

обработке препаратом, данный показатель составлял 1600 – 2100 КОЕ/мл.

Ежедневная обработка вымени защитно-профилактическим средством на основе лантаноидов сокращало время выздоровление коров с субклиническим и серозным маститом.

Заключение. Проведенные лабораторные и полевые исследования показали, что средство на основе солей лантана и церия профилактирует заболевания молочной железы у коров, в том числе травматической и бактериальной этиологии. Его регулярное применение ускоряет заживление мелких травм и снижает обсемененность кожи вымени бактериями, способными вызывать мастит и гнойное воспаление.

Испытанный препарат хорошо впитывается в поверхностные слои эпидермиса, обладает выраженным регенерирующим свойством, стимулирует рост и развитие эпителиальных клеток, ускоряет заживление повреждений кожи, оказывает бактерицидный эффект на возбудителей гнойных инфекций кожи.

В отличие от антибиотиков препараты на основе лантаноидов не влияют на качество молока и молочной продукции, что позволяет их применять без особых ограничений в качестве гигиенического сред-

ства, способствующего профилактике и борьбе с маститом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карташова В.М., Ивашура А.И. Маститы коров. М.: Агропромиздат, 1988; 256 с.
2. Александров С.Н., Косова Т.И. Взаимосвязь санитарной обработки вымени при машинном доении с субклиническими маститами. Вісник Донецького Національного Університету, Сер. А: Природничі науки. 2009; 1:526, 527.
3. Батраков А.Я. Профилактика и лечение маститов у коров. Петербург: "Петролазер", 2001; 104 с.
4. Гончаров В.П., Карпов В.А., Якимчук И.Л. Профилактика и лечение маститов у животных. М.: Россельхозиздат, 1980; 35 – 44.
5. Верховая О.А., Сорока В.Р. Биологическая роль лантаноидов. Успехи современной биологии. 1980; 90.3(6):365 – 381.
6. Бондаренко В.З., Федоров А.И., Искадарова С.С. и др. Перспективы использования защитно-профилактического средства "Вилпран" в ветеринарной практике. Труды ВИЭВ. 2013; 77:308 – 311.
7. Барашков Г.К. Медицинская бионеорганика. М: Биом, 2011; 50 – 57.
8. Федоров А.И., Искадаров М.И., Искадарова С.С. и др. Лантаноиды: биологические свойства и применение. Ветеринария и кормление. 2014; 5:80 – 82.
9. Бондаренко В.З., Искадарова С.С., Федоров А.И. и др. Изучение безвредности и фармакологических свойств средства "Вилпран" на лабораторных и сельскохозяйственных животных. Труды ВИЭВ. 2013; 77:304 – 307.
10. Искадарова С.С., Бондаренко В.З., Федоров А.И. и др. Изучение защитно-профилактического крема "Вилпран" на лабораторных и сельскохозяйственных животных. Ветеринария и кормление. 2013; 4:43 – 45.

УДК 619:636.5:579.62:571.27

ВЛИЯНИЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ЗДОРОВЬЕ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ЦЫПЛЯТ КУР

Андрей Валерьевич Дубровин, аспирант, биотехнолог

Георгий Юрьевич Лаптев, д.б.н., директор

Лариса Александровна Ильина, к.б.н., начальник лаборатории

Валентина Анатольевна Филиппова, биотехнолог

Елена Александровна Ёылдырым, к.б.н., биотехнолог

ООО "БИОТРОФ+" (Санкт-Петербург)

Иван Иванович Кочиш, д.с.-х.н., профессор, академик РАН, проректор

ФГБОУ ВО "Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии

– МВА имени К.И. Скрябина" (Москва)

Оксана Борисовна Новикова, к.в.н., заведующая отделом

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства

– филиал ФНЦ ВНИТИП РАН (Санкт-Петербург, Ломоносов)

Компанией ООО "БИОТРОФ+" совместно с ВНИВИП проведен опыт по выращиванию цыплят с применением кормовой добавки Интебио® на основе смеси эфирных масел. Лабораторные исследования провели в молекулярно-генетической лаборатории "БИОТРОФ+". Их результаты выявили положительное влияние кормовой добавки на прирост массы тела бройлеров, микрофлору кишечника и иммунный статус. **Ключевые слова:** эфирные масла, цыплята бройлеры, микрофлора, экспрессия генов, T-RFLP, ПЦР в реальном времени.

