указывают, что в структуре заболеваемости молодняка крупного рогатого скота болезни желудочно-кишечного тракта занимают ведущее место, при этом наиболее высокий риск развития диарейного симптомокомплекса отмечается в первый месяц жизни, а самая высокая смертность - в первые две недели (Е. А. Люсин, 2017; А. В. Андреева с соавт., 2022). Диарейный симптомокомплекс, возникающий в результате поражения желудочно-кишечного тракта телят условно-патогенными энтеробактериями, развивается в первые дни жизни, сопровождается высокими токсическими явлениями и характеризуется падежом от 10 до 60% от числа больных животных (С. И. Джупина, 2003; Н. Е. Горковенко, Ю. А. Макаров, А. М. Кузьменко, 2009; А. В. Андреева с соавт., 2015).

Помимо известных возбудителей кишечных инфекций, в желудочно-кишечной патологии молодняка принимают участие и малоизученные условно-патогенные бактерии родов Morganella и Providencia, однако, широта распространения заболеваний, вызванных этими бактериями, а также их место в общей структуре кишечных инфекций молодняка остаются недостаточно изученными (Л. С. Каврук, А. Б. Кононенко, C. B. Бритова, 1994; Н. М. Ковальчук, 2003).

Необходимо отметить, что широкое применение антибиотических препаратов при лечении кишечных инфекций привело к возникновению полирезистентности у микроорганизмов, а также угнетению естественной резистентности организма животных (А. В. Забровская, 2012; Е. В. Нефедова, Н. Н. Шкиль, 2021, 2023). Вследствие этого разработка новых и усовершенствование существующих схем профилактики и лечения болезней желудочно- кишечного тракта телят бактериальной этиологии с применением альтернативных антибиотикам препаратов является весьма актуальной проблемой.

4

В этом плане, актуальным и перспективным направлением в системе профилактических и лечебных мероприятий при инфекциях желудочно-кишечного тракта молодняка крупного рогатого скота является комплексное применение пре- и пробиотических препаратов различных фармакологических групп.

Степень её разработанности. В работах отечественных и зарубежных исследователей изучен энтеромикробиоценоз телят, как в норме, так и при кишечных инфекциях (Н. Н. Шкиль, 2011; М. С. Маннова с соавт., 2020; Н. Н. Якименко с соавт., 2020). Изучено влияние различных пре- и пробиотических препаратов на качественный и количественный состав микрофлоры кишечника и ряд иммунобиологических показателей телят (А. А. Башаров, Ф. С. Хазиахметов, 2010; И. Н. Пенькова с соавт., 2021; А. В. Андреева, Г. М. Султангазин, 2022).

Вопросы генетического разнообразия микрофлоры кишечника телят по-прежнему остаются малоизученными. В настоящее время предложено большое количество схем лечения желудочно-кишечных инфекций телят на основе применения пре- и пробиотиков. Вместе с тем, имеется ограниченное количество публикаций, посвященных сочетанному применению пре- и пробиотических препаратов, и, кроме того, отсутствуют данные о возможности использования иммуномодулирующего препарата Декстраналь-40 в качестве пребиотического препарата в комплексной профилактике и лечении инфекций желудочно-кишечного тракта молодняка крупного рогатого скота.

Цели и задачи. Цель исследования - изучить энтеромикробиоценоз, клинико¬иммунологические показатели новорождённых телят при желудочно-кишечных инфекциях с диарейным симптомокомплексом, а также дать экспериментальное обоснование применению пре- и пробиотических препаратов Декстраналь-40, Ветом 1 и Bacillis spp. F для их профилактики и лечения.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить структуру возбудителей желудочно-кишечных инфекций новорождённых телят, обусловленных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами с учетом этиологического значения бактерий родов Morganella и Providencia в животноводческих хозяйствах Омской области.

2. Изучить основные биологические свойства сочленов энтеромикробиоценоза новорождённых телят с диарейным симптомокомплексом и их резистентность к антибиотическим препаратам.

3. Выяснить видовое разнообразие микробиоты кишечника у новорождённых телят на фоне применения препарата Декстаналь-40 на молекулярно-генетическом уровне путем секвенирования гена 16S рРНК.

5

4. Определить влияние комбинированного применения пребиотика Декстаналь-40 и пробиотиков Ветом 1 и Bacillis spp. F на энтеромикробиоценоз, клинико-гематологические показатели и иммунобиохимический статус новорождённых телят, как клинически здоровых, так и с диарейным симптомокомплексом.

5. Разработать практические рекомендации по применению препарата Декстраналь-40 в сочетании с Ветомом 1 и Bacillis spp. F для профилактики и лечения желудочно-кишечных инфекций новорожденных телят в ветеринарной практике животноводческих хозяйств региона.

Научная новизна. Уточнены и дополнены сведения об основных сочленах энтеромикробиоценоза, обуславливающих желудочно-кишечные инфекции новорождённых телят с диарейным симптомокомплексом. Установлено, что наиболее часто микрофлора больных телят представлена следующими таксономическими единицами: Proteus spp., E.coli, Enterococcus spp., K.pneumoniae, C.freundii, Enterobacter spp. Подтверждена этиологическая роль в инфекционной патологии желудочно-кишечного тракта новорождённых телят бактерий родов Morganella и Providencia.

Впервые с помощью секвенирования гена 16S рРНК проведен анализ как общего таксономического разнообразия энтеромикробиоценоза новорожденных телят, так и после применения препарата Декстраналь-40. Выявлено, что применение препарата Декстраналь-40 положительно повлияло на энтеромикробиоценоз и сопровождалось снижением потенциально патогенных Escherichia и Shigella и повышением обилия Blautia sp. и Lachnospiraceae.

