

УТВЕРЖДАЮ  
Директор РУП «Институт экспериментальной  
ветеринарии им. С.И. Вышеслеского»

А.А.Гусев

2011 г.

Республика Беларусь, г. Минск

ОТЧЕТ

по заданию: «Определить действие биоцидного средства для дезинфекции Любисан-Эко на микрофлору, выделяемую при копытной гнили у коров, выяснить профилактическое действие препарата в условиях беспривязного содержания дойного стада»

Срок выполнения апрель-июль 2011 г.

Исполнители:

заведующий отделом зоонозов и разработки диагностических препаратов	А.П. Лысенко
профессор, доктор ветеринарных наук	
заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук	А.П. Лемиш
научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук	И.Н.Архипов

## Введение

Заболевание копытной гнилью у коров распространено во всех частях мира, в том числе встречается в Республике Беларусь. Больные коровы могут терять в живой массе до 50-100 кг, снижать удой в два и более раза, выбраковка животных достигает 40%.

Заболевание чаще протекает хронически с гнойно-некротическими поражениями кожи и тканей в дистальных частях конечностей, а в отдельных случаях – в ротовой полости, на половых органах, вымени, в печени, легких, мышцах.

Причиной заболевания считают *Fusobacterium necrophorum*. Это анаэробная грамотрицательная, неподвижная, не образующую спор и капсул полиморфная палочка, которая в почве и навозе сохраняется до 60, в воде и моче до 15 дней.

Источник инфекции - больные и переболевшие животные, а также здоровые особи, в рубце и кишечнике, которых может находиться возбудитель. Бактерии выделяются с фекалиями и с некротизированной тканью. Заражение происходит через кожу и слизистые оболочки при нарушении их целостности.

Возникновению заболевания способствуют содержание животных на сырых, неровных полах, загрязненных навозом или пастьба на переувлажненных пастбищах.

Не исключено, что в этиологии заболевания играют роль несбалансированное кормление, а также *Bacteroides ovatus*, *Clostridium perfringens*, *Bacterium humilis*, *Streptococcus fecalis* и некоторые другие виды микроорганизмов.

Считается, что в основе борьбы с заболеванием должна быть положена санация поверхностей (полов) животноводческих помещений, борьба с сыростью и постоянная профилактическая обработка копыт. Вместе с тем, до сих пор не подобрано оптимальных средств, способных одновременно санировать поверхности и конечности животных. В этой связи, использование сухих, сыпучих дезинфектантов с адсорбирующими свойствами типа «Любисан Эко» представляет интерес для профилактики копытной гнили у крупного рогатого скота.

**Цель работы:** выяснить действие Любисана Эко» на микроорганизмы, играющие роль в возникновении копытной гнили, определить эффективность препарата в условиях промышленного молочного скотоводства.

### Задачи исследований

1. Выяснить действие Любисана Эко на эталонные штаммы микроорганизмов, играющих роль в возникновении копытной гнили у коров.

2. Получить изоляты из объектов внешней среды и поражений копыт у коров в условиях хозяйства Минского района, определить их чувствительность к «Любисану Эко». Изучить возможность использования Любисана Эко для профилактики заболеваний копыт.

### Материал и методы исследований

В работе использованы: термостат с автоматическим регулированием температуры, холодильник; шкаф сушильный с регулированием температуры от 100 до 200<sup>0</sup>С; аппарат для встряхивания Vortex; центрифуга с частотой вращения 14000 об/мин; автоклав с рабочим давлением 1,5 кПа; ступки с пестиками вместимостью 50 и 100 см<sup>3</sup>; пипетки 1, 2, 5, 10 см<sup>3</sup>; пробирки типа Эппендорф; пробирки бактериологические; пластиковые стерильные чашки Петри; петли бактериологические; хлористый натрий 0,85%-ный раствор, рН 7,0; хлоргексидина биглюконат 0,05%; вода дистиллированная; спирт этиловый 70% и 96%; калия гидроокись, 1%-ный раствор; натрия гидроокись; масло иммерсионное для микроскопа.

