

АДРЕСНЫЙ ФАРМАБИОТИК ПРИ КЛОСТРИДИОЗАХ



ЕЛЕНА ЙЫЛДЫРЫМ, ГЕОРГИЙ ЛАПТЕВ, НАТАЛЬЯ НОВИКОВА, ДАРЬЯ ТЮРИНА,
ЛАРИСА ИЛЬИНА, ВАЛЕНТИНА ФИЛИППОВА, ЕЛЕНА ДУБРОВИНА,
КСЕНИЯ СОКОЛОВА, ЕКАТЕРИНА ПОНОМАРЕВА, ТАТЬЯНА СМЕТАННИКОВА,
ВАСИЛИЙ ЗАИКИН, компания «БИОТРОФ»
МАРАТ ФАХРИЕВ, ООО «КМК»
РОМАН НЕКРАСОВ, МИХАИЛ ЛОЗОВАНУ, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Клостридии — это спорообразующие бактерии, которые в изобилии содержатся в почве, легко попадая оттуда в траншеи при закладке сilosа. Вместе с кормами они проникают в организм скота, проявляя высокую устойчивость к антибиотикам. На фоне интенсивного животноводства (традиционно принятого высококонцентратного кормления скота, гиподинамии, дисбиозов микробиома рубца и кишечника) происходит размножение клостридий в пищеварительной системе. Они образуют целый спектр мощных токсинов, которые воздействуют на эпителий кишечника, повышая проницаемость сосудов, и, достигнув системы кровообращения, попадают в мозг, почки, легкие, печень, сердце, матку, вызывая дегенерацию клеток.

КОРЕНЬ ПРОБЛЕМЫ

Источником заселения пищеварительной системы токсичнообразующими клостридиями в большинстве случаев становится silos, заложенный с нарушениями технологии. Об этом свидетельствуют результаты обширного мониторинга, который мы провели в 2023 г. с охватом 17 животноводческих хозяйств Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Во многих пробах было выявлено присутствие генов α -токсина (*craA1*) и ε -токсина (*etx*), которые синтезируются видом *Clostridium perfringens*, бинарного токсина (*cdtB*), токсинов A (*tcdA*) и B (*tcdB*), производимых видом *C. difficile*, а также шигатоксинов A и B (*stx1A*, *stx2B*), интимина (*eae*), энтерогемолизина (*ehxA*), которые продуцируют энтеробактерии. Результаты исследования показали, что в целом по Ленинградской области и г. Санкт-Петербургу (Пушкинский район) абсолютно «чистыми» были лишь 23% образцов silosa от общего количества всех исследованных проб. Около 32% кормов оказались очень загрязнены токсинами: они содержали от 3 до 5 наименований генетических детерминант (генов) эндотоксинов.

ЧЕРЕДА ПОСЛЕДСТВИЙ

Коллектив ученых под руководством Е.А. Корочкиной, профессора кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины, провел исследование по изучению эффективности применения гормональных схем синхронизации при проявлении клинических признаков кишечной формы клостридиоза у коров в одном из хозяйств Ленинградской области (Корочкина, Никитин, 2021). Согласно полученным данным отравление коров токсинами клостридий негативно сказалось на воспроизводительной способности животных — снижались показатели оплодотворяемости и увеличивалось количество яловых коров. Помимо недополучения телят и сбоя полового цикла, это привело к дополнительным расходам на гормональные препараты и трудозатратам зооветеринарных специалистов.

В 2024 г. в рамках гранта Российского научного фонда впервые в мире мы провели полногеномное (метагеномное) WGS- секвенирование образцов эндометриальной микробиоты коров в ранний новотельный период. Для подготовки проб к его проведению на платформе Illumina (MiSeq) был использован набор Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina).

