

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

На правах рукописи

Глазунов Егор Андреевич
**ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СРЕДСТВА
НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ ПОСЛЕРОДОВОМ
ЭНДОМЕТРИТЕ У КОРОВ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Научный руководитель:
доктор биологических наук профессор Пименов Н.В.

Москва – 2019

Оглавление

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Этиологические факторы развития послеродового эндометрита у коров	12
1.2. Этиопатогенные бактерии при послеродовых эндометритах	13
1.3. Патогенез и клинические признаки послеродовых эндометритов	15
1.4. Проблемы терапии при эндометритах	18
1.5. Экспериментальный опыт лечебно-профилактической эффективности бактериофаговых средств	21
1.6. Механизмы взаимодействия бактериофагов во внутренних средах макроорганизма.....	23
1.7. Заключение по обзору литературы	26
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Материалы и методы	33
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
2.3. Бактериологические исследования при послеродовых эндометритах у коров	46
2.4. Патогенность микроорганизмов, изолированных при эндометритах у коров.....	57
2.5. Изучение возможности применения готового средства на основе бактериофагов для профилактики и лечения эндометритов у коров	62
2.6. Разработка средства на основе бактериофагов для профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров.....	66
2.6.1. Выделение, отбор, селекционирование вирулентных бактериофагов	67
2.6.2. Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов.....	68

2.6.3.Подбор маточных бактериальных культур для бактериофагов-претендентов.....	74
2.6.4.Получение высоких титров бактериофагов-претендентов для конструирования экспериментальных серий нового средства.....	76
2.6.5.Очистка фаголизатов, после наработки фаговой массы	79
2.7. Доклинические исследования нового коктейля бактериофагов «Ветагин».....	80
2.7.1.Изучение возможного взаимодействия компонентов препарата «Ветагин» с клетками отдельных представителей нормофлоры	80
2.7.2.Изучение профилактической и лечебной эффективности <i>in vivo</i>	82
2.7.3.Стабильность готового коктейля бактериофагов по методу «ускоренного старения»	88
2.7.4. Стабильность готового коктейля бактериофагов «Ветагин» по методу «долгосрочного испытания»	90
2.8. Клиническая апробация нового коктейля бактериофагов «Ветагин»...	92
2.8.1.Изучение безопасности применения нового коктейля бактериофагов	92
2.8.2.Первичные эксперименты по разработке методики применения нового препарата.....	93
2.8.3.Клиническая апробация нового коктейля бактериофагов «Ветагин».	94
2.8.4.Результаты широких клинических исследований на базе ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Озерецкое»	96
2.9. Отсутствие маммических побочных эффектов	100
2.9.1.Изучение возможного выведения бактериофагов с молоком при внутриматочном введении препарата на основе коктейля бактериофагов	100
2.9.2.Влияние внутриматочного применения препарата «Ветагин» на количество соматических клеток в молоке	104

3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	106
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
5. ВЫВОДЫ.....	124
6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ.....	126
7. ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	127
8. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ	148

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

BHI - brain heart infusion –сердечно-мозговая вытяжка;
DAPI – 4,6-диамидин-2-фенилиндол;
MPN - most probable number – наиболее вероятное число;
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;
ГРМ – гидролизат рыбной муки;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
КИ – клинические исследования;
КОЕ – колониеобразующие единицы;
КРС – крупный рогатый скот;
ЛПС – липополисахариды;
мкм. – микрометр;
мкр. кл. – микробных клеток;
млн. мкр. кл. – миллионов микробных клеток;
млрд. мкр. кл. – миллиардов микробных клеток;
МПА – мясо-пептонный агар;
МПБ – мясо-пептонный бульон;
МТФ – молочно-товарная ферма;
МФ – молочная ферма;
НПЦ – научно-производственный центр;
ОАО – открытое акционерное общество;
об/мин. – оборотов в минуту;
ООН – организация объединенных наций;
ООО – общество с ограниченной ответственностью;
ОПС – опытно-промышленная серия;
СПА – сельскохозяйственная производственная артель;
ФПП – функциональные продукты питания;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Инфекционно-воспалительные заболевания существенно нарушают цикл воспроизводства животных и приводят к наибольшим экономическим потерям на молочной ферме. Клинически выраженный послеродовой эндометрит в условиях молочных ферм России наблюдается у 22,5 - 38,4 % отелившихся коров [18, 54, 59].

Несмотря на этиологическую полифакторность послеродовых эндометритов, большинство исследователей считают, что важную роль в возникновении и развитии данного заболевания играют патогенные, условно-патогенные убиквитарные виды бактерий [39, 41, 88, 100, 114, 134, 141, 142, 185].

В настоящее время основными лечебно-профилактическими средствами при послеродовых эндометритах являются антибиотики и другие химиотерапевтические препараты. Количество устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий многократно увеличилось, что несет прямую угрозу здоровью человека [12, 32, 40, 91, 113, 164].

В качестве альтернативных антибиотикам средств интерес представляют бактериофаги. Их биологические свойства позволяют формировать средства на основе уникальных фаговых коктейлей и создавать на их основе перспективные лечебно-профилактические препараты, не отягощающие состояние макроорганизма на различных этапах болезни [4, 14, 71, 44, 109, 119, 136, 148].

Применение фаговых коктейлей позволит существенно снизить использование антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов, оставляя их в качестве средств выбора второго порядка.

Степень разработанности темы

При анализе литературных данных можно отметить, что использование бактериофагов при эндометритах у коров практически не изучено. Существуют единичные упоминания об использовании фагов при данной болезни [28, 150].

Многочисленными исследованиями микробного пейзажа при эндометритах у коров отображена широкая вариативность этиологически и патогенетически значимых микроорганизмов. В таких условиях огромный интерес представляют комплексные средства на основе вирулентных бактериофагов.

Исследований по созданию и изучению эффективности поливалентных фаговых коктейлей, активных к убиквитарным бактериям патогенам при эндометритах у коров до настоящей работы не было.

Цель и задачи исследования

Целью настоящих исследований являлась разработка и изучение эффективности метода профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров при помощи бактериофагов.

Для достижения поставленной цели сформированы задачи:

1. определить этиопатогенные бактерии при послеродовых эндометритах у коров;
2. изучить возможность применения готового средства на основе бактериофагов – «Фагогин» для профилактики и лечения эндометритов у коров;
3. определить оптимальный состав коктейля бактериофагов для лечебно-профилактических мероприятий при послеродовых эндометритах у коров;
4. осуществить подбор промышленно-перспективных бактериофагов для их включения в состав препарата;
5. сконструировать и изучить лечебно-профилактические свойства экспериментального средства на основе фагового коктейля для борьбы с послеродовым эндометритом у коров;
6. провести доклинические исследования и производственную апробацию пилотной серии экспериментального препарата для профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров.

Научная новизна

Проведен микробиологический мониторинг при послеродовых эндометритах у коров в ряде молочных хозяйств. Определены бактерии, участвующие в

этиопатогенезе послеродовых эндометритов у коров, в том числе впервые раскрыта роль некоторых видов микроорганизмов.

Выделены и селекционированы литически активные бактериофаги к условно-патогенным и патогенным видам бактерий, изолированным при эндометритах у коров, изучены биологические свойства этих фагов.

Разработано средство на основе комплексного бактериофагового коктейля, предназначенное для борьбы с послеродовыми эндометритами у коров, изучена доклиническая и клиническая эффективность пилотных серий экспериментального препарата.

Впервые научно обоснован и апробирован метод лечения и профилактики послеродовых эндометритов при помощи средств на основе бактериофагов.

Усовершенствованы лечебно-профилактические мероприятия при послеродовых эндометритах у коров без использования антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов.

Научная новизна подтверждена патентом на изобретение (№ 2662328 Способ профилактики эндометритов у коров), депонированием бактериофагов vB-EcM-04 (ВКШМ - Ф - 03П), vB-EfS-027 (ВКШМ - Ф - 01П), vB-PvS-22 (ВКШМ - Ф - 05П), vB-SaM-9,1 (ВКШМ - Ф - 06П), vB-PaP-20 (ВКШМ - Ф - 04П), vB-SpM-293 (ВКШМ - Ф - 07 П) в составе нового средства «Ветагин».

Теоретическая и практическая значимость работы

Обоснован новый метод профилактики и лечения послеродовых эндометритов на основе применения литически активных бактериофагов против бактерий-патогенов и комменсалов, участвующих в развитии болезни.

Сконструирован и апробирован новый бактериофаговый препарат «Ветагин» для профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров. Проведены первичные доклинические испытания препарата «Ветагин».

Доказана эффективность применения препарата «Ветагин» на базе хозяйств Московской и Нижегородской областей.

По результатам проведенных исследований разработаны и предложены для практического использования «Методические рекомендации по применению препаратов на основе бактериофагов для профилактики и лечения эндометритов у коров», утвержденные научно-методическим советом ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы спланирована и логически выстроена в соответствии с целью и задачами исследования. Основными направлениями научно-исследовательской работы стали установление оптимального состава нового средства, разработка пилотных серий средства на основе бактериофагов и их апробация в реальных производственных условиях. В работе использовали микробиологические, биотехнологические, клинические, клинико-лабораторные, цитологические методы, а также методы статистического анализа.

Степень достоверности и апробация результатов исследований

Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения научно-исследовательской работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами клинических испытаний, утвержденными в установленном порядке.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на научно-практических конференциях: «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», проводимой в рамках Всероссийского Фестиваля науки (г. Москва 2015 г.); «Инновационные разработки АВЗ для животноводства» (г. Белгород 2017 г.).

Результаты собственных исследований представлены на всех этапах Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых среди вузов Минсельхоза РФ в 2016 году.

Личный вклад соискателя

Автором непосредственно проведены изучение литературных источников по теме диссертации, бактериологический мониторинг при эндометритах у коров, выделены штаммы бактериофагов-претендентов из естественных источников и патологического материала, изучены биологические свойства фагов, их литический спектр, исследованы свойства в единичном цикле развития в системе «фаг-клетка», разработана рецептура и получены экспериментальные серии препарата с использованием технологии получения высоких титров фагов, проведены исследования по эффективности препарата *in vivo* в лабораторных условиях. Автор принимал непосредственное участие во всех испытаниях нового средства в условиях молочно-товарных ферм.