Работа с анаэробной микрофлорой проведена анаэробных условиях с использованием анаэроустатов.

**Штаммы.** Для выполнения исследований использовали штаммы:

- *Clostridium. perfringes A (E 43)*,
- *Fusobacterium necroforum (E 46)*,
- *Fusobacterium necroforum (E 47, ATCC 25286)*
- *Bacteroides ovatus (E 48)*
- *Bacillus subtilis*

- *Bacillus licheniformis*
- *Bacillus pumilis*
- *Streptococcus faecalis*
- *Streptococcus suis* mun 2

Для выполнения 1 задачи приготовили тест-объекты из фрагментов кирпича (1x2 см), которые предварительно стерилизовали при 121<sup>0</sup>С, 30 мин.

На тест объекты наносили по 0,5 мл 0,5 млрд. суспензии культур. Тест-объекты помещали в стерильные чашки Петри с перегородками и наносили на них Любисан Эко (10 мг на 1 см<sup>2</sup>). На контрольные тест-объекты наносили стерильный тальк (10 мг на 1 см<sup>2</sup>). Тест-объекты увлажняли стерильной дистиллированной водой. Исследования провели на 1 и 2 сутки экспозиции.

Для определения бактерицидного действия тест-объекты помещали в отмывающую жидкость, которую фильтровали через стерильную фильтровальную бумагу. Фильтрат центрифугировали при 5 мин 13000 об/мин. Осадок суспендировали на вортексе в 5 мл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия и высевали в одинаковых объемах на МПА, МПБ и среду Кит-Тароци. Об эффективности действия Любисана Эко судили по различию интенсивности роста в опыте и в контроле.

Для решения 2 задачи исследования были проведены в экспериментальном хозяйстве (ф. Атолино РУСП «Восход» Минского района) на 642 коровах (помещение 1 -316 коров, помещение 2 -326 коров).

Работу проводили согласно нормативных документов:

- Методические указания по контролю санитарно-бактериологического состояния объектов ветеринарно-санитарного надзора. Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/121);

- Методические указания по отбору патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования. Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 16.01.2008 (№ 10-1-5/36);

- Методические указания по проведению обязательного минимума исследований в ветеринарных лабораториях при диагностике болезней животных. Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 16.01.2008 (№ 10-1-5/34).

Перед началом опыта у пяти коров с явными поражениями копыт провели ортопедическую обработку конечностей. Из мест поражений в стерильные пробирки отобрали фрагменты пораженного рога с примесью гноя и крови для бактериологического исследования путем посева на обычные и дифференциально-диагностические питательные среды. Для выделения анаэробных микроорганизмов использованы анаэроостаты. Идентификацию изолятов провели с использованием стандартных биохимических наборов ВИТЕК 2.

Кроме того, для бактериологического исследования были отобраны пробы сенажа (3), земли с выгонов (4), подстилки (4), пробы навоза со стоков (4).

Для оценки профилактической эффективности Любисана-Эко в 1 коровнике (316 коров) на проходе в доильный зал была сделана ножная ванна, в которую ежедневно в течение 20 суток засыпался слой Любисана-Эко, по ко-

тому проходили на дойку все животные. Контролем служил коровник №2 (326 коров), в котором коровы проходили на дойку через ванну с раствором 10% медного купороса. До начала опыта, в процессе и после его завершения учитывали количество коров с поражениями копыт и нуждавшиеся в обработке, а также оценивали степень поражения конечностей.

Кроме того, Любисан Эко использовался в качестве присыпки в процессе обработки и лечения копыт (непосредственно), а также в виде мази в смеси с вазелином (1:1).

Всего для проведения опытов использовано 150 кг Любисана Эко.

### Результаты исследований

Установлено, что Любисан Эко при экспозиции 1 сутки (табл.1) оказал бактерицидное действие на возбудитель некробактериоза и сопутствующую микрофлору, полностью подавляя все взятые в опыт микроорганизмы, за исключением *Streptococcus faecalis*, популяция которого гибла на 34,9% в первые сутки экспозиции, на 97,9% на вторые сутки и на 100% -на третьи сутки экспозиции.