Выяснено, что препарат Декстраналь-40 в сочетании с пробиотиками Ветом 1 и Bacillis spp. F оказывает корригирующее влияние на энтеробиоценоз новорождённых телят с диарейным симптомокомплексом. Установлено положительное влияние препаратов на основные клинические, биохимические и иммунобиологические показатели организма новорождённых телят с патологией желудочно-кишечного тракта.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные новые данные расширяют и уточняют научно-теоретические положения об этиопатогенезе желудочно¬кишечной патологии телят в раннем постнатальном онтогенезе. Проведённые исследования выявили относительно высокую частоту регистрации микроорганизмов родов Morganella и Providencia, что указывает на их участие в этиопатогенезе инфекций желудочно-кишечного тракта у новорождённых телят. Экспериментальное обоснование и практическая апробация комплексного применения препаратов Декстраналь-40, Ветом 1 и Bacillis spp. F показало их высокую способность оптимизировать энтеромикробиоценоз и иммунобиохимические показатели крови новорождённых телят, а также повысить продуктивные показатели молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах региона.

6

Методология и методы исследования. Методологической базой исследования явились общенаучные методы, в частности, анализ источников литературы и собственных фактических данных, их синтез и обобщение. При проведении исследований применяли различные методы изучения и анализа: эпизоотологический, клинический, бактериологический, молекулярно - генетический, иммунобиохимический, статистический. Объектом исследования служили новорожденные клинически здоровые телята черно-пестрой голштинизированной породы и с диарейным симптомокомплексом.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Профиль основных сочленов энтеромикробиоценоза при инфекционной патологии желудочно-кишечного тракта у телят с диарейным симптомокомплексом, с учетом этиологической роли бактерий родов Morganella и Providencia.

2. Фено-генотипические особенности фекальных культур микроорганизмов, выделенных у новорождённых телят с диарейным симптомокомплексом и их резистентность к широко применяемым в ветеринарной практике антибиотическим препаратам.

3. Влияние пребиотика Декстраналь-40 в сочетании с пробиотиками Ветом 1 и Bacillis spp. F на энтеромикробиоценоз, клинико-гематологические показатели, иммунобиохимический статус и продуктивность новорождённых телят с инфекционной патологией желудочно¬кишечного тракта.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается применением общепринятых микробиологических и современных молекулярно-генетических методов и статистической обработкой полученных результатов. Диссертационная работа выполнена в соответствии с темой научных исследований кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВО Омский ГАУ «Усовершенствование методов диагностики, профилактики и лечения инфекционных и паразитарных болезней сельскохозяйственных животных и птиц» (№ гос. Регистрации 123022800059-0).

Основные результаты научной работы доложены на российских и международных научно-практических конференциях и форумах: «Актуальные проблемы ветеринарной науки и практики» (Омск, 2021), «Актуальные научно-технические средства и сельскохозяйственные проблемы» (Кемерово, 2022), «Прикаспийский международный молодежный научный форум агропромтехнологий и продовольственной безопасности 2023» (Астрахань, 2023), «Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологи и биотехнологии» (Ульяновск, 2023).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных статей, отражающих основное содержание диссертационной работы, в

7

том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах компьютерного текста и состоит из введения, основной части, обзора литературы, собственных исследований, заключения, обсуждения полученных результатов, выводов, списка используемых сокращений, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 11 рисунками. Список литературы включает 235 источников, из них 74 иностранных авторов.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1. Материалы и методы исследования

Работа выполнена в период с 2020 по 2023 год на кафедре ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВО Омский ГАУ; на базе бюджетного учреждения «Омская областная ветеринарная лаборатория» в бактериологическом отделе; на базе ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; в лаборатории ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»; в сельскохозяйственных животноводческих предприятиях Омской области.

Исходным материалом для изучения этиологии бактериальных болезней продуктивных животных служили данные документов ветеринарной отчетности Омской областной ветеринарной лаборатории за 2017-2022 годы, а также результаты собственных исследований.

Объект исследования - телята черно-пестрой голштинизированной породы, в возрасте от рождения до 2-х мес.

Для разработки эффективных схем лечения и профилактики диарейного симптомокомплекса у новорожденных телят применяли препараты Декстраналь-40 (АО ФНПЦ «Алтай», Алтайский край, г. Бийск), Ветом 1 (ООО НПФ «Исследовательский центр», Новосибирская область, р.п. Кольцово), Bacillus spp. F (ФБУН ГНЦЦ ВБ «Вектор», г.Новосибирск).

Было сформировано две группы новорожденных телят по принципу аналогов для изучения влияния препарата Декстраналь-40 на состав микрофлоры кишечника телят. Животным опытной группы (n=8) вводили в рацион препарат Декстраналь-40, телята контрольной группы (n=8) находились на обычном рационе.

Для определения влияния препарата Декстраналь-40 и пробиотиков на микрофлору кишечника и иммунобиохимические показатели телят с диарейным симптомокомплексом, сформировано две опытные и одна контрольная группы телят, по 5 голов в каждой. Телятам первой опытной группы выпаивали Декстраналь-40 в сочетании с Ветомом 1; телятам второй

8

опытной группы выпаивали Декстраналь-40 в сочетании с бактериальной суспензией Bacillus spp. F; животных контрольной группы лечили по схеме, утвержденной в хозяйстве.