Публикации

Основные положения диссертационной работы изложены в 4 научных работах, из которых 4 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также в 1 методических рекомендациях, 1 патенте на изобретение, в материалах конференций и конкурсов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 168 листах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения по использованию результатов исследования, список использованной литературы (185 источников, в т. ч. 81 – иностранных авторов). Диссертационная работа содержит 25 таблиц, 26 рисунков, 6 приложения на 21 листе.

Основные положения, выносимые на защиту:

- видовой состав этиопатогенных бактерий при послеродовых эндометритах у коров;
- возможность фагопрофилактики послеродового эндометрита коров;
- биологические свойства бактериофагов-претендентов для конструирования средства профилактики и лечения эндометритов;

- методологические основы применения средства для профилактики послеродового эндометрита у коров экспериментального средства на основе коктейля бактериофагов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиологические факторы развития послеродового эндометрита у коров

Эндометрит – воспаление слизистого слоя матки эндометрия. Чаще всего болезнь развивается в послеродовой период. Первопричинами развития острого послеродового эндометрита во многих случаях являются задержание последа, контаминация репродуктивных органов убиквитарными условно-патогенными и патогенными микроорганизмами при неправильном родовспоможении, субинволюция матки, снижение барьерных функций эндометрия и иммуносупрессивные состояния из-за высокой технологической нагрузки на животное, нарушение зоогигиенических норм содержания и несбалансированного кормления [17, 26, 108].

Задержание последа обусловлено несбалансированным кормлением или недостаточным моционом. Коровы, переболевавшие эндометритом ранее, чаще предрасположены к данной патологии [11, 60]. Высокая интенсификация молочного скотоводства приводит к увеличению заболеваемости животных. Находясь в постоянном технологическом стрессе, не успевая восстановиться и получить необходимые запасы питательных веществ в сухостойный период, коровы оказываются не готовы к отелу. Недостаточный моцион приводит к ослаблению всех групп мышц, что негативно сказывается при отеле. В последствии животное не может самостоятельно отелиться, как следствие требуется родовспоможение. Стерильных условий или близких к стерильным условиям при родовспоможении в большинстве родильных отделений на молочных фермах не достигается, что приводит к контаминации влагалища, шейки матки и эндотелия матки патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Кроме того, на фоне естественного снижения иммунного статуса животного в следствие интенсивного продуктивного использования увеличивается проницаемость слизистых слоев в кишечном канале. Условно-патогенные бактерии, в норме сдерживаемые анта-

гонистической нормофлорой кишечника и факторами неспецифической иммунной защиты, попадают лимфогематогенным путем в половые органы коровы [9, 92, 101, 132].

В результате растяжений и механических разрывов слизистой эндотелия в процессе родов в матке образуются очаги воспаления и точечные кровоизлияния. При этом, часто развивается гиперергическая реакция с короткой, но ярко выраженной стадией альтерации и последующим развитием экссудативного типа воспаления. Слабые сокращения гладкой мускулатуры матки усугубляют патологические процессы в слизистой ткани, накопившиеся продукты распада клеток крови и слизистой оболочки не элиминируются из просвета органа, сенсibiliзируют ткани эндометрия и провоцируя еще большее повреждение клеток, развивается острый катаральный эндометрит [1, 54, 171]. Во многом высокий процент заболеваемости эндометритом обусловлен действиями персонала, обслуживающего животных.

Наиболее часто встречаются: острый катаральный послеродовой, гнойно-катаральный, острый фибринозный, хронический субклинический (скрытый), некротический, гангренозный септический эндометриты [17, 51, 59, 61].

1.2. Этиопатогенные бактерии при послеродовых эндометритах

Согласно многочисленным исследовательским данным специфического возбудителя или специфических возбудителей эндометрита бактериальной этиологии у коров выделить как основу нельзя. Большинство авторов полагает, что независимо от первопричин развития послеродового эндометрита, наиболее важную роль в его развитии играют условно-патогенные и патогенные бактерии.

При бактериологических исследованиях цервикальной слизи, мазков и смывов с влагалища выделяют *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Actinomyces spp.*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Porphyromonas spp.*, *Fusobacteriaceae spp.*, *Bacteroides spp.*, *Haemophilus somnus*, *Manheimia hemolytica*, *Pasteurella spp.*, *Prevotella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mobiluncus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*,

Eubacterium spp, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, микроскопические грибы *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Mucor racemosus*, и другие реже встречающиеся *Chlamydophila spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Salmonella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Neisseria spp.*, а также вирус вирусной диареи КРС (BVD), вирус инфекционного ринотрахеита КРС (BHV-1) [1, 41, 52, 88, 100, 114, 134, 141, 142, 184, 185].

Авторы сводятся во мнении определяющих ведущую роль в этиопатогенезе послеродового эндометрита микроорганизмам *Trueperella pyogenes* (ранее известная как *Arcanobacterium pyogenes*) и *Escherichia coli* действующих чаще всего ассоциативно [114, 118, 141, 142, 185]. При выделении нескольких микроорганизмов установить ведущую патогенную роль нередко не представляется объективным. Стоит отметить, что *Trueperella pyogenes* может выступать возбудителем и других заболеваний у других видов животных, так штаммы данного микроорганизма могут выступать этиологическим фактором развития гнойных абсцессов печени у голубей [160].

Перечисленные бактериальные агенты встречаются и у здоровых животных. Индикация и идентификация штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в пробах экссудата и смывах со слизистых тканей не свидетельствуют об обязательном развитии послеродового эндометрита [141, 151].

Немаловажную роль в развитии заболевания играют микроскопические грибы, интенсивно размножающиеся в сложившихся условиях дисбаланса внутренней среды матки. Обычно при эндометритах выделяют плесневые грибы – *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и дрожжевые грибы – *Candida albicans*, *Candida crusei* [105, 169]. Микроскопические грибы очень редко являются причиной возникновения послеродового эндометрита, чаще лишь осложняя течение болезни. Однако в большинстве случаев хронического течения эндометрита микроскопические грибы встречаются намного чаще [143].

1.3. Патогенез и клинические признаки послеродовых эндометритов

Акушерско-гинекологические заболевания матки, в особенности эндометрит, оказывают пагубное влияние не только на воспроизводительную функцию организма, но и на организм в целом, что проявляется заметным снижением продуктивности животного [55, 69].

Ассоциации условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, попавшие в эндометрий матки эндогенным и экзогенным путями, закрепляются на слизистом слое и встраиваются в подслизистую оболочку. В процессе жизнедеятельности микроорганизмов вырабатываются метаболиты, ферменты, экзотоксины, конечные продукты распада органических веществ, которые сенсibiliзируют рецепторы капилляров, эндометрия и миометрия, что приводит к ответной реакции организма в виде развития воспаления в местах формирования колоний бактерий и грибов, а также к накоплению токсических веществ [66, 74].

Тип развивающегося воспаления во многом зависит от иммунного статуса животного, видовой и количественной характеристик ассоциаций микроорганизмов в эндотелии матки. По данным Медведева Г.Ф. (2013 г.), чаще всего, развивается экссудативный тип воспаления, однако, при затяжном патологическом процессе воспаления переходит в пролиферативную форму. Клинические проявления на ранних этапах развития послеродового эндометрита вне зависимости от типа воспаления клинически не выражены. По мере размножения бактерий появляются первые признаки гнойного и гнойно-катарального эндометрита, проявляющиеся в изменении экссудата на мутный, темно-коричневого цвета. Иногда на ранних этапах могут проявляться мелкие включения фибринозных сгустков и гнойные тяжи в цервикальной слизи [61, 145, 176].

Основным механизмом местной защиты эндометрия является формирование грануляционного вала из лейкоцитов, состав которого в большей степени представлен нейтрофилами. При иммуносупрессивных состояниях макроорганизма или повышенной вирулентности бактерий грануляционный вал не успе-

вает сформироваться в достаточной мере, чтобы сдержать агрессивный рост бактерий. В таком случае бактерии проникают в подслизистую и мышечную оболочку, отягощая течение эндометрита. На фоне глубоких поражений матки развиваются септические формы с некротизированием тканей, вызванным механическим давлением пристеночного фибрина, формирующегося в межклеточном пространстве. Также при ускоренном процессе распада соматических клеток может развиваться гнилостная форма. Клиническое проявление которых, в первую очередь, сопровождается зловонным стойким запахом и кусочками отмирающих тканей вместе с гнойными истечениями. Часто животное выгибает спину в поясничном отделе, что свидетельствует о сильных болевых ощущениях. При прогрессировании патологического процесса развивается гангренозная форма эндометрита, в большей степени приводящая к летальному исходу [56, 101, 102].

Протекающие воспалительные процессы негативно сказываются на плодотворном осеменении, продолжительности сервис-периода и выходе. Морфофункциональные изменения тканей органов размножения переболевших эндометритом самок приводят к высокому уровню эмбриональной смертности. Также в результате этих причин возникают трудности внутриутробного развития эмбриона, связанные с нарушением питания при помощи трофобласта и, как следствие, случаи мертворождения или гипотрофии новорожденных. Воспалительные процессы в матке во время эмбриогенеза приводят к повреждению плацентарного барьера, что позволяет микроорганизмам и продуктам их жизнедеятельности беспрепятственно проникать внутрь плода [24, 36, 38].

Кроме того, острые и хронические воспалительные процессы в матке провоцируют создание неблагоприятных условий для спермиев во время осеменения и движения спермы для оплодотворения. В матке появляется большое количество активных форм фагоцитов, образуются бактериотоксины, происходит сдвиг нормальной кислотности матки в кислую сторону [100, 177].