Результаты полногеномного секвенирования показали, что наиболее яркие отличия в микробиоме эндометрия, возникающие под влиянием эндометрита, были выявлены в численности *Clostridium botulinum* (рис. 1). Между клинически здоровыми животными и животными с эндометритом эти различия составляли 88,4%. Результаты оказались неожиданными, поскольку до настоящего времени *C. botulinum* ассоциировался в основном с кишечными заболеваниями и поражениями нервной системы. Вероятно, это связано с ограниченными возможностями традиционных диагностических мероприятий. Наши данные впервые указали на то, что *C. botulinum* играет биологическую роль в патогенезе заболеваний матки. Инфекции матки часто приводят к лечению антибиотиками, которые потенциально могут вызывать увеличение численности спорообразующих клостридий.

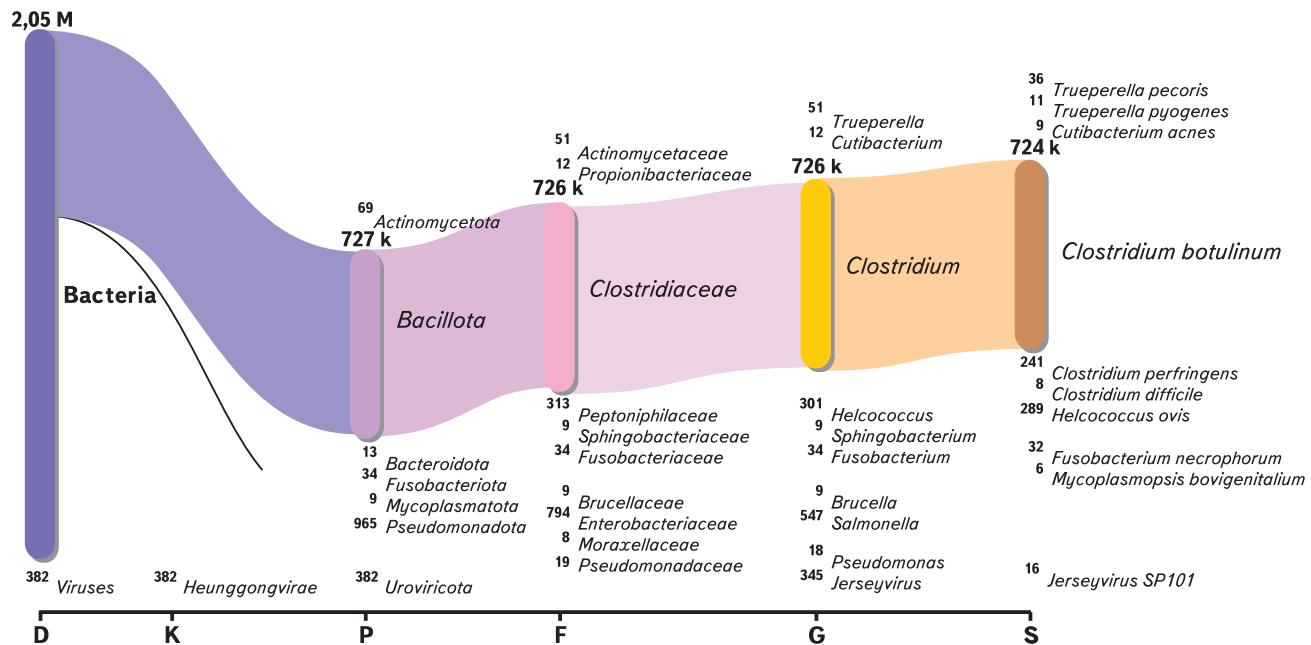


Рис. 1. Микробный состав эндометриального микробиома коров с клиническим эндометритом, определенный методом WGS-секвенирования

НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ПРОБИОТИКОВ

Фармабиотики — это новое поколение пробиотиков, которые представляют собой живые бактериальные штаммы и другие натуральные компоненты, обладающие фармакологической активностью и одновременно экологической безопасностью.

