

На правах рукописи

ОР 18.00.03 2000

СОТНИКОВ Роман Пагтелевич

**НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА
БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ
НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ И ОПТИМИЗАЦИЯ
МИКРОБИОЦЕНОЗА ПРОФИЛАКТОРИЕВ
МОЛОЧНЫХ ФЕРМ**

**16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология и иммунология**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Москва – 1999

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ВНИИВСГЭ).

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук
Л.С. Каврук

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук
В.М. Юрков (ВНИИВСГЭ);
кандидат биологических наук
Н.А. Соколова (МГУПБ)

Ведущее научное учреждение – Государственный научный центр
прикладной микробиологии.

Защита диссертации состоится «2» сентября 2000 г. в 11³⁰ час
на заседании диссертационного совета Д 020.50.01 при Всероссийском
научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии по адресу: 123022, Москва, ул. Звенигородское шоссе, 5
ВНИИВСГЭ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского
научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии.

Автореферат разослан «27» декабря 1999 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.С. Майстренко

П 841.926,0

П 871.9,0

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Массовые желудочно-кишечные заболевания новорожденных телят, сопровождающиеся высокой летальностью, продолжают оставаться проблемной болезнью молодняка для многих животноводческих хозяйств страны, особенно на крупных молочных фермах, нанося им значительный экономический ущерб (Н.А.Цареградская, 1976; О.А.Полякова, 1976; Ю.Е.Полоцкий, В.М.Бондаренко, 1986; С.В.Гриненко, 1987; Л.Я.Ставцева, Г.Н.Грязнева, 1991; В.Е.Белюсов и др., 1994; Л.С.Каврук, 1994; А.Н.Куриленко, 1996; М.А.Сидоров, 1996; Э.А.Шегидевич и др., 1998).

В большинстве случаев данные заболевания имеют инфекционную природу, обусловлены разнообразными агентами и протекают в форме смешанной инфекции. Среди бактериальных агентов, вызывающих инфекционную диарею телят, особое место занимают представители условно-патогенной микрофлоры (энтеробактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia* и др.), многие из которых постоянно или часто присутствуют в помещениях репродукторных отделений молочных ферм, попадая в них с экскрементами клинически здоровых коров-бактерионосителей, грызунов, с контаминированными кормами и другими путями. Однако основным источником контаминации этих помещений указанными микроорганизмами являются больные и переболевшие диареей телята, выделяющие их с фекалиями в окружающую среду в огромных количествах. Накопление патогенных энтеробактерий в помещениях профилактория приводит к заражению здоровых родившихся телят через разные предметы и возникновению энзоотической вспышки диареи (Э.А.Светоч, 1972; Н.Ф.Бруснигина и др., 1988; Г.Г.Вартанян, 1991; Л.С.Каврук, 1994; Е.С.Воропни и др., 1994; М.А.Сидоров, В.В.Субботин, 1999;

D.S.Joon, Y.K.Kaura, 1993; S.P.McDonough, et al., 1994), чему способствуют различные факторы, снижающие иммунофизиологическую резистентность организма новорожденного молодняка.

Существующие средства специфической профилактики бактериальных кишечных инфекций молодняка направлены против ограниченного числа возбудителей болезни (эшерихиоза, сальмонеллеза, анаэробной энтеротоксемии), тогда как данные заболевания могут вызывать еще и другие виды условно-патогенных и патогенных бактерий, циркулирующие на молочных фермах, в отношении которых иммунные препараты отсутствуют. Указанное обстоятельство во многом способствовало широкому внедрению в ветеринарную практику последнего десятилетия многих новых экологически безопасных и безвредных для животных препаратов, содержащих разные виды микробов антагонистов – пробиотиков. В нашей стране нашли применение такие препараты как Бифидобактерин, Бифацидобактерин, Лактобактерин, Споробактерин, Пропиацид, Лактицид, Стрептобицид, Субалин, Ветом-1.1, Ромакол и др. с целью профилактики и лечения диарейных заболеваний телят (В.А.Антипов, Т.И.Ермакова, 1990; Е.П.Наймытенко и др., 1990; В.В.Смирнов, С.Р.Резник и др., 1993; Е.С.Воронин и др., 1994; А.Н.Панин, Н.И.Серых, 1992, 1996; Шегидевич и др., 1998).

Недостатком почти всех названных препаратов является сравнительно узкий спектр их действия в отношении разных родов и видов патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* – возбудителей кишечных заболеваний молодняка, а также необходимость многократного, ежедневного или через сутки применения в течение 10-15 и более дней, что по техническим и экономическим соображениям не может устраивать практических ветеринаров.

Ввиду этого большую актуальность приобретает вопрос изыскания пробиотического препарата широкого антибактериального спектра с пролонгированным действием, способного при минимальном числе аппликаций эффективно профилактировать инфекционную диарею бактериальной этиологии и тем самым влиять на формирование благоприятного микробиоценоза помещений и условий выращивания новорожденных телят.