Зачастую при диагностике на наличие разных форм эндометрита ветеринарные специалисты учитывают только показатели термометрии и явные клинические признаки. Такой подход малоэффективен, так как после проведения курса лечения клинические признаки исчезают, а воспалительный процесс остается в невыраженной форме. При этом ассоциации патогенных и условно-патогенных бактерий, подавленные курсом антибактериальной терапии, сохраняются внутри матки. Осложнение течения заболевания обусловлено наличием патогенных микроскопических грибов и скрытых инфекций, проявляющихся при снижении иммунного статуса [133, 182].

Иммунодефицитные состояния развиваются в следствие неполноценного и несбалансированного кормления, недостаточного моциона, накопления и воздействия токсических веществ, содержащихся в кормах, воде, а также при чрезмерном загрязнении и несоблюдении зоогигиенических норм внутридворовых помещений предприятий. Иммунопатология при острых послеродовых эндометритах связана, в первую очередь, со снижением популяции Т-лимфоцитов и одновременным перераспределением субклассов в пользу увеличения Т-супрессоров и снижения Т-хелперов. По сообщениям П.М. Бондарчука (2002) эти иммунологические явления влекут за собой снижение общего количества В-лимфоцитов и их функциональности, проявляющиеся в снижении продукции иммуноглобулинов первичного (М) и вторичного (G) иммунных ответов. У больных животных в сравнении со здоровыми отмечается достоверное увеличение уровня лизоцима в сыворотке крови на 25 %, общей бактерицидной активности, фагоцитоз нейтрофилов, что свидетельствует об адаптационной компенсаторной реакции на фоне ослабления специфических факторов защиты организма животного. Автор отмечает, что реальное повышение количества лизоцима в сыворотке крови выше, т.к. часть лизоцима связывает свободный гистамин и выводится из организма. Данные показатели свидетельствуют о развитии вторичного иммунодефицита. Наиболее ярко данные показатели выражаются в первые дни после

отела, в начале развития заболевания, и не приходят в норму к концу заболевания [15, 108, 129].

1.4. Проблемы терапии при эндометритах

Несмотря на большое количество предложений по использованию сильнодействующих синергидных препаратов с профилактической целью, поиск новых средств остается актуальным по нескольким причинам. Во-первых, широкое использование антибиотиков в условиях молочной фермы неизбежно ведет к их присутствию в остаточных количествах в животноводческих продуктах – молоке и мясе, что в современных условиях ограничивает использование продукции. Многие производители уже сегодня ищут замену антибиотикам в лечебно-профилактических мероприятиях, чтобы позиционировать продукцию своих ферм как экологически чистую [13, 19, 46, 49]. Во-вторых, проблема растущей антибиотикорезистентности циркулирующих бактериальных патогенов требует переориентирования ветеринарных подходов и нового качества решения задач профилактики и лечения болезней КРС, наиболее распространенных в производственных условиях (эндометриты, маститы, болезни молодняка – бронхопневмония, диспепсия, гастроэнтерит, в том числе специфического генеза) [6, 73, 98]. Также по сообщениям ряда исследователей в этиопатогенезе эндометритов все большая роль отводится сапрофитным бактериям и микроскопическим грибам: *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium necrophorum*, *Geotrichum silvicola*, *Candida albicans* и др., ассоциации которых не позволяют подобрать высокоактивное средство в отношении каждого из патогенов-участников болезни [106, 118, 133, 170].

В профилактике и лечении коров, больных послеродовым эндометритом, в основном, используют антибиотики и другие химиотерапевтические средства с антибактериальным эффектом в качестве этиотропной или патогенетической терапии. Чаше всего используют макролиды, сульфаниламиды, нитрофураны, а также средства на основе диоксидина и его аналогов. Перечисленные средства

вызывают негативные последствия от их применения, увеличивается число антибиотикорезистентных штаммов бактерий, некоторые препараты оказывают негативное влияние на внутренние органы и эндометрий, провоцируя иммуносупрессию. В результате распространенные средства теряют эффективность, также в результате применения большинства химиотерапевтических средств снижается качество продукции [3, 47, 81, 99, 113, 140, 149].

Многие производители предлагают средства для профилактики и лечения эндометритов, указывая, что данные препараты являются альтернативным решением, предполагающим отказ от антибиотиков. Так, исследователи предлагают в качестве антагонистической терапии использовать препараты на основе *Bacillus subtilis* [50, 53, 87], многокомпонентные пробиотические препараты [42, 166], средства на основе лекарственных растений [75, 89, 152, 161], стимулирующие и моделирующие иммунный ответ [72, 90]. Однако большинство из этих препаратов являются вспомогательными, не обладающими прямым этиотропным действием при воспалительных процессах в эндометрии, то есть с отсутствием прямого воздействия на этиопатогенные бактерии при послеродовых эндометритах. Несмотря на сложный этиологический профиль послеродовых эндометритов у коров, стимулирование и моделирование иммунного ответа, ускорение или замедление обмена веществ (в зависимости от показаний), нормализация микрофлоры кишечника, регулирование гормонального фона без прямого воздействия на этиопатогенетические сапрофитные микроорганизмы не всегда дают стабильный результат [29, 138, 147].

Некоторые исследователи предлагают использовать методы физиотерапии, в частности использование инфракрасной лазеротерапии, УВЧ (ультравысокочастотное электромагнитное поле), акупунктуры и другие [28, 30, 67, 70]. Из анализа литературных данных можно сделать вывод о хорошей эффективности применения физиотерапии. Однако на сегодняшний день широкого практического применения методы физиотерапии не получили.

Действующим началом средств бактерицидного воздействия на этиопатогенные бактерии могут выступать литически активные бактериофаги – специфичные вирусные агенты. Использование бактериофагов в профилактике и лечении бактериальных инфекций известно давно, но с приходом эры антибиотиков их постигло забвение [4, 37, 45].

Бактериофаги обладают рядом преимуществ, обусловленных их биологическими свойствами, такими как видоспецифичность, отсутствие адсорбции на клетках макроорганизма, способность самовоспроизводиться, способность проникать в очаги поражения (биодоступность), при правильном применении – полной безвредностью для макроорганизма. Очень важным свойством бактериофагов является избирательное действие (видоспецифичность). При правильном конструировании средства на основе бактериофагов негативное воздействие на представителей нормофлоры отсутствует, что невозможно при применении химиотерапевтических и антибактериальных средств. Данная характеристика бактериофагов делает их очень привлекательными в использовании, однако, это преимущество в некоторой степени является и недостатком, поскольку не всегда удастся установить полный видовой и серотиповый спектр бактерий, участвующих в этиологии и патогенезе заболевания. Фундаментальные основы конструирования коктейлей бактериофагов для профилактики и лечения бактериальных суперинфекций, факторных бактериальных инфекций, патогенетической терапии для сдерживания вторичных бактериальных инфекций, а также подбор моновалентных бактериофагов в отношении строго инфекционных заболеваний бактериальной этиологии с одним возбудителем, позволят создать альтернативные антибиотикам средства [7, 8, 44, 79, 95].

Накопленный опыт использования бактериофагов в Советском союзе служит основательным подспорьем для формирования новых лекарственных средств, адаптированных под современные проблемы [5, 37].

Несмотря на все положительные стороны фагопрофилактики и фаготерапии на данный момент нет лекарственных препаратов для ветеринарного применения на основе бактериофагов, в том числе и для борьбы с эндометритами у коров.

1.5. Экспериментальный опыт лечебно-профилактической эффективности бактериофаговых средств

Первые упоминания о терапевтическом использовании бактериофагов в ветеринарии связаны с именем Феликс д'Эрелл, одного из первооткрывателей бактериофагов. В регионе Аркис-сур-Аубе Франции весной 1919 г. была отмечена вспышка птичьего тифа, вызванного бактерией *Salmonella gallinarium*. Именно тогда д'Эрелл выделил бактериофаги с высокой литической активностью к *Salmonella gallinarium* от павших птиц. В дальнейшем он протестировал эффективность выделенных бактериофагов на шести экспериментально зараженных птицах, многообещающие результаты подтолкнули его на проведение более масштабного исследования. Он отобрал 100 кур, которых искусственно заразил выделенным патогеном *Salmonella gallinarium*, из них всего 20 были обработаны выделенными бактериофагами. В результате 60 кур погибли, 20 были в критическом состоянии, а куры из опытных групп были клинически здоровыми [124, 125].

Эксперименты, проводимые Топли и его коллегами, по терапевтическому использованию литически активных специфичных к *Salmonella typhimurium* фагов не показали достаточной результативности. Более того, они отмечали, что интраперитонеальное применение бактериофагов совсем незначительно снизило распространение возбудителя в опытной группе. Однако в дальнейшем, авторы указывают на то, что скорее всего выделенный бактериофаг не обладал стабильным литическим действием, он не мог лизировать *Salmonella typhimurium in vivo*. Также учеными было отмечено, что применение образцов бактериофагов, нагретых до 70 °С в течение 50 мин., не давало никаких результатов, тем самым показывая, что для терапии необходимы «живые бактериофаги» [180, 181].

Были неудачные примеры лечения экспериментальных септицемий, вызванных бактериофагами рода *Staphylococcus* и *Streptococcus* [122, 144]. В институте Георгия Элиаву в 1930 г. были попытки лечения септицемий, экспериментального лечения чумы у кроликов, морских свинок, и других лабораторных животных, также потерпевшие фиаско [123, 157].

В 1983 году Смит и Хаггинс обнаружили профилактическую и терапевтическую эффективность бактериофагов, специфичных к энтеротоксигенному штамму *E. coli* O9:K30.99.57. Разделенные на группы телята получали смесь бактериофагов в титре (10^{11} БОЕ). В опытных группах ни один теленок не заболел, в то время как в контрольных группах при инфицировании отмечали высокую заболеваемость [173].

В 2002 году были проведены эксперименты по предотвращению и лечению бактериемии, вызванной ванкомицин-устойчивым штаммом *Enterococcus faecium* (VRE). В ходе работы авторами было показано, что введение бактериофага в ближайшие часы после экспериментального заражения мышей патогенным штаммом *Enterococcus faecium* предотвращало падеж подопытных животных [115].