Таблица 1- Эффективность действия Любисана Эко на возбудитель некробактериоза и сопутствующую микрофлору.

Микроорганизмы	1 сутки		2 сутки	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
<i>Fusobacterium necroforum</i> (E 46)	Роста нет	Сплошной рост на 1/3 чашки	Роста нет	Сплошной рост на 1/3 чашки
<i>Fusobacterium necroforum</i> (E 47, ATCC 25286)	Роста нет	Сплошной рост по всей чашке	Роста нет	Сплошной рост по всей чашке
<i>Streptococcus faecalis</i>	183 КОЕ	281 КОЕ	5КОЕ	236КОЕ
<i>Streptococcus suis</i> mun 2	Роста нет	Сплошной рост на 1/3 чашки	Роста нет	Сплошной рост на 1/3 чашки
<i>Bacillus pumilis</i>	Роста нет	40КОЕ	Роста нет	37КОЕ
<i>Bacillus licheniformis</i>	Роста нет	50КОЕ	Роста нет	37КОЕ
<i>Bacillus subtilis</i>	Роста нет	90 КОЕ	Роста нет	83КОЕ
<i>Bacteroides ovatus</i> (E 48)	Роста нет	Сплошной рост по всей чашке	Роста нет	Сплошной рост по всей чашке
<i>Clostridium perfringes</i> A (E 43),	Роста нет	Сплошной рост по всей чашке	Роста нет	Сплошной рост по всей чашке

При исследовании объектов внешней среды (табл. 2) были выделены микроорганизмы родов *Bacillum*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, являющиеся осложняющей микрофлорой при копытной гнили.

Таблица 2 – Культуры, выделенные из объектов внешней среды ф. Атолино

Пробы	Аэробные микроорганизмы	Анаэробные микроорганизмы
Сенаж	<i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Bacillum sp.</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>
Земля с выгона	<i>Bacillum sp.</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i> <i>Bacteroides ovatus</i>
Фекалии со стока	<i>Bacillum sp.</i>	нет
Подстилка	<i>Staphylococcus gallinarium</i> , <i>Bacillum sp.</i>	нет

При исследовании мест поражений копытного рога были выделены аэробные и анаэробные сапрофитные и условно патогенные микроорганизмы (табл.3).

Таблица 3 – Культуры, выделенные из пораженно копытного рога до применения Любисана Эко

Проба от коровы инв. №	Аэробные микроорганизмы	Анаэробные микроорганизмы
10828	<i>Streptococcus faecalis</i> . <i>Proteus sp.</i>	нет
28045	<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Proteus sp.</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>
89191	<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Proteus sp.</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i> <i>Bacteroides ovatus</i>
47990	<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>E.coli</i>	<i>Cupriavidus pauculus</i>
10828	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Alcaligenes faecalis ssp faecalis</i> <i>Cupriavidus pauculus</i>

Все выделенные микроорганизмы полностью погибали на тест-объектах, обработанных Любисаном Эко (10мг\см<sup>2</sup>) в течение 2 суток контакта.

Для оценки профилактической эффективности Любисана-Эко коровы 1 опытного коровника (316 голов) в течение 30 суток ежедневно 2 раза проходили через ванну с Любисаном-Эко. Контролем служил коровник №2 (326

коров), в котором коровы проходили через ванну с 10% раствором медного купороса.

До начала опыта в марте 2011 г. в обоих коровниках патология копыт отмечалась у 110 коров 1 коровника (34,8%) и у 143 коров 2 коровника (43,8%). За время применения препарата в апреле-мае 2011 г. число коров, нуждавшихся в лечении копыт в 1 опытном коровнике, составило – 127 голов, а в контрольном коровнике №2, где использовался 10% раствор медного купороса – 178 голов, что на 40,2% больше.

Необходимо отметить, что прекращение применения Любисана Эко и перевод опытного коровника на ванны с 10% раствором медного купороса привели к выравниванию показателя лечебных обработок. К началу июля 2011 г. в опытном и контрольном коровнике было обработано по 66 животных. Это указывает на необходимость постоянного применения препарата и периодической обработки секций.