Цель и задачи исследований. Цель работы сводилась к разработке и обоснованию режима применения пробиотического препарата широкого антибактериального спектра с пролонгированным действием, обладающего способностью профилактировать бактериальные кишечные инфекции новорожденных телят и оптимизировать микробиоценоз помещений профилакториев молочных ферм. Для осуществления намеченной цели перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительную оценку активности и спектра действия штаммов-антагонистов, входящих и не входящих в некоторые коммерческие ветеринарные пробиотические препараты.

2. Изыскать штаммы микробов-антагонистов, действующих на разные роды и виды патогенных энтеробактерий, определить их антимикробный спектр, провести клонирование и селекцию перспективных штаммов-антагонистов, определить их безвредность для лабораторных животных и новорожденных телят.

3. Установить сроки персистенции изысканных штаммов микробов-антагонистов в кишечнике новорожденных телят при скормлении разных доз пробионтов.

4. Разработать пробиотический препарат широкого антибактериального спектра и пролонгированного действия в отношении разных

видов патогенных энтеробактерий – возбудителей кишечных инфекций новорожденных телят.

5. Определить видовой состав и биологические свойства энтеробактерий в кишечнике телят и циркулирующих в помещениях профилактория до и после применения разработанного пробиотика.

6. Определить профилактическую эффективность разработанного комбинированного пробиотика на фермах, неблагополучных по массовым диарейным заболеваниям телят бактериальной этиологии, и разработать оптимальный режим его применения.

7. Разработать методические рекомендации по неспецифической профилактике бактериальных кишечных инфекций новорожденных телят на основе оптимизации микробиоценоза желудочно-кишечного тракта и помещений профилактория молочных ферм.

Научная новизна. Получены данные, характеризующие антагонистическую активность и антибактериальный спектр действия некоторых штаммов микробов, входящих и не входящих в коммерческие бациллярные пробиотические препараты.

Разработан новый комбинированный пробиотический препарат Колифирм, содержащий два штамма пробионтов: *E. coli* М-17р74 и *Bacillus firmus* «СК» для профилактики бактериальных кишечных инфекций новорожденных телят, обладающий широким антибактериальным спектром в отношении разных родов и видов патогенных энтеробактерий и пролонгированным действием.

На основании экспериментальных данных по определению сроков персистенции и концентрации в кишечнике телят популяций маркированных штаммов-пробионтов *E. coli* М-17р74 и *Bac. firmus* «СК» предложен режим применения Колифирма, обеспечивающий высокую

профилактическую эффективность препарата.

Разработан новый способ определения микробного антагонизма, зарегистрированный как рационализаторское предложение.

Практическое значение работы. Для профилактики инфекционной диареи новорожденных телят и оптимизации микробиоценоза помещений профилакториев молочных ферм разработан и рекомендован пробиотический препарат широкого антибактериального спектра с пролонгированным действием в отношении разных родов и видов патогенных энтеробактерий – “Колифирм”. На основе положительных результатов производственного испытания указанного препарата разработаны методические рекомендации по его применению, которые одобрены и утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН (1999 г.)

Апробация работы. Основные результаты исследований доложены на ветеринарной секции Всероссийской конференции с международным участием “Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека” (1999 г.), Международной конференции, посвященной 80-летию МГАВМиБ им. К.И.Скрябина (1999 г.), Международной научной конференции “Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии” (ВНИИВСГЭ, 1999 г.) и на межлабораторном совещании сотрудников ВНИИВСГЭ (1999 г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Данные, характеризующие антагонистическую активность и спектр действия штаммов микробов-пробионтов, входящих и не входящих в бациллярные коммерческие препараты.
2. Материалы по экспериментальному обоснованию нового пробиотического препарата для неспецифической профилактики

кишечных инфекций новорожденных телят и оптимизации микробиоценоза профилакториев молочных ферм.

3. Результаты производственного испытания нового пробиотического препарата "Колифирм".

Внедрение результатов исследований. Мероприятия по профилактике инфекционной диареи новорожденных телят и оптимизации микробиоценоза в профилакториях молочных ферм внедрены в двух хозяйствах Московской области.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 научные статьи и рационализаторское предложение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 135 стр. машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования с обсуждением полученных результатов, выводами и предложениями для практики; список литературы, содержащий 165 отечественных и 61 иностранный источник, приложение.

Работа иллюстрирована 16 таблицами и 11 рисунками.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИСЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работу выполняли в период 1997-1999 гг. в лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСГЭ, а также на базе двух хозяйств Московской области: АОЗТ племзавода «Заря Подмосковья» Домодедовского района и колхоза им. Владимира Ильича Ленинского района.

Выделение и идентификацию культур энтеробактерий из проб фекалий телят и соскобов с полов помещений профилакториев молочных ферм осуществляли в соответствии с "Методическими указаниями по бактериологической диагностике колибактериоза (зшерихноза)

животных” (1991), а также “Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями” (1991).

Определение культур эшерихий с адгезивными антигенами K88, K99, 987P, A20, F41 проводили в соответствии с “Методическими указаниями по ускоренной индикации морганелл, сальмонелл и энтеро-патогенных эшерихий с адгезивными антигенами в объектах внешней среды, кормах и патологическом материале при помощи реакции коагулятинизации”, утвержденными ГУВ Госагропрома СССР 18 января 1989 г. Антигенные свойства выделенных культур *Morganella morganii* определяли согласно “Наставлению по применению набора сывороток нативных морганеллезных агглютинирующих серогрупповых”, утвержденному Департаментом ветеринарии МСХиП РФ 26 апреля 1997 г.