Саркар и коллеги в 1996 году провели исследования по профилактической и лечебной эффективности специфичных бактериофагов к *Vibrio cholera* на модели экспериментального заражения путем внесения холерных вибрионов в петлю подвздошной кишки кролика. В результате профилактической эффективности от применения бактериофагов не выявили, однако отметили, что это связано с неправильной моделью экспериментального заражения и непониманием механизмов взаимодействия бактериофагов с клетками-мишенями в кишечнике живых организмов [167].

Сотхил и коллеги провели исследования по фаготерапии экспериментальных моделей инфекций мышей, вызванных *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus*. Были получены многообещающие результаты в

предупреждении и лечении заболеваний, вызванных каждым из трех патогенов. [175].

В настоящее время многие исследователи изучают практическое применение бактериофагов. Так Пименов Н.В. провел исследования Бактериофага Тифимуриум в качестве метода селективной деконтаминации совместно с пробиотическим препаратом Лактобифадол при оральном инфицировании штаммами *Salmonella typhimurium* Д-1в t и *Salmonella typhimurium* М-2ф. В опытных группах с применением бивалентного бактериофага и пробиотика сохранность была на уровне 90-100 %, в то время как в контрольных группах – 0-10 % [159].

Практическое применение бактериофагов при эндометритах у коров изучено недостаточно. В литературных источниках существует всего несколько упоминаний об использовании препаратов на основе бактериофагов при эндометритах у коров. Так Григорьева Г.И. и коллеги изучили совместное применение бактериофагов с пробиотическими средствами лакто-, бифидумбактерин. В результате сочетанного применения лекарственных средств удалось сократить продолжительность дней бесплодия до $47,5 \pm 8,50$, в то время как, в других группах, с использованием монотерапии в среднем до $63,6 \pm 4,4$ дней [28]. Однако при этом Мачадо и коллеги в исследованиях по изучению эффективности внутриматочного введения маннозы или бактериофагов специфичных к *Escherichia coli* и *Arcanobacterium pyogenes* (*Trueperella pyogenes*) отмечали, что внутриматочное введение как маннозы, так и бактериофага не оказывают влияние на выздоровление животных в сравнении с контрольными группами [150].

1.6. Механизмы взаимодействия бактериофагов во внутренних средах макроорганизма

Способность бактериофагов как частиц белковой природы провоцировать выработку антител при введении в организм человека или животного известно со времен первооткрывателей вирусов бактерий [2, 125].

В исследованиях на бактериофагах Т2, Т4 и DDVI, посвященных вопросам антителообразования, А.С. Тихоненко и коллеги установили, что фаги способны

индуцировать выработку антител трех видов: 1) общих для фагов T2, T4 и DDVI, 2) общих для фагов T4 и DDVI и 3) специфических для каждого исследуемого фага [179]. Однако выработка антител клетками гуморального иммунитета сильного зависит от самого бактериофага, на введение некоторых видов бактериофагов выработки антител не происходит, в то время как на другие даже после однократного введения идет выраженная выработка специфичных антител [128, 174]. Отрицать факт, что в ответ на введение бактериофагов происходит выработка специфических антител, контрпродуктивно, в особенности со свидетельствами об противовоспалительном, противоопухолевом, иммуномодулирующем действии бактериофагов, приведенными ниже. Однако необходимо учитывать возможность различной реактивности на бактериофаги в связи с их гетерогенностью [10, 103, 104].

Внутриклеточное уничтожение бактерий фагоцитами, в частности, моноцитами и гранулоцитами, является одной из основных защитных функций иммунитета против вторжения патогенов. В экспериментах *in vivo* на белых мышах было показано, что очищенный от бактериального дебриса бактериофаг A3/R не обладает способностью индуцировать кислородный взрыв в моноцитах и нейтрофилах при его введении в организм, в тоже время было установлено, что введение очищенного бактериофага T4 увеличивало продукцию активных форм кислорода дозозависимым образом. Однако интенсивность фаг-индуцированного образования свободных форм кислорода была значительно ниже, чем у термоинактивированных клеток золотистого стафилококка, что свидетельствует о том, что препараты на основе бактериофагов вряд ли смогут вызвать окислительный стресс в фагоцитах [117, 155].

Также проводились исследования по способности влияния бактериофагов на опухолевые клетки макроорганизмов, в результате которых было установлено, что опухоль-специфические бактериофаги индуцируют разрушение опухоли путем активации опухолевых ассоциированных макрофагов [131], а также что их противоопухолевая активность зависит от метода введения бактериофага

в организм [126]. Также было выдвинуто предположение по противоопухолевой активности бактериофагов посредством ингибирования сигнального пути, а именно воздействием на белок integrin $\beta 3$ (CD61) [127].

В литературных данных существуют упоминания о возможном влиянии бактериофагов на вирусы эукариотических клеток [154], а также об противовоспалительном действии, связанном не только с лизисом бактерий, но и с прямым взаимодействием с иммунокомпетентными клетками [135, 136].

Имеющиеся в литературных источниках данные по увеличению цитокинов при применении бактериофагов скорее всего связаны с действием остатков ЛПС и эндотоксинов бактерий. Так авторы постулируют, что данные, свидетельствующие о цитокин-индуцирующей способности фаговых препаратов *in vitro* и *in vivo* могут быть искажены контаминацией препаратов эндотоксинами, высвобождающимися при лизисе бактериальных клеток во время биотехнологического культивирования бактериофагов. Вероятно, что именно эндотоксины и другой бактериальный дебрис могут привести к активации клеток, продуцирующих цитокины [130, 156].

Бактериофаги не адсорбируются на клетках макроорганизмов, но иммунокомпетентные клетки могут влиять на бактериофаги, взаимодействуя через АПК (антигенпрезентирующие клетки), МНС I и II классов, а также посредством связывания белков капсулы и адсорбционного аппарата бактериофага иммуноглобулинами IgG1, IgG3, IgA, IgG2 и презентации макрофагам и нейтрофилам, выступая в роли иммуномодуляторов [14, 105].

Джереми Бар (Jeremy Bar) и коллеги в своих работах используют термин ВАМ (bacteriophage-mediated immunity) бактериофаг-опосредованный иммунитет, выдвигая гипотезу, что бактериофаги являются неотъемлемой частью пристеночного иммунитета в слизистом слое кишечника макроорганизма [68, 111, 112, 148, 163].

1.7. Заключение по обзору литературы

Здоровье населения невозможно без натуральных и качественных продуктов животноводства. Трудно переоценить значение кисломолочных продуктов и мяса крупного рогатого скота, которые составляют значимую часть в обеспечении питательными веществами населения. В большинстве европейских стран, как и в Российской Федерации, первое место среди всех функциональных пищевых продуктов занимают молоко и молочные продукты. Так, европейский рынок ФПП оценивался в 3,3 млрд. долларов, среди которого на долю молочных продуктов приходилось 65 %, по тем же оценкам в России доля молочных продуктов от всех ФПП превышала 49 %. Популярный выбор молочных продуктов в большинстве стран не случаен, поскольку молоко и молочные продукты обладают лечебно-профилактическими и диетическими свойствами. Нельзя отрицать, что молочная продукция является социально значимой, в особенности для Российской Федерации, в связи с большим спросом данного вида продуктов среди населения [16, 37, 57, 83, 98].

Эффективное производство в молочной промышленности невозможно без высокого качества изначального сырья – молока. На производство молока влияет огромное количество факторов, большая часть которых обусловлена условиями содержания и кормления коров. В сложившихся условиях снижения поголовья крупного рогатого скота, в частности коров, соблюдать паритет между качеством и объемами производства молока невозможно. Производители вынуждены увеличивать объемы производства с соблюдением минимальных требований к качеству цельного молока, которые позволят реализовывать продукцию. По данным Росстата на 2016 год суммарное поголовье крупного рогатого скота составило 18752,5 тыс., из них коров 8263,7 тыс. Несмотря на снижение поголовья коров, производство молока, также по данным Росстата, остается на уровне 30 528,8-30 796,9 млн. тонн в год. Сохраняющийся уровень надоев молока при снижении поголовья обусловлен селекцией по показателям продуктивности коров, а также возрастающей интенсификацией производства [84, 97].

Количество высокопродуктивных коров в процентном соотношении к общему числу увеличивается. Установлено, что высокопродуктивные животные трансформируют питательные вещества, содержащиеся в кормах, с меньшими затратами на единицу продукции. Отличительной особенностью высокопродуктивных коров является высокая интенсивность обмена веществ, что приводит к снижению реактивности, приспособляемости к внешним факторам и иммунологического статуса в целом. Преобладающие процессы катаболизма над процессами анаболизма у высокопродуктивных коров приводят к дефициту питательных веществ. Компенсация посредством балансировки кормления таких животных не всегда дает желаемый результат, т.к. достаточное количество питательного вещества в корме не будет замещать дефицит, в связи с ограниченной способностью усвояемости за единицу времени. В результате животное становится менее устойчивым и подвержено большему риску развития заболеваний, чем животные с меньшей продуктивностью [17, 25, 33, 34, 52, 86].

Все заболевания дойных коров сказываются на экономических показателях предприятий, но среди всех болезней следует выделить акушерско-гинекологические, т.к. именно эти заболевания существенно нарушают цикл воспроизводства животных и приводят к наибольшим экономическим потерям отрасли. Ущерб от акушерско-гинекологических заболеваний складывается из увеличения сервис-периода, снижения продуктивности больных и переболевших коров, развития симптоматического бесплодия, яловости при длительном хроническом течении болезней, снижения качества и потерь молока в следствие его выбраковки, а также снижения качества продукции при лечении с использованием антибиотиков и химиотерапевтических препаратов [51, 184].

Самым распространенным акушерско-гинекологическим заболеванием является эндометрит – воспаление слизистого слоя матки. Чаще всего эндометрит развивается после отела – послеродовой эндометрит. Клинически выраженный послеродовой эндометрит в условиях молочных ферм России наблюдается у 22,5

- 38,4 % отелившихся коров. Ветеринарные врачи затрачивают на лечебно-профилактические мероприятия, направленные на борьбу с послеродовыми эндометритами до 80 % рабочего времени [18, 54, 59 64].