Также была исследована профилактическая эффективность сочетанного применения препаратов Декстраналь-40, Ветом 1 и бактериальной суспензией Bacillus spp. F на клинически здоровых телятах, для чего сформировали две опытные группы и одну контрольную. Телятам первой группы выпаивали Декстраналь-40 и Ветом 1; второй - Декстраналь-40 и бактериальную суспензиею Bacillus spp. F; животные контрольной группы находились на обычном рационе.

Из проб ректальных смывов телят производили посевы на простые и дифференциально-диагностические питательные среды. Культивирование осуществляли при 37°С в течение 24-48 часов. После выделения чистой культуры определяли родовую, а затем видовую принадлежность микроорганизма.

Патогенные свойства выделенных культур микроорганизмов изучали постановкой биопробы. Чувствительность выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам определяли в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Метагеномные исследования проводили на базе института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск). Иммуннобиохимические показатели крови телят изучали в лаборатории ФГБНУ «Омский аграрный научный центр».

Описательную статистику и сравнение обилия по группам (по непараметрическому критерию Манна-Уитни) проводили с помощью статистического пакета Statistica v.13.3 (TIBCO Software Inc., USA). Проверку достоверности различия результатов проводили с помощью таблицы t-распределения Стьюдента.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Видовой состав возбудителей кишечных инфекций, выделенных от сельскохозяйственных животных Омской области

В ходе выполнения данной работы был проведен ретроспективный анализ инфекционных болезней животных бактериальной этиологии на сельскохозяйственных предприятиях Омской области. По данным бактериологического отдела БУ «Омская областная ветеринарная лаборатория» в период с 2017 по 2022 гг., при исследовании проб от больных животных, диагноз «кишечная инфекция» (в т.ч. «смешанная кишечная инфекция») установлен в 39,02% случаев. К возбудителям данной патологии отнесены бактерии порядка Enterobacterales, а также представители родов Enterococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Pseudomonas и другие. Также среди болезней желудочно-кишечного тракта животных ведущая роль отводится

9

колибактериозу и сальмонеллезу. Указанные лабораторные диагнозы устанавливали в 27,96% и 0,53% случаев соответственно.

В таблице 1 показан видовой состав возбудителей бактериальных инфекций желудочно¬кишечного тракта сельскохозяйственных животных, зарегистрированных в период с 2017 по 2022 гг.

Таблица 1 - Видовой состав возбудителей бактериальных инфекций желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных Омской области (2017-2022 гг.)

Род Количество культур Удельный вес от общего числа возбудителей, %

Спорообразующие палочки

Bacillus 14 0,49

Clostridium 29 1,02

Неспорообразующие грамотрицательные палочки

Citrobacter 184 6,49

Enterobacter 43 1,52

Escherichia 1593 56,21

Hafnia 4 0,14

Klebsiella 70 2,47

Morganella 26 0,92

Proteus 537 18,94

Providencia 17 0,6

Pseudomonas 60 2,12

Salmonella 15 0,53

Serratia 2 0,07

Shigella 2 0,07

Yersinia 5 0,18

Грамположительные кокки

Enterococcus 132 4,66

Staphylococcus 67 2,36

Streptococcus 34 1,2

Анализ данных, представленных в таблице 1, свидетельствует о том, что основную часть возбудителей желудочно-кишечных инфекций животных составляют бактерии родов Escherichia (56,21%), Proteus (18,94%), Citrobacter (6,49%), Enterococcus (4,66%), и Klebsiella (2,47%). При этом 1730 (61,04%) культур выделяли в ассоциации, среди которых чаще всего регистрировали: E.coli+P.mirabilis (23,82%), E.coli двух и более различных серотипов (10,52%), E.coli+ E.faecalis (8,67%), E.coli+ P.vulgaris ( 8,32%), E.coli+ C.freundii (7,86%). Так, наиболее часто выделяли E.coli в ассоциации с другими условно-патогенными микроорганизмами, при этом эшерихии, принадлежали разным серотипам, а именно О2, О8, О78, О115 и другим.

Также были проанализированы данные по антибиотикорезистентности возбудителей кишечных инфекций, выделенных от продуктивных животных. Установлено, что

10

чувствительными к АМП были лишь 7,1% культур, полирезистентными являлись 91,7% изолятов, а 1,2% отнесли к панрезистентным.

2.2.2. Энтеробиоценоз новорожденных телят с диарейным симптомокомплексом

Были проведены бактериологические исследования проб ректальных смывов от новорожденных телят (n=92) с клинически выраженными признаками диарейного симптомокомплекса. В результате бактериологического исследования ректальных смывов было выделено 247 культур условно-патогенных микроорганизмов.

Среди условно-патогенных микроорганизмов преобладали представители порядка Enterobacterales (74,9% от общего количества выделенных изолятов). Из них доминировали бактерии рода Proteus, а именно 52 изолята P.mirabilis (21,05%) и 16 P.vulgaris (6,48%). Escherichia coli регистрировали в 18,22% случаев. Из 45 культур 26,7% оказались непатогенными, а 73,3% обладали соматическими О-антигенами, что позволило определить их серогрупповую принадлежность. Наиболее часто выделяли E.coli серотипов О33 (18,2%), О78 (18,2%), О2 (15,2%), О20 (12,1%), О41 (9,1%) и другие.

Также среди энтеробактерий были изолированы культуры K.pneumoniae (6,48%), C.freundii (6,07%), E.cloaceae (5,26%) и E.aerogenes (0,81%), P.stuartii (3,24%) и P.rettgeri (2,43%), а также M.morganii (4,86%). Бактерии рода Enterococcus регистрировали в 7,69% случаев, они были представлены двумя видами - E.faecalis (6,88%) и E.faecium (0,81%). Культуры синегнойной палочки выделяли в 4,86% проб. Стафилококки были представлены тремя видами - S.aureus (3,64%), S.epidermidis (0,81%) и S.saprophyticus (0,81%). Реже всего выделяли стрептококки (0,81%), которые с учетом их биохимических и культуральных свойств были отнесены к Р-стрептококкам группы G.