Для сравнительной оценки активности и спектра антимикробного действия пробионтов на различные виды энтеробактерий использовали паспортизированные штаммы микробов-антагонистов: *Bac.subtilis* КМ МГУ-20, *Bac.brevis* КМ МГУ-3, *Bac.polymyxa* №34, а также штаммы бацилл, входящие в коммерческие пробиотические препараты – Ветом-1.1, Бактисубтил и Споробактерин.

При изучении антагонистической активности штаммов-пробионтов в качестве тестов использовали 90 штаммов разных видов энтеробактерий 8 родов: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*. Определение активности и антибактериального спектра микробов-антагонистов проводили по методикам Е.И.Басюк и соавт. (1994), И.Б.Павловой и соавт. (1994), а также по разработанному нами способу определения микробного антагонизма бактерий рода *Bacillus* (Рац. предложение №137 от 21 сентября 1998 г, принятое к внедрению ВНИИВСГЭ).

Выделение микробов-антагонистов рода *Bacillus* проводили из проб фекалий клинически здоровых телят первых дней жизни и почвы путем прогревания их суспензий в водяной бане при 80° С в течение 20 мин с последующим высевом на пластинчатый МПА для получения отдельных колоний, у которых изучали антагонистические свойства.

Идентификацию выделенного штамма-пробионта *Bacillus firmus* «СК» осуществляли по методике J.M. Partu, P.C.B. Turnbull and J.R. Gibson (1991) на основе изучения его морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств.

Безвредность штамма *Bac.firmus* «СК» устанавливали в биопробе на белых мышах и клинически здоровых новорожденных телятах. Доза микробов, вводимая мышам внутривентрально, составляла 1,5 млрд. м.к. Телятам суспензию бацилл вводили *per os* с первой выпойкой молозива в дозе 70 млрд м.к.

Определение сроков персистенции в кишечнике новорожденных телят штамма-антагониста *E.coli* M-17p74 и выделенного нами нового штамма *Bac.firmus* «СК» проводили на клинически здоровых телятах. Наличие и концентрацию клеток штамма-антагониста *E.coli* M-17p74 в кишечнике телят после дачи препарата устанавливали по маркеру антигенной структуры штамма O2:K1 с помощью гомологичной кроличьей агглютинирующей сыворотки в реакции агглютинации на стекле, исследуя по 10-12 колоний эшерихий, полученных на агаре Эндо и Плоскирева после посева каждой пробы фекалий телят. Определение сроков персистенции *Bac.firmus* «СК» в кишечнике телят проводили со штаммом этих бацилл, маркированным путем генно-инженерного вживления плазмиды, определяющей устойчивость штамма к рифампицину. Для выделения маркированного штамма *Bac.firmus* «СК» Rif-100 из проб фекалий телят использовали МПА, содержащий

рифампицин в концентрации 50 и 100 мкг/см³. До начала опытов исследовали пробы фекалий телят и соскобов с пола помещений профилактория с целью определения возможности циркулирования на ферме полевых штаммов с аналогичными маркерами. В опытах с разными штаммами антагонистов пробы фекалий телят брали ежедневно в течение 7–8 сут.

Производственные испытания разработанного нами комбинированного пробиотического препарата Колифирм проводили в периоды массовых заболеваний новорожденных телят инфекционной диареей. Во всех производственных опытах учитывали эпизоотическую обстановку на ферме в последние два года, уровень заболеваемости телят диареей и их сохранность, условия содержания и режим кормления новорожденных телят и рационы глубокопастельных коров, технологию получения и выращивания новорожденных животных, клиническое состояние телят, а также ветеринарно-санитарные, зоогигиенические и противозпизоотические мероприятия, проводимые в родильном отделении и профилактории.

До начала и после применения Колифирма определяли видовой состав и биологические свойства микрофлоры, циркулирующей в репродукторных отделениях ферм.

В разных опытах нами было использовано 256 новорожденных телят, бактериологическому исследованию подвергнута 151 проба фекалий телят и соскобов с полов, изучены морфологические, тинкторнальные и культурально-биохимические свойства 73 культур бактерий, антигенные свойства 668 культур, антагонистическая активность 117 культур разных видов и клонов микробов.

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Оценка активности и антибактериального спектра некоторых штаммов микробов-антагонистов, входящих и не входящих в коммерческие препараты

При изыскании перспективного пробиотика была проведена сравнительная оценка активности и спектра антимикробного действия 3-х штаммов-антагонистов, входящих в коммерческие препараты: *Bac.subtilis* ВКПМ В-7095 (Ветом-1.1), *Bac.subtilis*-534 (Споробактерин), *Bac.subtilis* IP-5832 (Бактисубтил) и 3-х паспортизированных штаммов бацилл, не используемых для изготовления таких препаратов: *Bac.subtilis* КМ МГУ-20, *Bac.brevis* КМ МГУ-3 и *Bac.polutуха*-34 в отношении 86 тест-штаммов патогенных энтеробактерий 8 родов, наиболее часто вызывающих инфекционную диарею телят: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Providencia*, *Proteus*, *Salmonella*.