Несмотря на этиологическую полифакторность послеродовых эндометритов большинство исследователей считают, что важную роль в возникновении и развитии данного заболевания играют патогенные, условно-патогенные убикивитарные виды бактерий: *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Actinomyces* spp., *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Porphyromonas* spp., *Fusobacteriaceae* spp., *Bacteroides* spp., *Haemophilus somnus*, *Manheimia hemolytica*, *Pasteurella* spp., *Prevotella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Mobiluncus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* [1, 39, 41, 88, 100, 114, 134, 141, 142, 184, 185].

Существует много методов и средств для борьбы с послеродовыми эндометритами. В настоящее время единственными средствами, воздействующими на этиологически и патогенетически значимые штаммы бактерий при послеродовых эндометритах, являются антибиотики и другие химиотерапевтические препараты. Данные группы препаратов зарекомендовали себя как надежные средства в борьбе с бактериальными и смешанными инфекциями в составе комплексной профилактики и терапии болезней полового аппарата коров. Однако за последние годы количество устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий многократно увеличилось [21, 91]. О явлении антибиотикорезистентности знали еще во время изобретения первых препаратов на основе антибиотиков. Александр Флеминг отмечал, что воздействие малыми дозами или же с малым временем экспозиции порождает устойчивость у бактерий к данному виду антибиотика. Уже тогда Флеминг опасался чрезмерного и неоправданного использования пенициллина, которое приведет к потере его эффективности, в 1945 году он сказал: «Неосмотрительный человек, играющий с лечением пенициллином, морально

ответственен за смерть человека, погибшего от инфекции, устойчивой к пенициллину. Надеюсь, этой беды можно избежать» [172].

За последние 30 лет проблему антибиотикорезистентности поднимали на самых высоких площадках. Об этом свидетельствуют многочисленные доклады: в 2001 году ВОЗ обнародовала Глобальную стратегию по сдерживанию кризиса резистентности к противомикробным препаратам; в 2012 году доклад генерального директора ВОЗ Маргарет Чен в Копенгагене «Устойчивость к противомикробным препаратам в Европейском союзе и в мире», опубликованный Центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), и доклад в 2013 году «Угроза устойчивости к антибиотикам в Соединенных Штатах» (Antibiotic resistance threats in the United States, 2013), опубликованный в 2014 году, отчет группой из института RAND (Research and Development) Europe и компанией KPMG (Klynveld Main Goerdeler) «Антибиотикорезистентность: необходимы срочные меры против кризиса ради здоровья и благосостояния населения» (Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations) и многие другие, обозначили глобальную проблему роста антибиотикорезистентных микробных патогенов [20, 63, 80, 121, 178].

Практически во всех докладах говорят об чрезмерном и неоправданном применении антибиотиков, в частности, в сельском хозяйстве и ветеринарии. Так, в 2016 году на пленарном заседании Генассамблеи ООН в Нью-Йорке Министр здравоохранения России Вероника Скворцова обозначила основные стратегические направления в борьбе с антибиотикорезистентностью: сокращение применения антибиотиков в ветеринарии и сельском хозяйстве, проведение массовой вакцинации и разъяснительная работа с населением. В этом докладе не случайно на первом месте стоит сокращение применения антибиотиков именно в ветеринарии и сельском хозяйстве, т.к. в данной отрасли их использование широкомасштабно и, часто, эмпирически [62, 78].

Неконтролируемое применение антибиотиков в сельском хозяйстве и ветеринарии несет прямую угрозу здоровью человека. Несмотря на сокращение потребления антибиотиков в гуманной медицине, все усилия могут быть безрезультатными, поскольку передача механизмов устойчивости к антибиотикам может осуществляться горизонтальным путем от резистентных штаммов бактерий с продуктами питания [12, 164]. Помимо горизонтальной передачи генов антибиотикорезистентности убиквитарными бактериями, уже сегодня наблюдаются сложности в лечении зоонозных заболеваний у людей, в связи с приобретением устойчивости возбудителей к большинству групп антибиотиков непосредственно на сельхозпредприятиях в результате естественного отбора устойчивых штаммов [32, 40, 41, 113].

В качестве альтернативных антибиотикам средств интерес представляют бактериофаги. Бактериофаги – давние враги бактерий, они являются главным фактором, регулирующим численность бактерий на планете. Биологическая роль бактериофагов многогранна и очень сложна. Принято считать, что они также выполняют функцию эволюционную, перенося гены от одних бактерий другим [43, 48, 119, 120, 153, 168]. Фаги, действуя избирательно, обладают явным преимуществом в специфичности перед антибактериальными препаратами. Видоспецифичность бактериофагов позволяет формировать уникальный состав фаговых коктейлей, создавать перспективные лечебно-профилактические препараты, неотягощающие состояние макроорганизма на различных этапах болезни. Мельчайшие живые организмы на Земле, бактериофаги, наравне с бактериями формируют уникальные микрофлоры в организме человека и животных. Сегодня доказано их присутствие в кишечнике человека [14, 109, 119, 137, 148].

Множество заболеваний, в том числе инфекционной природы, часто сопровождаются вторичными инфекциями. Такие болезни приобретают характер суперинфекций, сменяя возбудителя на фоне иммуносупрессивного состояния макроорганизма. Активизация сапрофитной микрофлоры приводит к развитию

патогенеза с участием бактериальных ассоциатов. Поэтому создание комплексных фаговых препаратов является перспективным направлением терапии при болезнях, вызванных микроорганизмами или развивающихся с их участием.

Н.В. Пименов в работе о перспективах применения фаговых препаратов указал на возможность совершенствования борьбы с акушерско-гинекологическими проблемами в скотоводстве путем фагопрофилактики и фаготерапии [71]. Эта проблема приобретает особенную актуальность на фоне создания экологически чистого производства без использования антибиотиков для профилактических целей в молочном скотоводстве, даже препаратов, не определяемых методами контроля качества молочной продукции.

Эндометрииты бактериального этиопатогенеза остаются одной из самых актуальных нерешенных вопросов ветеринарной медицины. В связи с сложностью этиологии данного заболевания разработать специфическую профилактику и терапию на данный момент не представляется возможным, что влечет за собой бесконтрольное применение средств широкого спектра действия, чаще всего антибиотиков. Их длительное эмпирическое и бесконтрольное применение привело к глобальной антибиотикорезистентности бактерий, в сложившихся условиях необходимо изыскивать и внедрять альтернативные антибиотикам средства и методы профилактики и лечения бактериальных болезней.

Применение фаговых коктейлей позволит существенно снизить использование антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов, оставляя их в качестве средств выбора второго порядка, принимая во внимание, что потенциал антибиотиков для таких случаев находится на грани исчерпания, в связи с ростом циркуляции антибиотикорезистентных штаммов и дороговизной профилактического использования препаратов пятого поколения. То есть создание средств на основе вирулентных бактериофагов, в частности, для профилактики и лечения послеродовых эндометриитов, является актуальным и перспективным направлением ветеринарной медицины.

Помимо глобальной угрозы антибиотикорезистентности, знания об микробиоценозе претерпели существенные изменения со временем активного внедрения антибиотиков, в результате которых сформировались новые концепции в отношениях микро- и макроорганизмов [116, 139, 163]. Бактериофаги определенно способны занять свое место в новых подходах к профилактике и лечению бактериальных инфекций. При этом фаги не являются универсальным оружием против патогенных видов микроорганизмов, но при должном подходе к профилактическому применению и комплексной терапии можно достичь результатов способных конкурировать с нынешними передовыми разработками фарминдустрии в области борьбы с бактериальными инфекциями [7, 8, 44, 79, 95].

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в период 2015-2018 гг. на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина». Ряд исследований выполняли на базе лаборатории ООО Научно-производственный центр «МикроМир».

Выявление заболеваемости, клинические, диагностические исследования, взятие проб для бактериологических исследований, отбор проб сточных вод, навоза, подстилки, крови, экссудата и содержимого абсцессов для выделения бактериофагов осуществляли в хозяйствах Московской области: ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Озерецкое», ООО «РусМолоко» отделение Самотовино, СПА «Кузьминский» Сергиев-Посадского района, ООО «Лесные Поляны» Пушкинского района, ООО «Колхоз Гжельский» Раменского района, а также в ОАО «Нива» Нижегородской области Лысковского района.

Отбор проб маточного содержимого для бактериологических исследований проводили при помощи катетеров ECS (Equine Culture Swab, without transport medium) на транспортные системы Hiculture Transport Swabs w/Cary-Blair Medium со средой Кари-Блэйра в полистироловых пробирках. Для транспортировки патологического материала (кусочков органов и тканей) от павших животных, а также для отбора проб сточных вод, содержимого абсцессов, флегмон, суставной жидкости, молока, мочи, навоза, подстилки, экссудата и мацерирующей ткани из копытной щели, кусочков последа, карункул использовали многоцелевой полипропиленовый стакан Multipurpose Clinical Sample Collector, PP.

Бактериологические исследования проводили по расширенной методике. Использовали питательные и дифференциальные среды: МПА, МПБ, ВНИ-агар/бульон-(Brain hearth infusion) – сердечно-мозговая вытяжка, среда Эндо, клостридиозная среда, агар Левина, стрептококковый бульон, среда Шедлера, хромогенная среда «Уриселект-4», маннит-солевой агар, ГРМ-агар, агар Сабуро,

при необходимости использовали среду Олькеницкого. Каждый образец клинического или патологического материала высевали на все перечисленные среды, осуществляли дублирующие высевы с целью культивирования факультативных и облигатных анаэробных бактерий в строго анаэробных условиях. Для культивирования факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий проводили дублирующие высевы в условиях, приближенных к анаэробным, используя газогенерирующие пакеты GazPak EZ Anaerobe Container System Sachets (см. рисунок 1), а также анаэробную станцию Whitley A35 anaerobic workstation (см. рисунок 2) с составом воздушной среды – 10 % водорода, 10 % углекислого газа и 80 % азота.