Ассоциации микроорганизмов регистрировали в 78,54% случаев, из них наиболее распространенными были E.coli+P.mirabilis (10,99%); P.mirabilis+C.freundii (9,89%); E.coli+E.cloaceae (9,89%); P.mirabilis+E.faecalis (9,89%); P.mirabilis+K.pneumoniae (8,79%) и E.coli+P.vulgaris (7,69%).

Помимо условно-патогенных бактерий из проб ректальных смывов телят была выделена нормофлора. Так, культуры Lactobacillus spp. регистрировали в количестве 4,17±0,31 lg КОЕ/г, что является нижней границей нормы для клинически здоровых телят, и Bifidobacterium spp. в количестве 5,37±0,16 lg КОЕ/г, что также меньше нормальных показателей (таблица 2).

11

Таблица 2 - Количественная характеристика представителей кишечной микрофлоры

новорожденных телят (1-15 сут), lg КОЕ/г

Фактическое значение Норма

Lactobacillus spp. 4,17±0,31 4-6

Bifidobacterium spp. 5,37±0,16 6-7

E.coli 3,88±0,25 3-6

Staphylococcus spp. 3,46±0,24 < 3

Enterococcus spp. 3,54±0,19 < 3

Streptococcus spp. 1,21±0,09 < 3

Candida spp. 2,78±0,21 < 3

Proteus spp. 4,22±0,27 3

M.morganii 2,25±0,18 2

Providencia spp. 3,47±0,12 3

K.pneumoniae 2,27±0,22 3

C.freundii 3,98±0,24 2

Enterobacter spp. 2,55±0,21 0

P.aeruginosa 2,17±0,13 0

Примечание: 0 - отсутствие показателей.

Среднее значение количества культур кишечной палочки, клебсиелл, стрептококков и грибов рода Candida находилось в пределах нормы. Концентрация остальной условно¬патогенной микрофлоры превышала норму, а именно Staphylococcus spp. - в 1,15 раза (3,46±0,24), Enterococcus spp. - в 1,18 раза (3,54±0,19), Proteus spp. - в 1,4 раза (4,22±0,27), M.morganii - в 1,13 раза (2,25±0,18), Providencia spp. - в 1,16 раза (3,47±0,12), C.freundii - в 1,99 раза (3,98±0,24 lg КОЕ/г). Enterobacter spp., как и P.aeruginosa, в содержимом кишечного тракта клинически здоровых телят присутствовать не должны, однако их определяли в количестве 2,55±0,21 lg КОЕ/г и 2,17±0,13 lg КОЕ/г соответственно.

Изучена чувствительность к антимикробным препаратам различных фармакологических групп 231 изолята условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от 92 телят с диарейным симптомокомплексом. Установлено, что возбудители кишечной инфекции телят, а именно Proteus spp., E.coli, Enterococcus spp., C.freundii, K.pneumoniae, Enterobacter spp., Providencia spp., P.aeruginosa в большинстве случаев резистентны к макролидам, тетрациклинам и линкозамидам, в частности к азитромицину, эритромицину, доксициклину, тетрациклину и линкомицину.

2.2.3. Патогенные и персистентные свойства бактерий родов Morganella и Providencia, выделенных от телят с диарейным симптомокомплексом

В результате изучения гемолитической активности установлено, что 50% культур M.morganii, 12,5% культур P.stuartii и 16,7% P.rettgeri, выделенных от телят с диарейным симптомокомплексом, на кровяном агаре образовывали зону в-гемолиза. При изучении

12

адгезивных свойств выявили высокую адгезивную активность у культур Providencia spp. и среднюю у культур M.morganii (таблица 3).

Таблица 3 - Адгезивные свойства микроорганизмов родов Morganella и Providencia, выделенных от телят с диарейным симптомокомплексом

Культуры К, % СПА ИАМ

M.morganii 63,6±2,2 2,41±0,17 3,79

P.stuartii 72,4±0,9 3,18±0,12 4,39

P.rettgeri 77,2±1,3 4,23±0,21 5,48

Примечание: К - коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе, СПА - средний показатель адгезии, ИАМ - индекс адгезивности микроорганизмов.

При исследовании степени патогенности M.morganii с использованием лабораторных животных установлено, что из 12-ти культур 9 (75%) патогенны для белых мышей при LD50 в дозе 0,5\*109 м.к./мл; две (16,7%) проявили патогенные свойства при LD50 в дозе 0,67\*109 м.к./мл, и одна культура (8,3%) патогенна при LD50 в дозе 0,75\*109 м.к./мл. Из 8-ми культур P.stuartii 5 (62,5%) оказались патогенными для белых мышей при LD50 в дозе 0,5\* 109 м.к./мл, две (25%) - при LD50 в дозе 0,84\*109 м.к./мл, и одна культура (12,5%) - при LD50 в дозе 1\*109 м.к./мл. Все культуры P.rettgeri были патогенны для лабораторных животных при LD50 в дозе 0,5\*109 м.к./мл.

Установлено, что среди 12-ти изолятов M.morganii антилизоцимной активностью обладали 7 (58,3%), антикомплементарной активностью - 10 (83,3%). Из 8-ми культур P.stuartii антилизоцимноактивных и антикомплементарноактивных было по 4 (50%), а среди 6-ти изолятов P.rettgeri антилизоцимную активность наблюдали у 4 культур (66,6%), антикомплементарную - у 5 (83,3%). Таким образом, изоляты M.morganii обладают наиболее высокой антилизоцимной и антикомплементарной активностью.