Полученные результаты исследований представлены в таблице 1, откуда следует, что из числа изученных штаммов-антагонистов *Bac.subtilis* КМ МГУ-20 обладал наиболее широким спектром действия, ингибируя рост преобладающего большинства тест-культур энтеробактерий, за исключением провиденций и одного штамма иерсиний. *Bac.polutуха*-34 был высокоактивен в отношении всех использованных штаммов эшерихий, цитробактерий, клебсиелл, сальмонелл и иерсиний и не действовал на штаммы протей, морганелл и провиденций. *Bac.brevis* КМ МГУ-3 ингибировал рост клебсиелл и цитробактерий, половину использованных штаммов протей и провиденций, отдельные штаммы морганелл и иерсиний и не действовал на эшерихий и сальмонелл.

Из числа испытанных штаммов-пробионтов, входящих в коммерческие пробиотики, наибольшую активность проявлял штамм препарата Ветом-1.1, имевший наиболее широкий спектр действия в

отношении всех родов энтеробактерий, за исключением сальмонелл, однако он ингибировал лишь небольшую часть тест-культур протей, морганелл и провиденций. Штаммы пробионтов, входящие в препараты Споробактерин и Бактисубтил, не ингибировали рост всех или большинства тест-культур использованных родов энтеробактерий.

Таким образом, из изученных нами бацилл-антагонистов наиболее широкий спектр действия и высокую активность имел штамм *Vac. subtilis* КМ МГУ-20. Штамм *Vac. polytura-34* и пробионт препарата Ветом-1.1, обладая сравнительно высокой активностью, имели более узкий спектр действия.

Таблица 1
Антагонистическая активность штаммов-антагонистов
рода *Vacillus* в отношении различных родов энтеробактерий

Роды энтеро- бактерий	Штаммы-антагонисты					
	<i>Vac. brevis</i> КМ МГУ-3	<i>Vac. subtilis</i> КМ МГУ-20	<i>Vac.</i> <i>polytura-34</i>	<i>Vac. subtilis</i> - ВКПМ В-7095 (Ветом-1.1)	<i>Vac. subtilis</i> -534 (Споробактерин)	<i>Vac. subtilis</i> IP-5832 (Бактисубтил)
<i>Proteus</i>	6/3	14/14	24/1	8/3	8/0	8/1
<i>Morganella</i>	4/1	13/13	23/0	12/4	12/0	12/1
<i>Providencia</i>	4/2	6/1	6/0	6/2	6/0	6/0
<i>Escherichia</i>	2/0	3/3	7/7	2/2	2/0	2/0
<i>Citrobacter</i>	2/2	2/2	3/3	1/1	1/1	1/0
<i>Klebsiella</i>	2/2	3/3	4/4	2/2	2/1	2/1
<i>Salmonella</i>	3/0	3/3	5/5	3/0	3/0	3/0
<i>Yersinia</i>	4/1	4/3	4/4	4/4	4/2	4/2

Обозначения: числитель – общее количество использованных тест-штаммов; знаменатель – количество тест-штаммов, на которые микроб-антагонист оказывал действие.

В ходе работы нами был усовершенствован способ определения микробного антагонизма, принятый к внедрению ВНИИВСГЭ как рационализаторское предложение, который является наиболее нагляд-

ным, малотрудоемким и позволяет количественно оценивать степень антагонизма того или другого испытуемого микроба по величине радиуса зоны ингибирования тест-культуры.

2.2.2. Определение сроков колонизации штамма E.coli M-17p74 в кишечнике новорожденных телят в зависимости от применяемой дозы бактерий

По данным Э.А.Шегидевича и др. (1996,1998), Л.С.Каврука и др. (1997), в последние годы в ветеринарной практике нашел широкое применение пробиотик Ромакол, содержащий генно-инженерный штамм E.coli M-17p74 и продуцирующий микроцины группы С, которые ингибируют рост патогенных энтеробактерий родов Escherichia, Citrobacter, Salmonella, Yersinia и некоторых штаммов Klebsiella, но не действуют на энтеробактерии родов Proteus, Morganella, Providencia, также являющихся возбудителями кишечных инфекций животных. В исследованиях Л.С.Каврука, А.Б.Конonenко, С.В.Бритовой (1997) было установлено, что названный штамм после однократного скармливания новорожденным пороссятам в профилактической дозе может персистировать в их кишечнике при высокой концентрации до 7-8 сут.

Исходя из свойств этого штамма, он был выбран нами в качестве основы для создания нового пробиотического препарата пролонгированного действия. Ввиду того, что экспериментальные данные о времени его персистирования в кишечнике телят отсутствовали, нами были проведены опыты на 19 клинически здоровых телятах по определению сроков персистирования E.coli M-17p74 в их кишечнике при разных дозах скармливания этих бактерий. Предварительно до начала опытов исследовали пробы фекалий телят и соскобов с полов профилактория на наличие или отсутствие в репродукторном отделении фермы шлерихий, имеющих идентичную со штаммом-пробионтом антиген-

ную структуру. Эти исследования показали, что в репродуктивном отделении фермы циркулировали полевые штаммы *E.coli* с идентичным антигенным строением, но уровень их в общей популяции эшерихий был весьма незначительным и они встречались лишь в единичных пробах, что не могло влиять на результаты изучения поставленного вопроса.