Идентификацию бактерий определяли на основании культуральных, морфологических, тинкториальных, биохимических свойств при помощи МИКРОЛА-ТЕСТ-ов: ЭНТЕРОтест, СТАФИтест, СТРЕПТОтест ЭН-КОККУСтест, НЕФЕРМтест, АНАЭРОтест, НЕЙССЕРИЯтест.

Активность цитохромоксидазы исследовали при помощи тест-полосок производства компании Erba Lachema, результаты исследования биохимических тестов считывали при помощи планшетного спектрофотометра Multiscan Ascent (96-лунночный), используя программу МИКРОБ-автомат. Подтверждение видовой принадлежности проводили при помощи методов масс-спектрометрии используя Bruker Daltonik MALDI Biotyper. Полученные в результате исследования масс-спектры белков и пептидов микроорганизмов обрабатывали при помощи программного обеспечения Biotyper, в котором сравнивали полученные масс-спектры с имеющимися в референсной базе данных, содержащей более 7300 штаммов и 2500 видов микроорганизмов. Пример масс-спектра представлен на рисунке 3.



(A)



(B)



(B)

Рисунок 1 – Анаэробные условия культивирования, рассеянного инокулята (А), достигаемые при помощи GazPak EZ Anaerobe Container System Sachets (Б), и дальнейшего культивирования в термостатах (В).



Рисунок 2 – Whitley A35 anaerobic workstation (анаэробная станция Уитли А35)

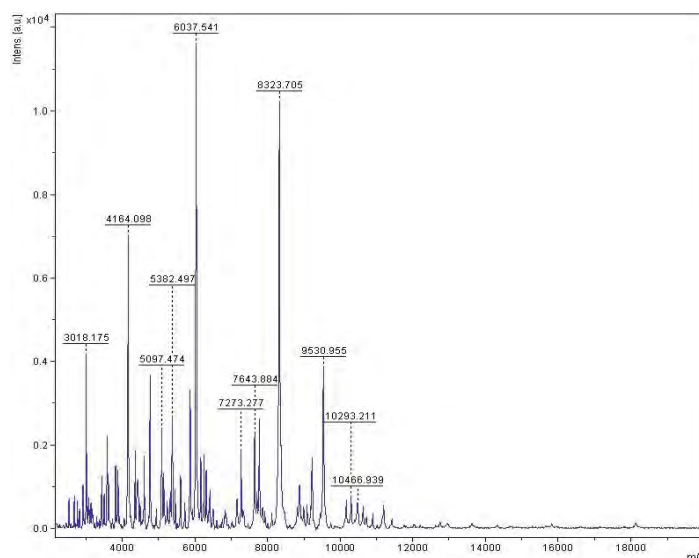


Рисунок 3 – Масс-спектр бактерии вида *E. coli* штамм MB11464_1 CHV

Схема проведения бактериологических исследований представлена на рисунке 4.

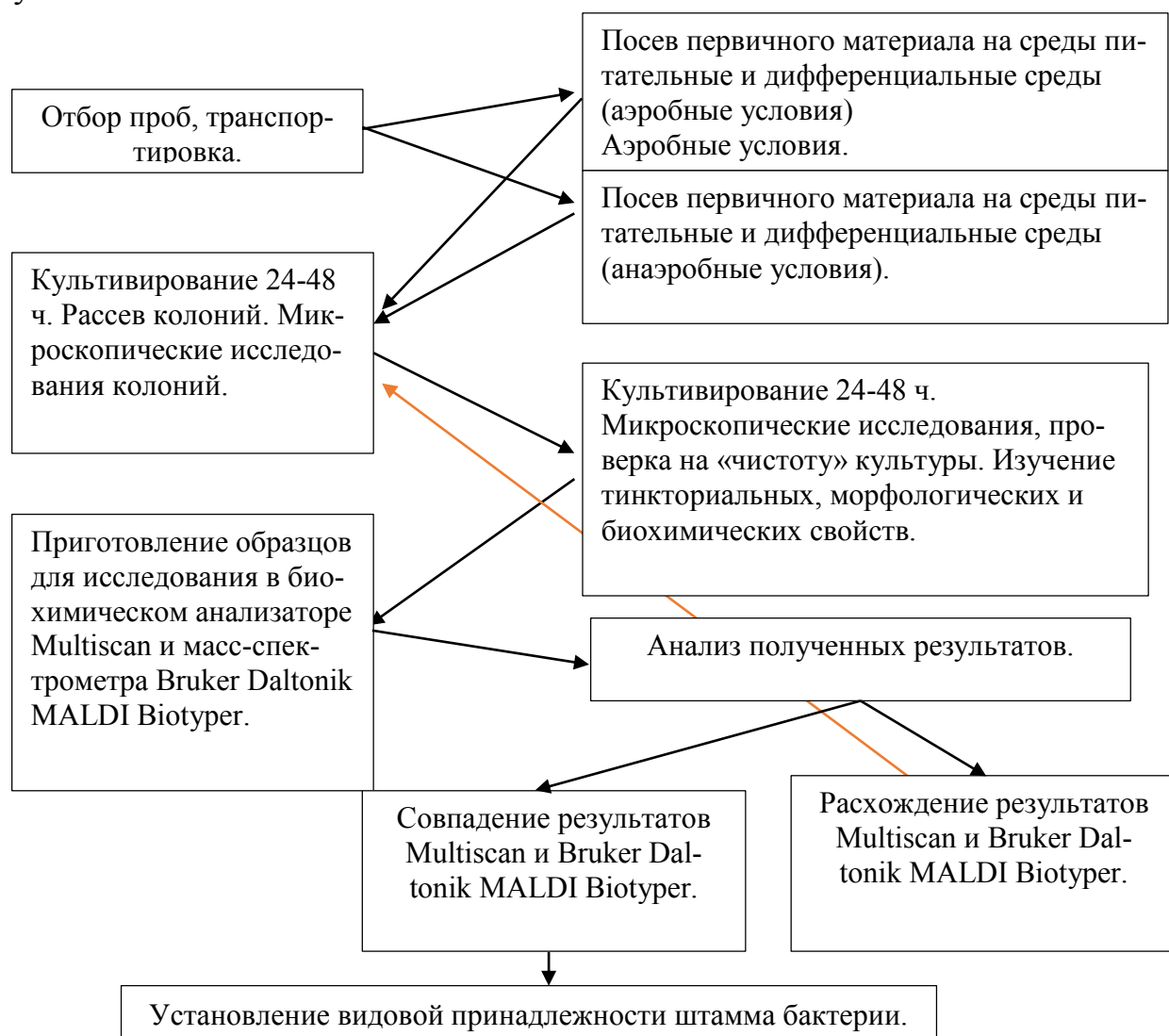


Рисунок 4 – Схема проведения бактериологических исследований

Выделение бактериофагов из объектов окружающей среды и образцов клинического и патологического материала проводили классическими методами по М. Адамсу [1] и Д.М. Гольдфарбу [6]. Отобранные образцы предварительно обогащали культурой вида бактерий, к которому производится поиск бактериофага. Подготавливали суточные культуры ранее выделенных и идентифицированных изолятов бактерий, после чего петлей вносили эти культуры в пробирки объемом 10 мл с 4,5 мл ГРМ-бульона, куда добавляли фильтрат в объеме 2 мл и инкубировали при 37 °С в течение 18-24 ч. Далее содержимое пробирки центрифугировали при 7000 об/мин. в течение 20 мин. и проводили каскадную фильтрацию через мембранные фильтры 1,2 мкм., 0,45 мкм. и 0,22 мкм. Индикацию фага проводили по методу агаровых слоев, предложенному Грациа в 1936 году [5]. При выявлении негативных пятен лизиса, изолировали выделенный бактериофаг для дальнейшего изучения его биологических свойств. С этой целью в две пробирки объемом 10 мл вносили 4,5 мл ГРМ-бульона, засеивали 0,05 см³ густой бактериальной взвесью и в одну пробирку добавляли полученный ранее фильтрат негативных колоний в объеме 0,1 мл, вторая пробирка служила контролем на рост бактерий. Пробирки сравнивали по мутности, из чего делали вывод о наличии искомого бактериофага. Для первичного отбора и селекции бактериофагов определяли их литическую активность по методу Аппельмана. В ряд из 10 пробирок одинакового диаметра с нейтральным стеклом заливали 4,5 мл бульона. В первую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого бактериофага, далее производили последовательные разведения, перенося микродозаторами с одноразовыми пипетками по 0,5 мл фага из предыдущей пробирки в последнюю, из последней пробирки после тщательного перемешивания изымаем 0,5 мл взвеси. Во все пробирки вносили по 1 капле суточной бульонной культуры, 11-ая пробирка – контроль без фага и 12-ая – контроль стерильности бульона.

Для изучения морфологии фагов необходимо использовать сконцентрированные и очищенные препараты изолированных бактериофагов. Очистку фаго-

вых образцов проводили центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия, для этого подготавливали растворы с различным процентным содержанием CsCl (50, 40, 30, 20, 10, 5). Затем проводили последовательное наслаивание растворов (от 50 до 5 в направлении от дна к мениску пробирки). Наслаивание осуществляли стерильной пастеровской пипеткой. Ступенчатость градиента плотности CsCl контролировали визуально. В этих манипуляциях перемешивание фракций с разных концентраций CsCl недопустимо. На последнюю фракцию (5 % CsCl) наслаивали фаговый образец. Пробирки после уравнивания помещали в ротор SW-28. Центрифугирование проводили на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter) в высокоскоростном режиме (27 тыс об/мин., 120 мин.). После центрифугирования содержимое пробирок фракционировали путем раскапывания.