В НПК «БИОТРОФ» разрабатываются новейшие концепции поиска и создания перспективных фармабиотиков. Так, для разработки фармабиотика **АнтиКлос®**, действие которого адресно направлено на подавление высоковирулентных клостридий, применялся метод полногеномного секвенирования, включающий аннотирование (полное описание) генома используемого штамма бактерии. Это позволило доказать безопасность препарата, подтвержденную отсутствием генов, связанных с вирулентностью и патогенностью, а также присутствием генов, отвечающих за синтез биологически активных веществ (короткоцепочечных жирных кислот, бактериоцинов и др.).

Помимо штамма пробиотических бактерий, фармабиотик **АнтиКлос®** дополнительно обогащен полезными бактериальными метаболитами (среднецепочечными органическими кислотами). Благодаря синергетическому эффекту они результативно модулируют состав микробиома пищеварительной системы и проявляют высокую антимикробную активность в отношении патогенов, включая высоковирулентные клостридии.

Кроме того, фармабиотик оказывает комплексное воздействие на организм хозяина. Высокоактивные бактерии, содержащиеся в биопрепарate, синтезируют широкий спектр метаболитов, которые оказывают протекторное действие на основные мишени клостридий. Они защища-

ют клетки от повреждений, снижают уровень экспрессии (активности) генов апоптоза (гибели клеток) и воспаления. Бактерии в составе препарата обладают свойствами слизеобразования. Слизь служит дополнительной защитой эпителия кишечника от ферментов клостридий и способствует быстрому заживлению некротических поражений.

Жирные кислоты со средней цепью, входящие в состав фармабиотика **АнтиКлос®**, оказывают многофункциональное действие. Они обладают антимикробной активностью, а также могут окисляться в организме животных и птицы, являясь источником энергии, важной для клеток слизистой оболочки кишечника. Эти кислоты восстанавливают морфологию эпителия, нарушенную клостридиями, повышают усвоемость питательных и минеральных веществ, активируют работу ферментов. Все это способствует улучшению усвоемости кормов и росту продуктивности.

СЕКРЕТ ВЫСОКИХ НАДОЕВ

Ученые ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста изучили эффективность применения фармабиотика **АнтиКлос®** в условиях ООО «Авангард» Рязанской области. Биопрепарат скармливали коровам опытной группы в течение всего эксперимента, который продолжался три месяца. О характере лактационной деятельности коров судят по изменению лактационной кривой, то есть по удою молока. На протяжении эксперимента коровы опытной группы удерживали продуктивность на высоком уровне, в отличие от животных контроля. В конце исследования в опытной группе среднесуточный удой молока был выше на 3,1 л ($P < 0,05$), чем в контрольной группе (рис. 2). Также у коров опытной группы повысился валовой выход жира и белка ($P < 0,05$).

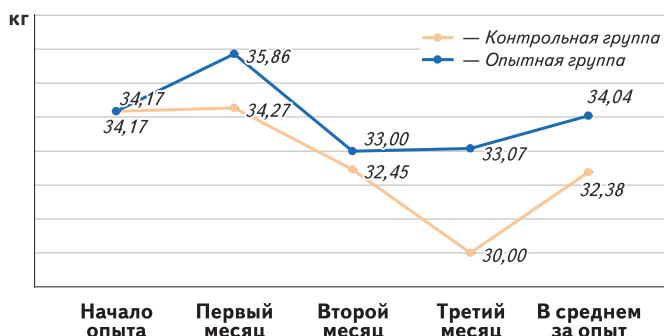


Рис. 2. Среднесуточный удой молока натуральной жирности

ПОВЫСИТЬ ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИН

У здоровых животных и птицы противостоять клостридиям должен иммунитет. Однако применяемые антибиотики не усиливают иммунный ответ, а ослабевают его, делая организм более уязвимым и неспособным к самозащите.