Influence of feed supplement based on essential oils on chick health and performance

A.V. Dubrovin, G.Yu. Laptsev, L.A. Ilina, V.A. Filipпова, E.A. Yildirim, I.I. Kochish, O.B. Novikova

The company "Biotroph+" with the All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Poultry conducted an experiment on growing birds using the feed additive Intebio® based on the mixture of essential oils. Laboratory studies were conducted in the molecular-genetic laboratory "Biotroph+". Their results revealed a positive effect of the feed additive on weight gain, intestinal microflora and the immune status of chickens. **Key words:** essential oils, broiler chicks, microflora, gene expression, T-RFLP, real-time PCR.

Здоровье и продуктивность птицы во многом зависят от состояния пищеварительной системы, у которой одним из основных показателей нормального состояния является баланс компонентов ее микрофлоры. У птиц наиболее многочисленна и разнообразна микрофлора слепых отростков кишечника – количество бактерий в ней достигает 10^{11} КОЕ/г [3]. Доказано, что нормальная микрофлора кишечника стимулирует развитие тканей слепых отростков и лимфатических образований желудочно-кишечного тракта.

Для подавления патогенных микроорганизмов в птицеводстве применяют кормовые антибиотики, подкислители и другие химиопрепараты, но зачастую они негативно влияют на микрофлору [1, 2] и могут индуцировать у бактерий повышение антибиотикорезистентности.

Интебио® – кормовая добавка, основанная на смеси натуральных эфирных масел, обладающих антимикробной, антиоксидантной и противовоспалительной активностями. Ее применение в птицеводстве позволяет снизить или даже полностью исключить использование антибиотиков. Масла, входящие в состав кормовой добавки, препятствуют возникновению респираторных заболеваний, уменьшают падеж птицы.

Цель работы – изучить влияния кормовой добавки Интебио® на основе смеси эфирных масел на здоровье и продуктивность цыплят.

Материалы и методы. Экспериментальную часть работы провели в виварии ВНИВИП на 40 бройлерах кросса Росс-308. Сразу после рождения их разделили на 2 равные группы – контрольную и опытную по 20 голов в каждой. Цыплята опытной группы с пер-

вого дня жизни получали препарат Интебио®, который добавляли в комбикорм из расчета 80 – 120 г/т. За ними вели наблюдение в течение 42 дней, раз в неделю птицу взвешивали. В возрасте 19 дней половину цыплят каждой группы (итого 20 голов) экспериментально заразили эпизоотическим штаммом *Salmonella enteritidis* в дозе $5 \cdot 10^8$ КОЕ подкожно в область верхней трети шеи. Через сутки после инокуляции бактерии, а также по достижении птицей 42-суточного возраста провели отбор проб содержимого кишечника для анализа микрофлоры и тканей слепых отростков для экспрессии генов в них (из каждой группы по 3 головы). *Salmonella enteritidis* использовали в работе, исходя из информации Россельхознадзора о том, что сальмонеллез является одной из наиболее частых инфекционных болезней домашней птицы [5, 6].

Взятые образцы биологического материала тестировали в лаборатории молекулярно-генетических исследований компании ООО "БИОТРОФ+". Для оценки состава микрофлоры пользовались методом T-RFLP (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) [4]. Из содержимого слепых отростков выделяли пул ДНК микроорганизмов, проводили ДНК-амплификацию фрагмента гена 16s рНК с помощью эубактериальных праймеров 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на 5'-конце и 1492R (TACGGHTACCTTGT-TACGACTT), очищали флуоресцентно-меченые ампликоны гена 16S рНК с помощью 3 М раствора гуанидин-изотиоционата по стандартной методике, осуществляли рестрикцию ДНК рестриктазами *HaeIII*, *HhaI* и *MspI* с последующим анализом на секвенаторе CEQ 8000. По