Полученные очищенные образцы фагов исследовали на электронном микроскопе JEOL JEM-1011, используя методику негативного контрастирования. В работе использовались сетки с подложкой из коллодия. Препарат наносили на пленку-подложку и через 10 с. удаляли его излишки фильтровальной бумагой. Затем сетку с пленкой и препаратом помещали на каплю контрастера (1 % водный раствор уранилацетата). Через 10 с. контрастер удаляли фильтровальной бумагой. Визуализацию препарата проводили на электронном микроскопе с установленной камерой Erlangshen ES500W (Gatan). Морфометрию фагов проводили, анализируя 30-40 частиц для каждого вида бактериального вируса. В качестве маркеров был использован традиционный стандарт (хвостовой отросток фага T4, длина которого составляет 100 нм). Морфометрию бактериофагов производили по следующей методике. Готовили препараты на основе выделенных бактериофагов и фага T4, проводили их контрастирование по описанной выше методике, после чего измеряли структурные элементы разных бактериофагов в сравнении с стандартом T4 при одинаковом увеличении.

Масштабный коэффициент подсчитывали, используя известные размеры фага T4 и формулу:

$$m = \frac{L\phi}{L_n},$$

где m – масштабный коэффициент; $L\phi$ — размер элемента на фотографии, мм; L_n — натуральный размер элемента (длина хвоста фага Т4 $L_n = 100$ нм).

Так как рассматриваемые препараты фотографировались при одинаковой кратности увеличения, то масштабный коэффициент, полученный на препарате фага Т4, будет применим для расчета натуральных размеров исследуемого фага.

Скорость адсорбции бактериофагов определяли на основании исследования свободного не адсорбированного фага в системе «фаг-клетка». С этой целью бактериальную культуру до добавления бактериофага инкубировали и параллельно исследовали концентрацию бактерий. Бактериофаг добавляли в момент экспоненциальной фазы роста культур специфичных видов бактерий. Скорость адсорбции фага на поверхности клетки-хозяина исследовали по следующей методике. В качалочную колбу (800 мл) с 50 см^3 МПБ вносили бактериальную культуру, чувствительную к исследуемому фагу. Систему инкубировали на качалке в термостате при 37°C , 100 об/мин. Оптическую плотность суспензии (O.D. 600) контролировали на спектрофотометре Genesis 10S UV-Vis (Thermo Scientific). Показания спектрофотометра соотносили с градуировочным графиком. Отбирали 5 см^3 суспензии с титром клеток 10^9 КОЕ/ см^3 и вносили эту фракцию в новую качалочную колбу с 45 см^3 МПБ и с фагом. Конечный титр фага в системе составлял 10^6 БОЕ/ см^3 . Систему продолжали инкубировать в том же режиме. Через каждые 2 мин. собирали 1 см^3 суспензии из колбы и центрифугировали эту фракцию на центрифуге «Centrifuge 5424 (Eppendorf)» в течении 2 мин. при скорости вращения ротора 7 тыс. об/мин. Супернатант пропускали через фильтр (стерильный) с размерами пор 0,22 мкм. Фильтрат титровали для подсчета фаговых частиц, которые не адсорбировались на поверхности клеток. Показатель адсорбции выражали в виде константы скорости адсорбции мл/мин.

Единичный цикл размножения для каждой системы фаг-клетка исследовали для тестирования продолжительности латентного периода и выхода (урожайности) бактериального вируса. В пробирку вносили суспензию бактерий (10^9

КОЕ/см³ – конечная концентрация) и фильтрат фага (10⁷ БОЕ/см³ – конечный титр). Смесь инкубировали в течение 8 мин. при температуре 37° С. Затем суспензию центрифугировали в течение 2 мин. на центрифуге “Centrifuge 5424” (Eppendorf) при скорости вращения ротора 7 тыс. об/мин. Супернатант с неадсорбированными фагами удаляли, а осадок суспензировали в 100 мл МПБ. Отбирали 0,5 мл из полученной системы и титровали фракцию методом агаровых слоев. Затем суспензию инкубировали на качалке (37° С, 100 об/мин.). Через каждые 5 мин. отбирали аликвоты (0,5 мл) для дальнейшей титрации по Грациа. Эксперимент для каждой системы фаг-клетка продолжался 120 мин. По полученным данным строили график одиночного цикла размножения фага и оценивали латентный период и урожайность.

Концентрацию фаговых частиц в препаратах определяли титрацией по Грациа методом агаровых слоев. Степень литической активности бактериальных вирусов в жидких образцах оценивали методом Аппельмана [2].

Очистку фаговых препаратов осуществляли на основе методов центрифугирования и фильтрации. Первоначально суспензию центрифугировали в низкоскоростном режиме 7 тыс. об/мин. на протяжении 20 мин., далее центрифугировали в высокоскоростном режиме 20 тыс. об/мин. на протяжении 5 мин. Полученный супернатант отбирали и фильтровали последовательно через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 1,2 мкм., 0,45 мкм., 0,22 мкм., последнюю фильтрацию осуществляли стерильно.

Содержание белка в фаголизатах на различных этапах очистки определяли методом Лоури [76], содержание липополисахаридов (ЛПС) – спектрофотометрическим методом, описанным в работе Гриценко и коллег [31]. Степень очистки контролировали методом жидкостной хроматографии с использованием сефакирила S-200 (размеры колонки 1,5x70 см: длина волны 280 нм). В качестве маркеров использовали рибонуклеазу А (m.m.13,7 Kd), химотрипсиноген А (m.m.25 Kd), овальбумин (m.m.43 Kd).

В доклинических исследованиях нового средства на основе бактериофагов использовали экспериментальную серию, произведенную на базе НПЦ «Микро-Мир», а также опытно-промышленные серии (010317, 021017), произведенные на ООО «АВЗ С-П» для доклинических и клинических испытаний.

Для исследования литических спектров фагов использовали клинические изоляты бактерий, выделенные в ходе исследований бактериального состава содержимого маточных истечений.

При изучении возможного взаимодействия фагов с клетками нормофлоры влагалища коров применяли методики флуоресцентной микроскопии и флуориметрии.

Изучение эффективности сформированного коктейля бактериофагов *in vivo* проводили, моделируя экспериментальные инфекции, вызванные внутрибрюшинным заражением самок белых мышей 3-4 недельного возраста массой 18-21 г штаммами бактерий коллекции НПЦ «МикроМир» с известными дозами LD₅₀: *Trueperella pyogenes* 101/R, *Escherichia coli* ATCC 1271, *Enterococcus faecalis* 41, *Staphylococcus aureus* VRA 85, *Bacillus cereus* 354, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 327, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 678, в дозах 5 LD₅₀.

В исследованиях по изучению патогенности изолятов бактериальных культур биологическую концентрацию микробных клеток устанавливали при помощи метода наиболее вероятного числа – MPN (most probable number) [158].

Изучение закономерностей процессов репродукции бактериофагов и разработку оптимальных условий культивирования приводили в качалочных колбах методом глубинного культивирования.

Изучение стабильности препарата проводили методом «ускоренного старения» и по методу «долгосрочных испытаний» согласно ОФС.1.1.0009.15. [68]. С этой целью отбирали конечные формы препарата трех производственных серий, далее помещали образцы в термостат Binder BD-53 с температурным режимом +40 °С. Оптимальная температура хранения препаратов с бактериофагами

от +2 °С до +8 °С. Согласно рекомендациям, приведенным в ОФС.1.1.0009.15 сроки экспериментального хранения препарата определяют по формулам:

$$C = K * C_э,$$

где C – срок годности при температуре хранения (t_{xp}), связан с экспериментальным сроком годности $C_э$ при повышенной температуре экспериментального хранения ($t_э$) через коэффициент соответствия (K):

$$K = A^{\frac{t_э - t_{xp}}{10}},$$

где A – температурный коэффициент скорости химической реакции (принят равным 2,5).

Для изучения стабильности серий экспериментального средства по методу «долгосрочных испытаний» отбирали образцы двух производственных и одной экспериментальной для титрования по методу Грациа. На протяжении 12 месяцев образцы хранили в верхнем пороге (+ 8 °С) нормальных условий хранения. Каждые 3 месяца с момента начала эксперимента отбирали по 5 мл из образцов двух производственных партий (серия 010317, срок годности до 04.2018; серия 021017, срок годности до 11.2018, экспериментальная серия) для исследования титра. Исследования образцов проводили по всем 9 бактериофагам входящих в состав препарата «Ветагин».

Уровень содержания водородных ионов (показатель кислотности – pH) в конечном продукте определяли при помощи pH метра Hanna 211.

На всех этапах производства, как исходной биологической субстанции (фаголизаты), так и конечного средства, проводили контроль на стерильность путем посева из флаконов аликвот препарата на ВНИ-агар и среду Сабуро, к каждому посеву ставили отрицательный контроль. Чашки Петри с внесенными аликвотами инкубировали при +37 °С в течение 48 часов. Основным критерием определения стабильности для препаратов бактериофагов является сохранение титра бактериофагов, определяемых по методу Грациа.

При апробации препарата диагноз ставили комплексно, учитывая эпизоотическую ситуацию в хозяйстве и результаты клинического обследования с применением общих методов: визуальная диагностика внешних половых органов,

измерение температуры тела при помощи электронного термометра TOP TEMP ректальным способом, изучение характера истечений из матки и цервикальной слизи и специальных методов исследования: оценка состояния влагалищной части шейки матки с использованием влагалищного зеркала, проведение цитологических исследований смывов и соскобов с эндометрия по А.Н. Вяткину [22]. Кроме того, проводили ректальную пальпацию матки по методам, описанным А.П. Студенцовым [84]. Окончательный диагноз ставили на основании бактериологических исследований.

Апробацию экспериментального препарата проводили в хозяйствах Московской области: Сергиев-Посадского района – ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Озерецкое», ООО «Русмолоко» МТФ «Закубежье», СПА «Кузьминский» село Кузьмино, Раменского района – ООО «Колхоз Гжельский»; Пушкинского района – в ООО «Лесные Поляны» село Царево; а также в хозяйстве Нижегородской области Лысковского района – ОАО «Нива». Длительные наблюдения за животными, которые были профилактированы и пролечены новым коктейлем бактериофагов осуществляли на базе хозяйства ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»» МТФ «Озерецкое», на базе этого же хозяйства проводили I и II фазы клинических исследований.