До начала эксперимента в ООО «Авангард» коров обеих групп вакцинировали препаратом против клостридиозов крупного рогатого скота. По заявлению производителя вакцина должна способствовать формированию (стимулированию) иммунного ответа у животных в отношении α -, β - и ϵ -анатоксинов *C. perfringens* типов A, B, C, D и других через 2–3 недели после повторного введения, при этом иммунитет должен сохраняться в течение 10–12 месяцев.

Следует отметить, что вакцины против клостридиозов не всегда справляются со своей задачей. В отдельных случаях их недостаточную результативность специалисты связывают с низким уровнем выработки у животных специфических антител в ответ на введение антигена.

В конце эксперимента с помощью теста BIO K 317/2 (Monoscreen AbELISA *C. perfringens* beta toxin, Bio-X Diagnostics, Belgique) был проведен мониторинг серологического ответа животных после иммунизации вакциной и естественного контакта с *C. perfringens*. Использование фармабиотика в кормлении коров способствовало формированию у них лучшего серологического ответа после иммунизации вакциной. В контрольной группе уровень се-

рологического ответа через три месяца несколько снизился. Если в начале опыта положительный серологический ответ был у 50% животных (степени положительности X, XX, XXX, XXXX), то в конце — только у 41,6% от числа обследованных животных (рис. 3). При этом уровень серологического ответа в опытной группе в конце эксперимента повысился на 15,7%.

Положительное влияние фармабиотика АнтиКлос® на эффективность вакцинации объясняется тем, что около 70% иммунных клеток организма находятся в пищеварительной системе, а симбиотическая микробиота активно регулирует их деятельность, в том числе через экспрессию (работу) генов хозяина. Нарушение микробиома, которое наблюдается в интенсивных условиях животноводства может снижать результативность вакцинаций. Дисбактериоз кишечника способствует возникновению системного воспаления, развитию иммуносупрессии и менее выраженному иммунному ответу на введение вакцин. Благодаря оздоровлению микробиома и проявлению иммуномодулирующей активности биопрепарата оказал позитивный эффект на постvakцинальный иммунитет.

РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ ВОСПРОИЗВОДСТВА

Важный критерий состояния воспроизводства стада — индекс осеменения, под которым понимают число осеменений, затрачиваемых на достижение стельности. Сервис-период также относится к наиболее значимым показателям эффективности воспроизводства.

На одном из племенных заводов Ленинградской области фармабиотик АнтиКлос® вводили в рацион коров голштинской породы на протяжении транзитного периода. В результате его применения у коров экспериментальной группы, по сравнению с аналогами контрольной группы, сервис-период снизился на 7,9 суток, индекс осеменения — с 2,2 (в контроле) до 1,9, а случаи выявления у животных кист яичников сократились на 50% (рис. 4). Усиление местной резистентности эндометрия, нормализация взаимосвязанных между собой кишечного и эндометриального микробиома обусловили снижение риска развития воспалительных процессов,

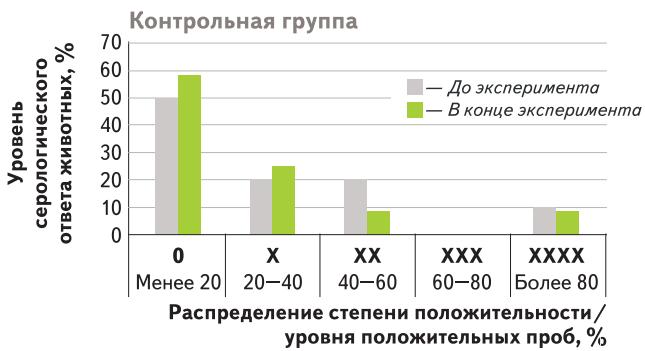


Рис. 3. Распределение уровней положительных проб на β -токсин *C. perfringens* по уровню встречаемости