Таблица 1
Праймеры для оценки экспрессии генов

Ген	Праймеры
Бета-дефензины	
AvBD10	F: GCTCTTCGCTGTTCTCCTCT R: CCCAGAGATGGTGAAGGTG
AvBD11	F: ACTGCATCCGTTCCAAAGTCTG R: GTCCCAGCTGTTCTTCCAG
AvBD9	F: AACACCGTCAGGCATCTTACACA R: CGTCTTCTTGCTGTAAGCTGGA
Цитокины	
IL6	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC R: TTGGGCAGGTTGAGGTTGTT
IL8L2	F: GGAAGAGAGGTTGTGCTTGGA R: TAACATGAGGCACCCGATGTG
Цистеиновая протеаза	
CASP6	F: CAGAGGAGACAAGTGCCAGA R: CCAGGAGCCGTTTACAGTTT
Простагландин-эндопероксид-синтаза-2 (циклооксигеназа 2)	
PTGS2	F: TAAGTGCATGTTACCCGGAC R: TTTGTAGCCATAGTTCAGCATTGT
Регуляторный фактор интерферона 7	
IRF7	F: GAGACTGGCTATTGGGGGAG R: GACCGAAATGCTTCCAGGG
Бета-актин	
Бета-актин	F: ATGTCCACCCGCAATGCTTC R: AAATAAGCCATGCCAATCTCGTC

результатам вычисления размеров пиков и их площади в программе Fragment Analysis выделяли подтипы (филотипы) с погрешностью в 1 нуклеотид и определяли их относительное содержание в микробиоте. Принадлежность бактерий к определенным таксономическим группам устанавливали с помощью программы Fragment Sorter.

Из ткани слепых отростков выделяли тотальную РНК, которую использовали в реакции обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК. Экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе, выявляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением праймеров, представленных в

таблице 1. Уровни относительной экспрессии генов рассчитывали методом 2- $\Delta\Delta C_t$ (delta delta Ct) [8, 11].

Результаты исследований и обсуждение. В начале эксперимента средняя масса тела цыплят обеих групп составляла 38 г. Она возросла через сутки после заражения у цыплят, получавших кормовую добавку Интебио®, до 743±54 г, а у контрольных только до 650±104 г. К концу опыта этот показатель в опытной и контрольной группах был равен 2403±403 и 2294±184 г соответственно (табл. 2). Тем не менее различия по массе тела птиц опытной и контрольной групп были статистически недостоверными.

Бактериальное сообщество слепых отростков бройлеров через сутки после заражения *S. enteritidis* включало представителей 5 филумов – Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Tenericutes, а также неидентифицированные микроорганизмы (рис. 1). Только у экспериментально зараженных контрольных и неинфицированных получавших кормовую добавку цыплят не выявили бактерий филума Tenericutes.

Заражение *S. enteritidis* привело к значительному снижению биоразнообразия микрофлоры кишечника цыплят контрольной группы: среднее количество выявленных филогенов бактерий в экспериментально инфицированной подгруппе составило 19,3 ($p \leq 0,05$), тогда как в интактной подгруппе их число оказалось выше (более чем в 2 раза). В зараженной *S. enteritidis* подгруппе опытной группы на фоне дачи Интебио® количество детектированных филогенов было достаточно высоким 75 ($p \leq 0,05$).

Таблица 2
Средние показатели динамики массы тела бройлеров контрольной и опытной групп

Группа	Масса тела суточных бройлеров, г	Подгруппа	Масса тела цыплят (г) после заражения спустя	
			1 сутки	3 недели
Контрольная	38,12±1,9	Интактная	650,42±104	2294,0±184
		Экспериментально зараженная <i>S. enteritidis</i>	656,0±53	2004,55±233
Опытная	38,17±2,4	Интактная	743,78±54	2403,22±231
		Экспериментально зараженная <i>S. enteritidis</i>	720,33±81	1936,6±155

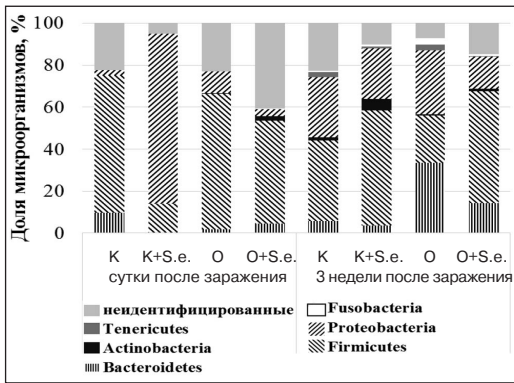


Рис. 1. Состав микрофлоры слепых отростков кишечника бройлеров ($n=3$), установленный методом T-RFLP: К – контроль интактная подгруппа; К+S.e. – контрольная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*; О – опытная интактная подгруппа; О+S.e. – опытная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*

На фоне сальмонеллезной инфекции в микрофлоре кишечника бройлеров контрольной группы отметили пониженное по сравнению с незараженной подгруппой относительное количество представителей родов *Lactobacillus* и *Bacillus*, а также повышенную концентрацию бактерий семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* (рис. 2). При даче кормовой добавки Интебио® экспериментально зараженным цыплятам значительных отличий от других групп по содержанию в кишечнике таксонов филума *Firmicutes* не зарегистрировали.