2.2.4. Изучение влияния препарата Декстраналь-40 на энтеромикробиоценоз телят с

помощью секвенирования гена 16S рРНК

На типовом таксономическом уровне у телят, которым выпаивали Декстраналь-40, установлено снижение Proteobacteria (P=0,006) по сравнению с телятами в контрольной группе, которое на уровне класса и порядка проявилось в уменьшении относительно количества Gammaproteobacteria (P=0,014), и Enterobacterales (P=0,027). Необходимо отметить, что представители указанного порядка не установлены среди доминантов как на уровне семейства, так и рода, а также отдельных таксономических единиц. Однако среди минорных сочленов энтеробактериома в опытной группе наблюдали снижение количества условно-патогенных микроорганизмов, в частности Escherichia и Shigella (0,77 vs. 0,0%, P=0,03). Среди

13

доминантных бактерий, отличных между группами по относительному обилию, в большинстве случаев устанавливали наличие Firmicutes. По их таксономическим группам нижнего уровня установлено влияние препарата Декстраналь-40. Необходимо отметить, что у телят опытной группы 30 родов достоверно (P<0,05) и еще 26 родов на уровне 0,05<P<0,1 изменили свое обилие. Кроме того, на фоне применения Декстраналя-40 происходит повышение обилия двух отдельных таксономических единиц, а именно Blautia sp. и Lachnospiraceae.

Также, наряду с 6-ю доминантными ОТЕ, показывавшими изменение своего относительного изобилия под влиянием препарата Декстраналь-40, еще у 67 ОТЕ установлены схожие изменения. Анализ результатов показал, что 59 отдельных таксономических единиц имели потенциальную вероятность изменения их изобилия в связи с применением телятам опытной группы препарата Декстраналь-40 в пределах 0,05<P<0,10. Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что другие немногочисленные и редко встречающиеся ОТЕ, существенно снизившие свое нахождение в пробах фекалий телят, получавших препарат, могут являться потенциальными патогенами.

2.2.5. Применение Декстраналя-40 и пробиотиков при лечении телят с диарейным

симптомокомплексом

Для изучения влияния Декстраналя-40 и пробиотиков на энтробиоценоз и иммунобиохимические показатели телят, в условиях хозяйства были сформированы 3 группы новорожденных телят с клиническими признаками диареи: две опытные и одна контрольная (таблица 4). Наблюдение за животными осуществляли в течение 15 сут.

Таблица 4 - Схема применения Декстраналя-40 в комплексе с пробиотиками телятам с

диарейным симптомокомплексом

Группа Препарат Дозировка и способ введения Кратность введения препарата

I опытная Декстраналь-40 Ветом 1 20 мг/кг внутрь с молоком 50 мг/кг внутрь с молоком Раз в три дня, в течение 15 сут

Двукратно, ежедневно, до исчезновения клинических признаков болезни

II опытная Декстраналь-40

Бактериальная суспензия Bacillus spp. F (0,5\*109 м.к./мл) 20 мг/кг внутрь с молоком 10 мл внутрь с молоком Раз в три дня, в течение 15 сут

Двукратно, ежедневно, в течение 10 сут

Контрольная Амоксициллин-150 1 мл на 10 кг массы тела, внутримышечно Однократно

14

Ежедневно проводили клинический осмотр животных. В начале эксперимента у телят как опытных, так и контрольной групп, отмечали расстройство пищеварения, а именно выделение жидких фекалий до 3 и более раз в сутки, повышенную температуру тела (до 41,3оС) и угнетение. В процессе применения препаратов наблюдали исчезновение клинических признаков диареи у телят опытных групп. У телят контрольной группы (60%) симптомы сохранились, им продолжили антибиотикотерапию и симптоматическое лечение.

Для определения влияния препаратов на состав кишечной микрофлоры были проведены микробиологические исследования проб фекалий животных до и после завершения опыта. Исследование фекалий животных контрольной группы после проведения эксперимента не проводили, т.к. для их лечения применяли антибиотик. Установлено, что резидентная микрофлора представлена лакто- и бифидобактериями, а факультативная - патогенными и непатогенными штаммами эшерихий, стафилококками, бактериями родов Proteus, Morganella и Providencia (таблица 5).

Таблица 5 - Динамика видовых и количественных характеристик условно-патогенной микрофлоры кишечника телят с диарейным симптомокомплексом на фоне применения Декстраналя-40 в комплексе с пробиотиками, КОЕ/г

№

теленка E. coli Staphylococcus

spp. Proteus spp. Morganella

spp. Providencia

spp.

до после до после до после до после до после

I опытная группа

21317 4,9x105\* 5,1x106 1x103 - 1x105 1x102 - - - -

314 2,4x107 2,6x107 - - 1x104 - - - - -

315 1,8x106\* 2,6x106 1x102 1x102 1x104 - - - 1x104 -

21318 1,4x105\* 2,1x106 1x102 - 1x105 1x102 1x105 1x102 - -

21319 1,4x108 1,8x108 - - 1x104 - - - - -

II опытная группа

190 1,1x108 1,3x108 1x104 1x102 1x105 - - - - -

192 1,4x107 2,4x107 - - 1x104 - 1x103 - - -

193 2,3x106 4,7x106 1x103 - 1x105 1x103 - - - -

595 2,2x106 5,8x106 1x103 1x102 1x105 1x103 - - - -

599 1,5x107 3,8x107 1x103 1x102 1x104 - - - 1x104 -

Контрольная группа

313 1,3x106\* - 1x105 - 1x104 - - - - -

21316 4,8x104 - 1x103 - 1x105 - - - 1x104 -

21329 5,7x106\* - 1x103 - 1x105 - - - - -

333 5,1x105 - - - 1x105 - - - - -

21328 4,3x106 - - - 1x104 - - - - -

Примечание: \*в т.ч. энтеропатогенные E.coli О78

15

В фекалиях телят опытных групп после выпаивания препаратов наблюдали рост числа лактобактерий, бифидобактерий и непатогенной кишечной палочки, а также уменьшение количества условно-патогенной микрофлоры.