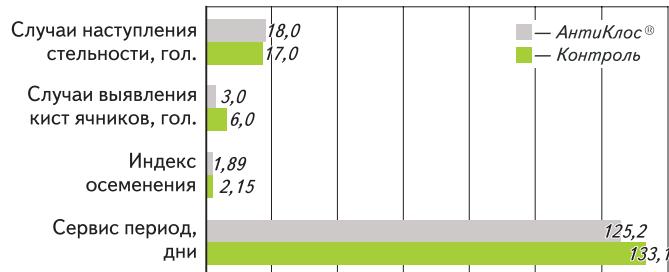


Рис. 4. Влияние фармабиотика АнтиКлос® на показатели эффективности воспроизведения коров

что, соответственно, привело к улучшению показателей воспроизведения у коров. Кроме того, АнтиКлос® оказал положительное влияние на обмен веществ, что позволило избежать энергетического дисбаланса.

ПРЕДОТВРАТИТЬ ПОРОКИ СЫРОВ

Если корова получала силос, загрязненный клостридиями, не удастся избежать таких проблем, как пороки при производстве некоторых видов твердых и полутвердых сыров. Споры клостридий, попавшие в организм животных, проникают в молоко. Во время длительного созревания сыров, например, сортов «Эмменталь», «Эдам» и «Гауда» споры прорастают и развивающиеся в них бактерии вызывают так называемое позднее вздутие, а также дефекты запаха и вкуса из-за образования газа.

Коллектив ученых ФГБОУ ВО Удмуртский ГАУ на базе КХ Пономарева Д.И. Завьяловского района Удмуртии провел научно-хозяйственный эксперимент по изучению эффективности использования фармабиотика АнтиКлос® на коровах-первотелках. Биопрепарат давали животным в течение всего периода лактации. С помощью классических методов микробиологии молоко оценивали на содержание спор мезофильных (растущих при умеренной температуре) анаэробных бактерий, к которым в первую очередь относятся клостридии. Анализ показал, что споры отсутствовали в молоке коров-первотелок в период раздоя и стабилизации лактации; в период спада лактации их количество сократилось в два раза по сравнению с контрольной группой, в молоке которых эти бактерии присутствовали в течение всего периода лактации.

Из молока коров опытной группы были изготовлены образцы сыра «Гауда» без использования лизоцима, который, являясь ферментом-консервантом, традиционно применяется в сыроподелке для предотвращения проблемы позднего вздутия сыра. Он уничтожает клостридии, разрушая их клеточные стенки. Подтверждением эф-



Рис. 5. Сыр «Гауда» из молока коров опытной группы (изготовлен без использования лизоцима)

фективности изучаемого фармабиотика стало полное соответствие качества полученного сыра требованиям стандартов. Сыр обладал ярко выраженным ароматом пропионовокислых бактерий и имел рисунок, характерный для «Швейцарского» сыра (рис. 5).

ВЫВОДЫ

На фоне интенсивного ведения животноводства поступление в организм животных патогенов и их токсинов главным образом с кормами часто приводит к вспышкам инфекционных заболеваний. Современные исследования показали, что отравление коров токсинами клостридий негативно отражается на их воспроизводительной способности.

Клостридии — это постоянные обитатели пищеварительной системы животных и птицы, поэтому внимание специалистов должно быть сосредоточено прежде всего на профилактике микробной экологии и защите эпителия пищеварительной системы. Фармабиотик АнтиКлос®, представляющий собой комбинацию пробиотических бактерий и среднечепочечных жирных кислот, обладает высокой антиклостридиальной активностью и многими другими полезными свойствами. АнтиКлос®, с одной стороны, подавляет патогенную микробиоту, в основном клостридий, с другой стороны, способствует увеличению продуктивности и улучшению репродуктивного здоровья путем регуляции общего физиологического состояния коров.

Важно, что АнтиКлос® усиливает постvakцинальный иммунный ответ. Его применение предотвращает проблему позднего вздутия сыра и обеспечивает получение продукта, который полностью отвечает требованиям стандартов, даже при отказе от лизоцима. ■