При выборочной обработке копыт у 10 коров опытного коровника после 30 дневного применения Любисана Эко установлено, что состояние копытного рога у 7 из 10 коров (70%) удовлетворительное, без явных дефектов и полостей, ограниченные воспалительные явления локализуются, преимущественно, в области венчика. У 3 коров отмечены незначительные дефекты подошвенного рога, воспалительные явления ниже рудиментарных пальцев, но с развитием грануляционной ткани.

Улучшение клинического состояния животных после применения Любисана Эко, коррелировало с результатами бактериологического исследования проб и пораженных участков копыт (табл.4). Так, если до применения препарата у больных животных выделяли *Streptococcus faecalis* и анаэробные микроорганизмы (*Bacteroides ovatus*, *Clostridium clostridioforme*, *Cupriavidus pauculus*, *Alcaligenes faecalis ssp faecalis*, *Cupriavidus pauculus*), то после применения Любисана Эко ни в одном случае не было выделено анаэробных микроорганизмов.

Таблица 4 – Культуры, выделенные из пораженно копытного рога после применения Любисана Эко

Проба от коровы инв. №	Аэробные микроорганизмы	Анаэробные микроорганизмы
47990 (повторное исследование)	<i>E.coli</i>	нет
10828	<i>Streptococcus sp.</i>	нет
28075	<i>Protei</i>	нет
01279	<i>Protei</i>	нет
16168	<i>Protei</i>	нет

У 6 коров из 10 контрольного коровника состояние копытного рога неудовлетворительное, с наличием полостей, заполненных гнойным содержи-

мым со специфическим запахом и поражением межкопытной щели и венчика.

При осмотре 5 коров, подвергшихся расчистке копыт и лечению поражений путем нанесения смеси препарата с вазелиновым маслом и наложением повязки через 7 суток после обработки установлено улучшение состояния копытного рога, отсутствие гнойно-некротических поражений.

### Заключение

Любисан Эко при 24 ч контакте оказывает бактерицидное действие на возбудитель некробактериоза (*Fusobacterium necroforum* E 46, *Fusobacterium necroforum* E 47, ATCC 25286), а микрофлору, встречающуюся при поражениях копыт (*Bacteroides ovatus* (E 48), *Clostridium. perfringes* A (E 43), *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, *Streptococcus suis*), выделенную из внешней среды коровника и поражений копыт у коров, инактивирует *Streptococcus faecalis* на 97,9% на вторые сутки и на 100% -на третьи сутки контакта.

Любисан Эко в дозе 100 г на м<sup>2</sup> (10 мг на 1 см<sup>2</sup>) можно применять для инактивации микрофлоры, вызывающей поражения копытного рога при санации поверхностей животноводческих помещений с интервалом 6-7 суток.

Профилактическое применение Любисана Эко путем 2-кратного ежедневного прогона коров через ванну, заполненную препаратом, в течение 20 суток на 40,2% уменьшило число животных, нуждавшихся в лечении копыт, в сравнении с профилактическим применением для ножных ванн 10% раствора медного купороса.

Профилактическое применение Любисана Эко путем 2-кратного ежедневного прогона коров через ванну, заполненную препаратом, в течение 20 суток существенно облегчило течение болезни у пораженных коров, улучшило состояние копытного рога в сравнении с профилактическим применением для ножных ванн 10% раствора медного купороса и привело к исчезновению анаэробных микроорганизмов в пораженных участках копытного рога.

Для профилактики поражений копыт целесообразно постоянное применение препарата.

Любисан Эко можно использовать для лечебных обработок копыт после расчистки путем посыпания пораженных участков и в смеси с вазелином или другой мазевой основой.

Заведующий отделом зоонозов и разработки диагностических препаратов  
профессор, доктор ветеринарных наук

 А.П. Лысенко

Заведующий лабораторией,  
кандидат ветеринарных наук

 А.П. Лемеш

Научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук

 И.Н. Архипов