Через 3 недели после введения куль-

туры *S. enteritidis* проявилась общая тенденция увеличения бактериального разнообразия микрофлоры слепых отростков кишечника, что соответствует данным литературы [7].

К концу опыта возросло содержание представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* в пищеварительном тракте цыплят всех групп и подгрупп. Также с возрастом произошло заселение слепых отростков кишечника представителями филума *Fusobacteria*.

Также проявились различия экспрессии генов в тканях слепых отростков цыплят разных подгрупп (рис. 3). Ранее сообщалось об увеличении количества цитокинов и иммунных белков (IL1 β , IL6, IL8L2, IL12, IL17, IL18, IL22, IL23, IFN, LITAF) у зараженных сальмонеллами цыплят [9, 10]. В нашем эксперименте сальмонеллезная инфекция вела к увеличению уровня экспрессии большинства исследованных генов в 2 и более раз. Экспрессия генов цитокинов IL6 и IL8L2 увеличилась в 1,5 раза через сутки после заражения. Кормовая добавка Интебио® при введении в корм цыплятам способствовала увеличению экспрессии генов интерлейкинов в опытной группе, как в инфицированной *S. enteritidis* (в 4 – 6 раз), так и в интактной (в 3,5 – 5 раз) подгруппах.

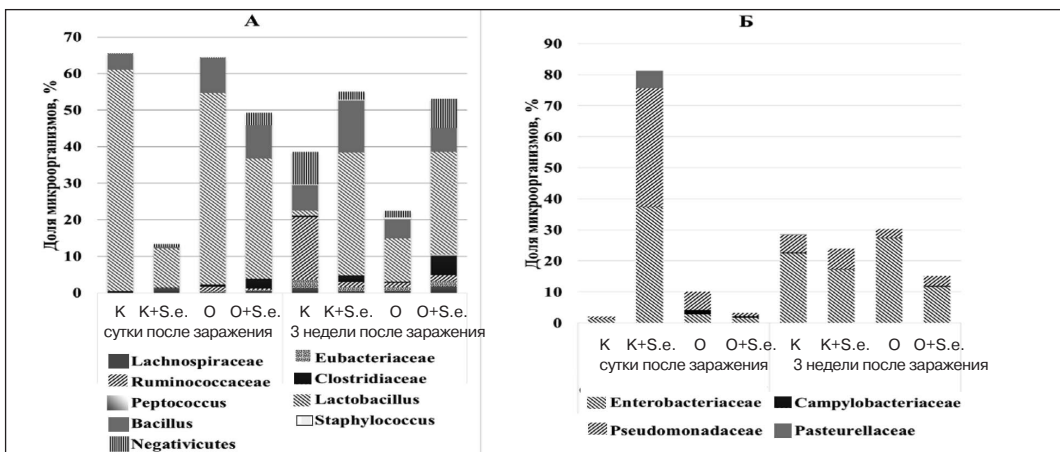


Рис. 2. Состав микрофлоры слепых отростков кишечника бройлеров ($n=3$), установленный методом T-RFLP: А – таксоны филума *Firmicutes*; Б – таксоны филума *Proteobacteria*; К – контроль интактная подгруппа; К+S.e. – контрольная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*; О – опытная интактная подгруппа; О+S.e. – опытная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*