Через 15 сут после окончания эксперимента у животных обеих групп произвели взятие крови для изучения показателей естественной резистентности (таблица 6).

Таблица 6 - Средние значения показателей естественной резистентности у телят опытных и

контрольной групп после лечения, M±m

Показатель, ед. измерения I опытная группа II опытная группа Контрольная

группа

Лейкоциты, тыс/мкл 9,68±0,49\*\*\* 10,28±0,12\*\*\* 6,72±0,21

Лимфоциты, тыс/мкл 5,48±0,21\*\* 7,27±0,23\*\*\* 4,19±0,34

Т-лимфоциты, тыс/мкл 0,91±0,07 0,99±0,05\* 0,72±0,07

В-лимфоциты, тыс/мкл 1,61±0,19\*\* 1,47±0,15\*\* 0,81±0,05

Цитотоксические Т-лимфоциты, тыс/мкл 1,17±0,12 1,16±0,05 0,96±0,07

ЛКБ, уе. 1,42±0,09\* 1,04±0,09 1,15±0,06

МПО, уе. 1,56±0,10\*\* 1,23±0,10 1,09±0,08

спонтанный НСТ-тест ,у.е.оп.пл 0,56±0,02 0,51±0,03 0,58±0,04

стимулированный НСТ-тест ,у.е.оп.пл 0,44±0,02 0,54±0,06 0,46±0,03

Функциональный резерв нейтрофилов (КС) 0,79±0,03 1,10±0,13 0,84±0,13

Примечание: \*р<0,05; \*\*р<0,01; \*\*\*р<0,001; ЛКБ - лизосомальные катионные белки;

МПО - миелопероксидаза.

На основании проведенных исследований установили, что у телят первой группы после выпаивания препаратов число лейкоцитов было выше в 1,44 раза (р<0,001), лимфоцитов в 1,3 раза (р<0,01) относительно показателей телят контрольной группы. В крови телят второй опытной группы число лейкоцитов было выше в 1,53 раза (р<0,001) и лимфоцитов в 1,73 раза (р<0,001) по сравнению с контролем. Концентрация всех лимфоидных клеток у телят первой опытной группы повысилась, однако достоверного увеличения (р<0,01) достигала только популяция В-лимфоцитов. У телят второй опытной группы также регистрировали высокую концентрацию лимфоидных клеток, достоверного увеличения достигла как популяция В- лимфоцитов (р<0,01), так и Т-лимфоцитов (р<0,05). Уровень ЛКБ у телят первой опытной группы был в 1,23 раза (р<0,05) выше, чем у телят в контроле, ферментативная активность МПО выше в 1,43 раза (р<0,001), что указывает на повышенную функциональную активность лейкоцитов. При исследовании кислородпродуцирующей активности нейтрофилов (НСТ-тест) существенных изменений не установлено.

16

Исследования позволили оценить степень положительного влияния препаратов на метаболический статус телят (таблица 7).

Таблица 7 - Биохимические показатели сыворотки крови телят на фоне применения пре- и

пробиотиков, M±m

Показатель I опытная группа II опытная группа Контрольная группа

Каротин, мг% 0,075±0,003\* 0,050±0,003\* 0,026±0,002

Общий белок, г/л 65,72±1.071 58,22±2,2 67,12±2,615

Креатинин, мкмоль/л 88,22±1,415 92,7±9,25 89,54±10,678

Кальций, ммоль/л 2,22±0,086 2,7±0,07 2,94±0,307

Глюкоза, ммоль/л 6,84±0,110 7,22±0,39 7,34±0,350

Мочевина, ммоль/л 4,46±0,488 4,27±0,97 3,12±0,330

Примечание: \*р<0,001

Установлено, что у животных контрольной группы уровень каротина ниже по сравнению с нормой для новорожденных телят. У животных первой и второй опытных групп после выпаивания препаратов наблюдали уровень каротина в 2,88 раза (р<0,001) и в 1,92 раза (р<0,001) выше, чем в контрольной. У телят в опытных группах не отмечено статистически значимых изменений других показателей. Различия в содержании общего белка, креатинина, мочевины по сравнению с группой контроля минимальны, что свидетельствует о хорошей переносимости используемых препаратов.

2.2.6. Применение Декстраналя-40 и пробиотиков для профилактики диарейного симптомокомплекса у новорожденных телят

Изучение эффективности применения Декстраналя-40 и пробиотиков для профилактики диарейного симптомокомплекса телят проводили в условиях хозяйства на клинически здоровых телятах. Было сформировано 2 опытные и контрольная группы по 5 животных в каждой. Телятам первой группы выпаивали Декстраналь-40 и Ветом 1; второй - Декстраналь-40 и бактериальную суспензию Bacillus spp. F; животные контрольной группы находились на обычном рационе (таблица 8). Наблюдение за животными осуществляли в течение 15 сут.