В опытах по изучению сроков персистенции штамма-пробионта *E.coli* M-17p74 в кишечнике новорожденных телят установлено, что при скармливании им с первой выпойкой молозива суспензии бактерий в дозе 50 млрд м.к. высокая концентрация клеток пробионта в фекалиях сохранялась в течение 4 сут (до 50% колоний эшерихий в первичных культурах на агаре Эндо и Плоскирева после засева фекалий давали положительную реакцию с гомологичной агглютинирующей сывороткой 02:K1). На 5-6 сут число клеток штамма-пробионта в пробах фекалий опытных телят значительно уменьшалось или они полностью отсутствовали. При скармливании дозы 70 млрд м.к. высокая концентрация клеток штамма-пробионта в фекалиях телят сохранялась в течение 5, а у некоторых животных до 6 сут. Однако такая большая доза пробионта в экономическом отношении не могла быть оправданной, ввиду чего в последующей работе мы ее не использовали.

На основании полученных данных был предложен режим применения коммерческого пробиотика Ромакол для профилактики инфекционной диареи новорожденных телят, который вошел в действующее наставление по его применению. Этот режим предусматривает применение препарата двукратно в дозах по 40-50 млрд м.к. (в зависимости от массы теленка) на 1 прием в первые часы жизни животного с первой выпойкой молозива и на 4-е сутки с молоком или кипяченой водой.

2.2.3. Изыскание микробов-антагонистов рода *Bacillus*, расширяющих спектр антимикробного действия штамма *E. coli* M-17p74

Учитывая многообразие видов патогенных энтеробактерий, вызывающих инфекционную диарею телят, одной из основных наших задач являлось изыскание штамма-антагониста, способного расширить спектр антагонистического действия штамма *E. coli* M-17p74 и прежде всего найти такой антагонист, который мог бы эффективно действовать на энтеробактерии родов *Proteus* и *Morganella*. Наиболее перспективным среди предварительно изученных нами штаммов бацилл являлся *Bac. subtilis* KM МГУ-20, однако он ингибировал рост бактерий рода *Escherichia*, в том числе пробионта *E. coli* M-17p74. Кроме того, срок его персистенции в кишечнике новорожденных телят в опыте с маркированным штаммом не превышал двух сут. По этим причинам в дальнейшем мы отказались от использования данного штамма.

При изыскании нового штамма-антагониста было выделено из фекалий телят и почвы 15 штаммов бацилл, из числа которых только один, обозначенный нами «СК», отвечал предъявляемым требованиям. Данный штамм ингибировал рост всех или преобладающего большинства тест-культур энтеробактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, часть культур *Yersinia* (таблица 2). В частности, в опытах с использованием 87 различных тест-штаммов энтеробактерий 8 родов он задерживал рост всех 25 тест-штаммов протей (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*), всех 6 штаммов провиденций (*P. rettgeri*), 17 (72%) из числа 24 штаммов морганелл (*M. morganii*) и 3 из числа 5 штаммов персиний (*Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*); в отношении тест-штаммов остальных родов (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*) не обладал активностью.

Радиус зон задержки роста разных видов тест-бактерий составлял от 5-7 до 18-21 мм, а средний радиус зоны ингибирования роста был равен для протей 11,8мм, морганелл – 12мм, провиденций – 14,3мм, персиний – 11,3мм.

Таблица 2
Антагонистическая активность и спектр действия штамма *Bacillus* «СК»

Роды тест-бактерий	Количество тест-штаммов рода		Средний радиус зоны ингибирования, мм
	общее	в т.ч. угнетаемых антагонистом «СК»	
<i>Escherichia</i>	10	0	–
<i>Citrobacter</i>	4	0	–
<i>Salmonella</i>	9	0	–
<i>Klebsiella</i>	4	0	–
<i>Yersinia</i>	5	3	11,3
<i>Proteus</i>	25	25	11,8
<i>Morganella</i>	24	17	12
<i>Providencia</i>	6	6	14,3
итого	87		

Штамм *Bacillus* «СК» и пробионт *E.coli* M-17p74 не оказывали антагонистического действия друг на друга в перекрестных опытах и могли быть совместимы в применении.

2.2.4. Видовая идентификация выделенного штамма *Bacillus firmus* «СК» и его биологические свойства

В результате видовой идентификации штамма «СК» установлено, что он относится к виду *Bacillus firmus*.

Бациллы имеют вид крупных толстых палочек с закругленными концами длиной 10-12 мкм и шириной 1,5-2 мкм, грамположительные, образуют крупные споры овальной формы (субтерминально), капсулу не образуют, неподвижные, располагаются одиночно и короткими цепочками; не растут в анаэробных условиях, образуют каталазу, не

образуют лецитиназу, не утилизируют цитрат на агаре Симмонса, не образуют ацетилметилкарбинол, индол и уреазу, восстанавливают нитраты в нитриты, растут на МПА с 7% NaCl, гидролизуют крахмал, казеин и разжижают мясоептонную желатину; ферментируют глюкозу и маннит с образованием кислоты и не ферментируют ксилозу и арабинозу; не обладают гемолитической активностью.