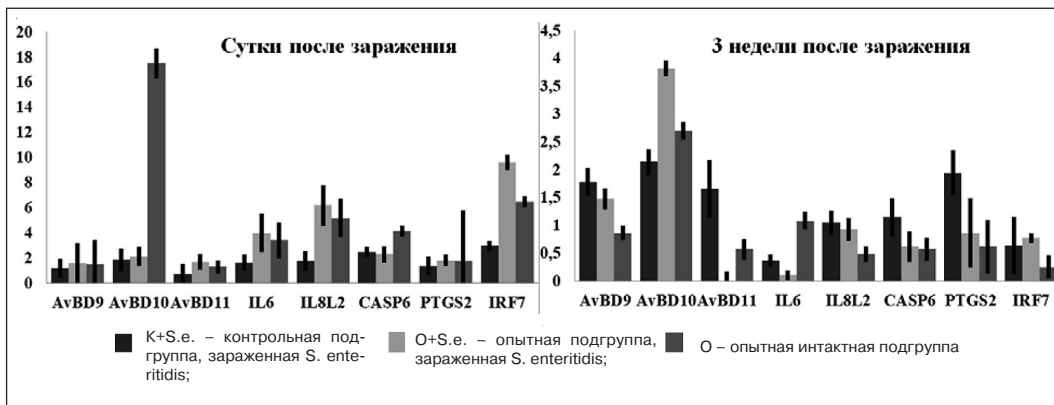


Рис. 3. Экспрессия участвующих в иммунном ответе генов на фоне применения кормовой добавки в разные сроки после заражения *S. enteritidis*

Через 3 недели после заражения экспрессия этих генов снизилась или достигла уровня, регистрируемого в контрольной группе. Заражение сальмонеллами привело к снижению экспрессии IL6, а применение кормовой добавки уменьшило уровень экспрессии IL8L2. Оба фактора (*S. enteritidis* и Интебио®) способствовали повышению экспрессии генов, связанных с иммунитетом, уже через сутки после заражения. Это свидетельствует о том, что эфирные масла, входящие в состав фитобиотика, обладают иммуномодулирующими свойствами. Вероятно, высокий уровень экспрессии ассоциированных с иммунитетом генов у незараженной сальмонеллой подгруппы, которой давали с кормом Интебио®, свидетельствует об активации Интебио® врожденного иммунитета.

Заключение. Результаты проведенных исследований подтвердили эффективность применения птице кормовой добавки Интебио® на основе эфирных масел. Кормовая добавка Интебио® при введении птице повышала прирост массы тела, стимулировала врожденный иммунитет, а также способствовала вытеснению патогенных бактерий из микрофлоры кишечника бройлеров.

Исследование выполнено при поддержке грантом Правительства Российской Федерации № 14.W03.31.0013.

ЛИТЕРАТУРА

- Лаптев Г.Ю. Кормление животных и микрофлора. Животноводство России. 2010; 2:56, 57.
- Грозина А.А. Состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта у цыплят-бройлеров при воздействии пробиотика и антибиотика (по данным T-RFLP-RT-PCR). Сельскохозяйственная биология. 2014; 6:46 – 58.
- Грозина А.А. Влияние состава рациона на микробиологические показатели желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров при скормливании препаратов Стафак-110 и Целлобактерин-Т: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2016; 181 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984; 480 с.
- Петрова О.Н. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации 2016 г. [Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор)]. ФГБУ ВНИИЗЖ ИАЦ Управления ветнадзора. Сост. Петрова О.Н., Караулов А.К., Бардина Н.С., Таценко Е.Е., Коренной Ф.И. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2016/iac2016.pdf> (дата обращения: 22.01.2018).
- Петрова О.Н. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации 2016 г. [Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор)]. ФГБУ ВНИИЗЖ ИАЦ Управления ветнадзора. Сост. Петрова О.Н., Караулов А.К., Бардина Н.С., Таценко Е.Е., Коренной Ф.И. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2017/iac2017.pdf> (дата обращения: 8.10.2018).
- Фисинин В.И., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н. и др. Изменение бактериального сообщества в желудочно-кишечном тракте кур в онтогенезе. Сельскохозяйственная биология. 2016; 51(6):883 – 890.
- Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. Methods. 2001; 25(4):402 – 408.
- Berndt A., Wilhelm A., Jugert C. et al. Chicken cecum immune response to Salmonella entericaserovars of different levels of invasiveness. Infect. Immun. 2007; 75:5993 – 6007.
- Crhanova M., Hradecka H., Faldynova M. et al. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to Salmonella enterica serovar Enteritidis infection. Infect. Immun. 2011; 79:2755 – 2763.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402 – 408.