Таблица 8 - Схема применения препаратов клинически здоровым телятам

Группа Препарат Дозировка и способ введения Кратность введения препарата

I опытная Декстраналь-40 Ветом 1 20 мг/кг внутрь с молоком 50 мг/кг внутрь с молоком Раз в три дня, в течение 15 сут

Однократно, ежедневно, в течение 15 сут

17

II опытная Декстраналь-40

Бактериальная суспензия Bacillus spp. F (0,5х109 м.к./мл) 20 мг/кг внутрь с молоком 10 мл внутрь с молоком Раз в три дня, в течение 15 сут

Однократно, ежедневно, в течение 10 сут

Контрольная Обычный рацион - -

На всем протяжении опыта ежедневно проводили клинический осмотр животных. У телят опытных групп диарейный симптомокомплекс не регистрировали с начала и до конца эксперимента. У трех животных контрольной группы регистрировали клинические симптомы расстройства желудочно-кишечного тракта (диарея, повышенная температура, угнетение) начиная с четвертого дня опыта, назначили симптоматическое лечение и антибиотикотерапию.

С целью определения эффективности схем профилактики провели микробиологические исследования проб фекалий животных до и после применения препаратов (таблица 9). Исследование микрофлоры фекалий трех телят контрольной группы, у которых регистрировали диарейный симптомокомплекс, не проводили, т.к. для их лечения применяли антибиотик.

Таблица 9 - Динамика видовых и количественных характеристик микрофлоры кишечника клинически здоровых телят на фоне применения Декстраналя-40 в комплексе с пробиотиками,

КОЕ/г

№

теленка Bifidobacterium

spp. Lactobacillus

spp. E. coli ys

h

p

tap

S lococcus

pp Proteus spp.

до после до после до после до после до после

I опытная группа

159 105 107 105 106 2,7х105 3,1х106 103 - - -

155 106 107 104 106 5,1х104 2,4х107 - - - -

160 105 107 105 107 3,3х106 2,9х107 102 - - -

365 106 107 104 107 3,9х106 1,8 х 107 - - - -

366 105 108 104 107 1,8 х 106 4,6х107 - - 103 -

II опытная группа

21322 105 108 104 107 1,3х106 4,9х106 - - - -

21323 105 107 104 106 4,7х104 3,4х106 102 - - -

21324 106 107 104 106 5,7х106 1,7х107 - - - -

331 106 107 105 107 1,9х105 2,4х106 - - - -

332 105 108 104 107 1,4х106 1,8 х 107 - - - -

Контрольная группа

335 106 106 105 105 2,8х106 1,4х108 - - - -

336 105 - 105 - 1,7х106 - 103 - - -

21325 105 - 104 - 2,2х106 - - - - -

21326 106 106 105 105 5,8х106 3,5х108 - - - -

21327 106 - 104 - 3,6х107 - - - 103 -

18

Установлено, что после курса выпаивания у телят опытных групп сократилось количество условно-патогенной микрофлоры, и увеличилась популяция лакто-, бифидобактерий и непатогенной E.coli.

Для изучения производственных показателей роста и развития телят произвели измерение их веса при рождении (в начале опыта) и через 2 месяца после выпойки препаратов (таблица 10).

Таблица 1 0 - Влияние пре- и пробиотиков на показатели роста и развития телят

Показатель

Группа

телят Живая масса теленка при рождении, кг Показатели роста, развития телят через 2 месяца после проведения опыта

Живая масса, кг Среднесуточный прирост, г

I опытная 32,6±1,0 79,6±2,0 654,7±27,5

II опытная 32,1±0,6 72,9±1,4 629,7±22,2

Контрольная 32,4±1,2 68,2±5,3 582,8±55,8

Введение препаратов в рацион телят опытных групп обеспечило высокую интенсивность роста на протяжении всего эксперимента. В конце опыта максимальная средняя живая масса была у телят первой группы (Декстраналь-40 + Ветом 1), на 14,32% превышающая показатели животных в контроле. Установили, что максимальный среднесуточный прирост живой массы был у телят первой группы на 10,98% выше, чем в контроле. Таким образом, выпаивание препарата Декстраналь-40 в сочетании с Ветомом 1 показало наибольший эффект, выраженный в повышении живой массы и среднесуточного прироста у телят в первой опытной группе.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1. Выводы

1. Этиологический профиль доминирующих возбудителей желудочно-кишечных инфекций, выделенных от сельскохозяйственных животных Омской области в период с 2017 по 2022 гг. сформирован бактериями родов Escherichia (56,21%), Proteus (18,94%), Citrobacter (6,49%), Enterococcus (4,66%), и Klebsiella (2,47%), при этом в 61,04% случаев инфекции желудочно-кишечного тракта у животных были обусловлены ассоциациями микроорганизмов.

2. В фекалиях новорожденных телят с диарейным симптомокомплексом регистрировали увеличение количества патогенных и условно-патогенных микроорганизмов: Staphylococcus spp. (3,46±0,24 lg КОЕ/г), Enterococcus spp. (3,54±0,19 lg КОЕ/г); Proteus spp. (4,22±0,27 lg КОЕ/г); M.morganii (2,25±0,18 lg КОЕ/г); Providencia spp. (3,47±0,12 lg КОЕ/г); C.freundii (3,98±0,24 lg КОЕ/г); Enterobacter spp. (2,55±0,21 lg КОЕ/г); P.aeruginosa (2,17±0,13 lg КОЕ/г).