Штамм неприхотлив к условиям культивирования и хорошо растет на обычных питательных средах в аэробных условиях при температуре 35-37°C и pH 7,0-7,2. В МПБ отмечается слабое помутнение среды с образованием на дне пробирки хлопьевидного осадка, который при встряхивании разбивается в гомогенную взвесь. На МПА видимый рост бактерий наблюдается уже спустя 20-24 ч в виде слабовыпуклых колоний с матовой поверхностью среднего и крупного размера округлой формы с мелко зазубренными краями, серовато-кремового цвета. При более продолжительном сроке культивирования (свыше 2 сут) колонии увеличиваются в размере и приобретают концентрическую структуру.

Штамм *Bac. firmus* не обладает патогенностью для белых мышей и телят. Суспензия бактерий в физиологическом растворе в дозе 1,5 млрд. м.к., введенная 10 мышам внутрибрюшинно, не вызвала изменения их клинического состояния в течение 7 сут наблюдения. После введения 10 клинически здоровым новорожденным телятам *per os* с первой выпойкой молозива суспензии бактерий в дозе 70 млрд м.к. клиническое состояние животных не имело отклонений от нормы в течение 4 сут наблюдения за животными.

2.2.5. Клонирование и селекция штамма *Bacillus firmus* «СК»

Для повышения антимикробной активности штамма *Bacillus firmus* «СК» нами было проведено 5 серий (этапов) опытов по его клонированию и селекции наиболее активных клонов. Опыты проводили с одними и теми же тест-штаммами энтеробактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (по 3 штамма каждого рода). Наиболее активные клоны (культуры) отбирали для последующего этапа опытов. При этом отбор клонов проводили по средним значениям величины зон угнетения роста всех тест-штаммов протей, морганелл и провиденций вокруг колоний антагониста.

Следует отметить, что клетки популяций штамма *Bacillus firmus* «СК» обладали гетерогенностью по показателю активности, т.е. образованию антибактериальных веществ, что особенно заметно проявлялось на третьем этапе клонирования, когда разница в размерах зон ингибирования одного и того же тест-штамма составляла от 1 до 10 мм у разных клонов, а наиболее часто – 4-5 мм. На последних трех этапах клонирования были получены клоны антагониста, обладающие значительной активностью. Радиус зоны задержки роста отдельными клонами бацилл тест-штаммов протей достигал 21-23 мм, морганелл – 19-21 мм, провиденций – 17-18 мм. Наиболее активный клон *Bac.firmus* «СК» от третьего этапа клонирования имел среднюю величину радиуса зоны ингибирования для штаммов протей 18 мм, морганелл – 15,7 мм, провиденций – 13,7 мм.

2.2.6. Определение сроков персистирования штамма *Bac. firmus* «СК» в кишечнике новорожденных телят

До начала опытов с использованием маркированного штамма антагониста было установлено отсутствие циркулирования в профилактиктории и кишечнике телят штаммов микробов, устойчивых к действию рифампицина в концентрации 50 и 100 мкг/см³ питательной среды.

В опытах на 11 клинически здоровых новорожденных телятах с маркированным штаммом *Bacillus* «СК» Rif-100 установлено, что после однократного скармливания им суспензии этих бактерий в дозе 50 млрд. м.к. штамм-антагонист способен персистировать в кишечнике новорожденных телят в течение 3 сут. При этом из преобладающего числа проб фекалий опытных телят искомые бактерии выделялись в высокой концентрации. У отдельных животных высокая концентрация клеток микроба-антагониста в фекалиях отмечалась и на четвертые сутки после скармливания суспензии бактерий.

Полученные в этих опытах данные послужили основой для разработки режима применения комбинированного препарата Колифирм.

2.2.7. Создание комбинированного пробиотического препарата с пролонгированным действием для профилактики бактериальных кишечных инфекций новорожденных телят

На основании установленных свойств штаммов-антагонистов *E.coli* M-17p74 и *Bac.firmus* «СК», в частности, спектров их антагонистического действия, отсутствия взаимного антагонизма, безвредности для животных, сроков персистирования в кишечнике новорожденных телят мы сочли целесообразным совместить их для создания эффективного пробиотического препарата широкого антибактериального спектра с пролонгированным действием и рекомендовать следующий режим его применения для профилактики инфекционной диареи новорожденных телят: двукратное скармливание смеси суспензий обоих штаммов в дозах по 50 млрд м.к. каждого антагониста с первой выпойкой молозива и на 4 сут жизни с молоком или кипяченой водой.

Исходя из видовых наименований штаммов-пробионтов разработанный нами комбинированный препарат был назван «Колифирм».