19

3. Выделенные культуры M.morganii, P.stuartii и P.rettgeri обладали патогенными свойствами, в частности, высокую степень адгезивной активности наблюдали у P.stuartii (ИАМ 4,39) и P.rettgeri (ИАМ 5,48), а культуры M.morganii показали среднюю степень адгезивности (ИАМ 3,79), что свидетельствует об участии микроорганизмов в этиопатогенезе желудочно¬кишечных инфекций новорожденных телят.

4. Персистентные свойства изолятов Morganella проявляются в наиболее высоком уровне АЛА (3,08±0,32 мкг/мл) и АКА (0,2±0,03 у.е.), по сравнению с P.stuartii и P.rettgeri. Уровень АЛА у культур P.stuartii составил 2,21±0,17 мкг/мл, АКА - 0,1±0,02 у.е. У изолятов P.rettgeri уровень АЛА достигал 2,42±0,25 мкг/мл, АКА - 0,13±0,01 у.е.

5. В большинстве случаев выделенные культуры микроорганизмов характеризовались высокой степенью полирезистентности к широко применяемым антибактериальным препаратам. Возбудители кишечной инфекции телят, а именно Proteus spp., E.coli, Enterococcus spp., C.freundii, K.pneumoniae, Enterobacter spp., Providencia spp., P.aeruginosa резистентны к макролидам, тетрациклинам и линкозамидам, в частности к азитромицину, эритромицину, доксициклину, тетрациклину и линкомицину.

6. Молекулярно-генетические исследования энтеромикробиома телят позволили установить, что основными доминантными были 4 типа, а именно: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria и Bacteroidetes. Применение препарата Декстраналь-40 положительно повлияло на энтеромикробиоценоз и сопровождалось снижением потенциально патогенных Escherichia и Shigella и повышением обилия Blautia sp. и Lachnospiraceae.

7. Установлено, что комплексное применение препаратов Декстраналь-40, Ветом 1 и Bacillus spp. F как клинически здоровым телятам, так и с диарейным симптомокомплексом, способствовало оптимизации энтеромикробиома, повышению активности миелопероксидазы, уровня лизосомальных катионных белков, снижению спонтанной активности НСТ, что свидетельствует о повышенной функциональной активности лейкоцитов и снижении антигенной нагрузки на организм животных.

8. Комплексное применение препаратов Декстраналь-40 и Ветом 1 способствовало увеличению у телят опытной группы живой массы на 14,32%, среднесуточного прироста на 10,98% по сравнению с животными контрольной группы.

3.2. Практические предложения и рекомендации

На основании проведенных исследований разработаны методические рекомендации «Профилактика и терапия заболеваний желудочно-кишечного тракта у молодняка крупного рогатого скота».

20

Материалы диссертации имеют научно-практическое значение и используются в бактериологическом отделе БУ «Омская областная ветеринарная лаборатория», в учебном процессе и НИР в высших учебных заведениях.

3.3. Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие исследования по теме диссертации должны быть направлены на научно¬теоретическое и экспериментальное обоснование выбора пре- и пробиотиков, применяемых для оптимизации иммунологических показателей и микробиоценоза кишечника новорожденных телят и других животных при желудочно-кишечных инфекциях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Конищева\*, А. С. Микробиом кишечника телят при дисбактериозе / А. С. Конищева, В. И. Плешакова, Н. А. Лещева // Вестник Омского государственного аграрного университета. - 2021. - №3(43). - С. 70-76.

2. Конищева\*, А. С. Применение современных лабораторных методов для выявления возбудителей диарейного симптомокомплекса у сельскохозяйственных животных / А. С. Конищева, В. И. Плешакова // Современные тенденции развития ветеринарной науки и практики: материалы Национальной (Всероссийской) научно-практической конференции / Омск : 2021. - С. 230-233.

3. Конищева\*, А. С. Микробиологический спектр возбудителей при желудочно¬кишечной патологии у животных / А. С. Конищева, Н. А. Лещева, В. И. Плешакова // Вестник КрасГАУ. - 2022. - №2. - С. 106-112.

4. Локтева, А. С. Применение бактерий Bacillus spp. F для лечения дисбактериоза у телят / А. С. Локтева, В. И. Плешакова // Инновации и продовольственная безопасность. - 2022. - № 1(35). - С. 82-89.

5. Локтева, А. С. Биологические свойства условно-патогенной микрофлоры кишечника, выделенной от новорожденных телят с признаками диареи / А. С. Локтева // Актуальные научно-технические средства и сельскохозяйственные проблемы: материалы Национальной научно-практической конференции с международным участием приуроченной к 20-летнему юбилею академии / Кемерово : 2022. - С. 189-194.

6. Локтева, А. С. Биологические свойства бактерий семейства Morganellaceae, выделенных от телят с диарейным симптомокомплексом / А. С. Локтева, В. И. Плешакова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2023. - №3(221). - С. 66-72.

21

7. Локтева, А. С. Влияние пре- и пробиотических препаратов на иммунобиохимические показатели телят с диарейным симптомокомплексом / А. С. Локтева // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии : Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической

конференции с международным участием / Гл. редактор Е. И. Антонова. - Чебоксары: ООО «Издательский дом «Среда» / Ульяновск : 2023. - С. 190-194.

8. Локтева, А. С. Мониторинг антибиотикорезистентности энтеробактерий, выделенных от продуктивных животных Омской области / А. С. Локтева, В. И. Плешакова, Т. И. Лоренгель // Прикаспийский международный молодежный научный форум агропромтехнологий и продовольственной безопасности 2023 : материалы / под ред. А. С. Дулиной, С. Х. Байкеевой, В. В. Зайцева / Астрахань : 2023. - С. 69-72.

Примечание: \* - смена фамилии в связи со вступлением в брак

22

ДЛЯ ЗАМЕТОК