2.2.8. Результаты производственного испытания разработанного пробиотического препарата "Колифирм"

Определение эффективности действия Колифирма проводили в АОЗТ ПЗ "Заря Подмосковья" Домодедовского района Московской обл. (отделение Ярлыково) во время энзоотической вспышки инфекционной диареи, возникавшей у телят в первые 3 дня их жизни. Комиссионное производственное испытание препарата осуществляли в соответствии с методикой, утвержденной дирекцией ВНИИВСТЭ, на МТФ колхоза им. Владимира Ильича Ленинского района Московской области, являющимся стационарно неблагополучным по массовым диарейным заболеваниям новорожденных телят.

До начала и после окончания испытания препарата проводили бактериологические исследования проб фекалий больных, клинически здоровых обработанных препаратом новорожденных телят, а также соскобов с полов профилактория для определения видового состава и биологических свойств циркулирующей микрофлоры.

Лабораторные партии препарата готовили каждые 8-10 дней в лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСТЭ. Всего в хозяйствах опытные группы телят, получавшие Колифирм, составили 120 голов. Контрольные группы телят, которым пробиотик не давали, насчитывали 80 голов. Препарат скармливали по 50 млрд м.к. каждого микроба-пробионта в первые сутки жизни с молозивом и на 4-е сут с молоком или кипяченой водой в тех же дозах.

В таблице 3 представлены данные о профилактической эффективности Колифирма, из которых видно, что в первом хозяйстве соотношение заболевших диареей телят опытной и контрольной групп составило 38 к 86,5%, т.е. заболеваемость диареей снижалась в 2,3 раза. В

другом хозяйстве указанное соотношение составило 12,3 к 64,3% т.е. заболеваемость сокращалась в 5,2 раза.

Таблица 3

Профилактическая эффективность препарата Колифирм при двукратном скармливанні телятам

Показатели	ПЗ "ЗаряПодмосковья" Домодедовского р-на М. о.		Колхоз им. Владимира Ильича Ленинского р-на М. о.	
	опытные	контроль	опытные	контроль
Количество телят в группах	50	52	70	28
Число телят, заболевших диареей	19 (38%)	45 (86,5%)	9 (12,3%)	18 (64,3%)
Число телят, погибших от диареи	—	6 (11,5%)	2 (2,8%)	3 (10,7%)

Следует отметить, что у телят, получавших пробиотик, которые болели диареей, болезнь протекала в легкой форме, непродолжительное время (1-2 сут) и заканчивалась выздоровлением обычно после применения одних диетических средств. Случаев падежа телят опытных групп от диареи в первые 10-12 дней жизни в ПЗ "Заря Подмосковья" не наблюдалось, а в другом хозяйстве погибло лишь 2 теленка-гипотрофика (2,8%), тогда как в контрольных группах гибель телят составляла соответственно 11,5 и 10,7%.

2.2.9. Микробиоценоз кишечника новорожденных телят и окружающей среды до и после применения пробиотика

При исследовании 24 проб фекалий больных диареей телят до 10-дневного возраста и соскобов с полов помещений профилакториев, а также трупного материала на видовой состав и биологические свойства микрофлоры до применения Колифирма из 8 проб (33,3%) выделяли энтеропатогенные эшерихии с адгезивными антигенами K88, K99 и F41, реже 987P. Бактерии протей (виды *P.vulgaris* и *P.mirabilis*)

содержались в высокой концентрации в 14 пробах (63,5%). В 4 пробах (18%) были обнаружены штаммы родов *Enterobacter*, *Morganella* (серогруппы O16), в единичных пробах – *Providencia* и *Hafnia*. Таким образом, в период эпизоотического неблагополучия в обследованных хозяйствах доминирующими представителями микробиоценоза кишечника новорожденных телят и окружающей среды являлись патогенные штаммы энтеробактерий родов *Escherichia* и *Proteus*.

После применения Колифирма и существенного улучшения эпизоотической обстановки в репродукторных отделениях ферм отмечалось значительное снижение уровня циркулирующих в них патогенных штаммов энтеробактерий. Так, из числа 20 исследованных проб фекалий телят и соскобов с полов профилакториев бактерий рода *Proteus* содержались в 3 пробах (15%), т.е. частота их обнаружения снижалась в 4,2 раза. Энтеропатогенные эшерихии с адгезивными антигенами не были выявлены ни в одной пробе.

Таким образом, применение Колифирма создавало благоприятный микробиоценоз в кишечнике телят с преобладанием в нем непатогенных штаммов энтеробактерий, которые, попадая с фекалиями в окружающую среду, способствовали оптимизации микробиоценоза помещений профилактория и снижению возможности заражения новорожденных телят возбудителями болезни.

ВЫВОДЫ

1. При сравнительной оценке антагонистической активности и спектра действия 3-х штаммов-антагонистов рода *Bacillus*, входящих в коммерческие препараты Споробактерин, Ветом-1.1, Бактисубтил, и 3-х штаммов-антагонистов данного рода, не используемых для изготовления коммерческих препаратов, установлено, что более активными из

них и действующими на энтеробактерии 4-5 родов семейства *Enterobacteriaceae* являлись штаммы *Bac.polymyxa*-34 и *Bac.subtilis* ВКПМ В-7095, входящий в препарат Ветом-1.1. Штамм *Bac.subtilis* КМ МГУ-20 обладал наиболее широким антимикробным спектром, ингибируя рост тест-бактерий 7 родов указанного семейства, однако имел непродолжительный срок персистирования в кишечнике телят (до 2 сут); штаммы препаратов Споробактерин и Бактисубтил обладали наименьшей активностью и узким спектром действия, не вызывая ингибирования роста большинства тест-штаммов энтеробактерий разных родов.

2. Сроки персистирования штамма *E.coli* М-17р74 в кишечнике новорожденных телят составляли:

- при однократном скармливании дозы 50 млрд. м.к. – 4 суток;
- при однократном скармливании дозы 70 млрд. м.к. – 5-6 сут.

На основании этих данных нами предложен режим применения препарата Ромакол для профилактики инфекционной диареи новорожденных телят, включающий его двукратное скармливание в дозах по 40-50 млрд. м.к. на 1 прием в первые часы жизни с первой выпойкой молозива и на 4 сут жизни с молоком или кипяченой водой.

3. Выделенный новый штамм *Bac.firmus* «СК» обладает выраженным антагонистическим действием в отношении энтеробактерий родов *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* и некоторых штаммов *Yersinia*, но не действует на энтеробактерии родов *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella* и *Escherichia*, в т.ч. на штамм-пробионт *E.coli* М-17р74, ввиду чего оба штамма-пробионта могут применяться совместно.

Штамм *Bac.firmus* «СК» не обладает патогенностью для белых мышей при внутрибрюшинном заражении в дозе 1,5 млрд м.к. и новорожденных телят при скармливании дозы 70 млрд. м.к.

4. В результате клонирования и селекции штамма *Bac.firmus* «СК» получены наиболее активные его клоны в отношении тест-штаммов протей, морганелл и провиденций; эти клоны использованы для создания комбинированного пробиотического препарата Колифирм.

5. Установлен срок персистирувания штамма *Bac.firmus* «СК» в кишечнике новорожденных телят, который составляет 3-4 сут при скармливании бактерий в дозе 50 млрд. м.к., на основании чего предложен оптимальный режим применения штамма телятам в составе комбинированного пробиотика Колифирм.

6. Исходя из свойств штаммов-пробионтов – *E.coli* M-17p74 и *Bac.firmus* «СК» создан новый комбинированный пробиотический препарат широкого антибактериального спектра с пролонгированным действием – Колифирм, который предназначен для профилактики бактериальных кишечных инфекций новорожденных телят и способен ингибировать *in vitro* рост патогенных энтеробактерий родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, часть штаммов *Klebsiella*.

7. В результате производственного испытания препарата Колифирм установлено, что он способен профилактировать инфекционную диарею бактериальной этиологии у новорожденных телят. В частности, в разных хозяйствах заболеваемость телят снижалась в 2,3–5,2 раза, а у большинства заболевших животных болезнь протекала в легкой форме и заканчивалась выздоровлением обычно после диетотерапии. Препарат снижал падеж опытных телят от диареи в среднем в 3,8 раза.

8. Препарат способен благоприятно влиять на формирование безопасного микробиоценоза помещений профилакториев молочных ферм, существенно снижая уровень циркулирующих в окружающей среде патогенных штаммов разных видов энтеробактерий.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

На основании проведенных исследований разработаны:

1. Новый комбинированный пробиотический препарат Колифирм для профилактики бактериальных кишечных инфекций новорожденных телят и предложен режим его применения, позволяющий значительно снижать их заболеваемость инфекционной диареей и предотвращать падеж от данного заболевания.

2. Методические рекомендации по неспецифической профилактике инфекционной диареи новорожденных телят на основе оптимизации микробиоценоза желудочно-кишечного тракта молодняка и репродукторных отделений молочных ферм.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сотников Р.П. Влияние разных доз пробиотика Ромакол на концентрацию и продолжительность колонизации клеток штамма-антагониста в кишечнике новорожденных телят // Тез. Всерос. конф. с междунар. участием "Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека". – М., 1999. – С.73-74.

2. Каврук Л.С., Сотников Р.П., Экспериментальное обоснование к созданию пробиотика с пролонгированным действием // Тез. докл. конф., посвящ. 80-летию МГАВМИБ им. К.И. Скрябина "Актуальные проблемы ветеринарной науки". – М., 1999. – Т.2 – С.54-55.

3. Сотников Р.П. Результаты испытаний нового комбинированного пробиотика широкого антибактериального спектра с пролонгированным действием // Тез. докл. междунар. науч. конф. 16-17 сентября 1999 г. "Проблемы ветеринарной санитарии и экологии (дезинфекция, дезинсекция, дератизация)": Тр. ВНИВСГЭ. – М., 1999. – С.164-165.

4. Сотников Р.П. Сравнительная оценка антибактериальной активности некоторых штаммов-антагонистов рода *Bacillus* // Проблемы ветеринарной санитарии и экологии: Тр. ВНИВСГЭ. – М., 1999. – Т.107 – С.18-22.

5. Сотников Р.П. Способ определения микробного антагонизма // Рационализаторское предложение №137 от 21 сентября 1998 г, принятое к внедрению ВНИВСГЭ.