Проведение клинических исследований (КИ), критерии включения и исключения коров из опытных групп, оценку эффективности применения нового коктейля бактериофагов проводили согласно «Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты) Часть вторая.» [77].

Для получения статистически достоверных данных о показателях профилактической эффективности средств, численный состав группы целевых объектов, получающих новое средство и получающих препарат сравнения (соответственно опытная и контрольная группа) определяли после проведения ретроспективного анализа заболеваемости эндометритом в хозяйствах, где планирова-

лось проведение клинических исследований. При этом для получения статистически достоверных результатов необходимо было исходить из минимально ожидаемой заболеваемости среди выборки, включенных в испытание.

Численный состав групп наблюдения (W) определяли по следующей формуле:

$$W = \frac{n3,84k(1+k)1000}{m(1-k)^2},$$

где n – число наблюдаемых групп; m – ожидаемая минимальная заболеваемость (на 1000); k – предполагаемый минимальный индекс эффективности, который может быть принят как существенный для данного препарата, т.е. во сколько раз предполагаемая заболеваемость среди обработанных препаратом будет ниже, чем среди не обработанных.

Особое внимание при оценке эффективности нового средства на основе бактериофагов уделяли животным первого полового цикла после проведения фагопрофилактики и фаготерапии, оценивая характер выделяемой слизи.

Исследования возможного выведения лечебно-профилактических бактериофагов с молоком при внутриматочном применении нового коктейля проводили на базе ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»» МТФ «Озерецкое». С этой целью отбирали образцы крови и молока от животных, получивших препарат с бактериофагами. Отобранные образцы исследовали на наличие бактериофагов путем высева супернатантов на тест-культуры бактерий видов *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus*, а также с использованием методов электронной микроскопии, описанных выше.

Исследования по изучению влияния внутриматочного введения препарата бактериофагов на количество соматических клеток в молоке проводили на базе ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Алферьево». Для подсчёта количества соматических клеток в цельном молоке использовали вискоизметрический аппарат «Соматос-мини».

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики и методами дисперсионного анализа, с расчетами доверительных интервалов и нормальности распределения при уровне значимости 0,05 и

использованием программного софта Excel 2016, а также используя онлайн расчет показателей нормальности распределения и средней ошибки показателей по исследуемой группе на интернет-ресурсе medstatistic.ru [62].

2.2.РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.3. Бактериологические исследования при послеродовых эндометритах у коров

На первом этапе исследований проводили изучение бактериального состава маточного содержимого, взятого от больных эндометритом коров. Для выполнения поставленной задачи было отобрано 160 образцов маточного содержимого у коров в молочно-товарном хозяйстве ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское», 20 образцов маточного содержимого в ООО «Колхоз Гжельский», 20 образцов маточного содержимого в ООО «Русмолоко» отделение Самотовино, МТФ «Закубежье», 20 образцов маточного содержимого в СПА «Кузьминский», 30 образцов маточного содержимого в ООО «Лесные Поляны» Московской области Пушкинского района, село Царево, 10 образцов маточного содержимого в ОАО «Нива» Нижегородской области Лысковского района.

Отбор образцов в хозяйствах производили при помощи катетеров ECS (Equine Culture Swab, without transport medium, см. рисунок 5), после чего пробы доставляли в лабораторию в течение 24 часов. Отбор образцов при помощи данного катетера минимизирует риск контаминации материала, однако, для большей информативности бактериологических исследований отобранные внутриматочные истечения вносили в угольные транспортные системы и питательную среду (ВНІ), см. рисунок 5. Для исследования получали маточное содержимое от коров, больных эндометритом, по принципу рандомизации. Так, в выборку входили первотелки и коровы, отелившиеся более одного раза, которые были больны разными формами и течениями эндометрита. Исследования провели в период ноябрь 2015 – апрель 2016. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Разнообразие биоценоза маточного содержимого больных разными формами эндометрита коров

п/п	Вид микроорганизма	МТФ «Озерное» (160 проб)		СПА «Кузьминский» (20 проб)		МТФ «Закубежье» (20 проб)		ООО «Колхоз Гжельский» (20 проб)		МТФ «Царево» (30 проб)		ОАО «Нива» (10 проб)		Общее кол-во выделенных изолятов
		n+	%	n+	%	n+	%	n+	%	n+	%	n+	%	
1	<i>Trueperella pyogenes</i>	119	74,4	8	40	14	70	17	85	26	86,6	6	60	184
2	<i>Escherichia coli</i>	125	78,1	10	50	9	45	10	50	18	60	5	50	176
3	<i>Proteus vulgaris</i>	75	46,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	46	28,7	6	30	4	20	-	-	9	30	4	40	69
5	<i>Aerococcus viridans</i>	39	24,3	11	55	-	-	-	-	14	46,6	-	-	64
6	<i>Corynebacterium xerosis</i>	16	10	-	-	-	-	4	20	17	56,6	-	-	36
7	<i>Bacillus licheniformis</i>	29	18,1	-	-	5	25	2	10	-	-	-	-	36
8	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	17	10,6	7	35	-	-	-	-	11	36,6	-	-	34
9	<i>Micrococcus luteus</i>	10	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
10	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	14	70	12	40	4	40	26
11	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6	3,7	-	-	-	-	-	-	19	63,3	-	-	25
12	<i>Bacteroides pyogenes</i>	14	8,7	-	-	4	20	6	30	-	-	-	-	24
13	<i>Streptococcus uberis</i>	16	10	-	-	-	-	8	40	-	-	-	-	24
14	<i>Porohyromonas levii</i>	15	9,3	-	-	-	-	7	35	-	-	-	-	22
15	<i>Prevotella heparinolytica</i>	17	10,6	-	-	-	-	-	-	-	-	4	40	21
16	<i>Clostridium cadaveris</i>	13	8,1	-	-	4	20	4	20	-	-	-	-	20
17	<i>Tissierella praeacuta</i>	9	5,6	-	-	3	15	4	20	-	-	-	-	20
18	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	15	9,3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	20	16
19	<i>Propionibacterium granulosum</i>	8	5	-	-	3	15	4	20	-	-	-	-	15

20	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	14	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
21	<i>Kocuria carniphila</i>	8	5	6	30	-	-	-	-	-	-	-	-	14
22	<i>Proteus mirabilis</i>	9	5,6	-	-	-	-	-	-	-	-	5	50	14
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	14	46,6	-	-	14
24	<i>Klebsiella oxytoca</i>	14	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
25	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	12	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
26	<i>Clostridium perfringers</i>	8	5	-	-	4	20	-	-	-	-	-	-	12
27	<i>Lactobacillus sp.</i>	7	4,3	-	-	-	-	2	10	-	-	3		12
28	<i>Paenibacillum glucanolyticus</i>	8	5	4	20	-	-	-	-	-	-	-	-	12
29	<i>Pichia fermentans</i>	12	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
30	<i>Staphylococcus hyicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	10	33,3	1	10	11
31	<i>Campylobacter sputorum</i>	8	5	-	-	-	-	-	-	-	-	2	20	10
32	<i>Facklamia hominis</i>	10	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-		10
33	<i>Pichia manshurica</i>	11	6,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
34	<i>Staphylococcus succinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	10	33,3	-	-	10
35	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	5	3,1	-	-	5	25	-	-	-	-	-	-	10
36	<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	9	30	-	-	9
37	<i>Bacillus thermoamylovoronas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	20	9
38	<i>Geotrichum silvicola</i>	-	-	8	40	-	-	-	-	-	-	-	-	8
39	<i>Globicatella sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	7	23,3	-	-	7

40	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	7	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
41	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	7
42	<i>Staphylococcus equorum</i>	7	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
43	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
44	<i>Staphylococcus carnosus</i>	-	-	6	30	-	-	-	-	-	-	-	-	6
45	<i>Staphylococcus codimenti</i>	6	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
46	<i>Enterococcus secorum</i>	5	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
47	<i>Issatchenkia orientalis</i>	-	-	5	25	-	-	-	-	-	-	-	-	5
48	<i>Kluyveromyces marxianis</i>	5	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
49	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	-	5	25	-	-	-	-	-	-	-	-	5
50	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
51	<i>Corynebacterium stationis</i>	4	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
52	<i>Odoribacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	4	13	-	-	4
53	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	2	10	-	-	-	-	-	-	2

Примечание: n+ – количество положительных

Скрининг и мониторинг микробиоты маточного содержимого у коров при послеродовом эндометрите позволил изолировать 1085 культур микроорганизмов. У всех выделенных изолятов удалось установить видовую принадлежность за исключением *Lactobacillus sp.* (12 изолятов), *Globicatella sp.* (7 изолятов), *Odoribacter sp.* (4 изолята). Идентифицированные до вида бактерии принадлежат к семействам: *Enterobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Staphylococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Micrococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Paenibacillaceae*, *Peptococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Campylobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterococcaceae*, *Odoribacteraceae*, *Dipodascaceae*. При бактериологических исследованиях также были выделены микроскопические грибы, представленные видами *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianis*, *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum silvicola*, *Pichia fermentans*, *Pichia manshurica*.

В таблице 2 представлено распределение выделенных микроорганизмов по семействам с учетом полученных данных по частоте встречаемости.

Таблица 2 – Систематизация выделенных штаммов по семействам

Семейство	Вид	Пвида	Побщее
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	176	314
	<i>Enterococcus faecalis</i>	69	
	<i>Proteus vulgaris</i>	38	
	<i>Proteus mirabilis</i>	14	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	13	
	<i>Citrobacter freundii</i>	4	
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria carniphila</i>	14	24
	<i>Micrococcus luteus</i>	10	
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	184	114
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus sp</i>	12	12
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Globicatella sp.</i>	7	90
	<i>Aerococcus viridans</i>	64	
	<i>Facklamia hominis</i>	10	
	<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	9	
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	12	12
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	26	71
	<i>Bacillus licheniformis</i>	36	
	<i>Bacillus thermoamylovoronas</i>	9	
<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella heparinolytica</i>	21	21

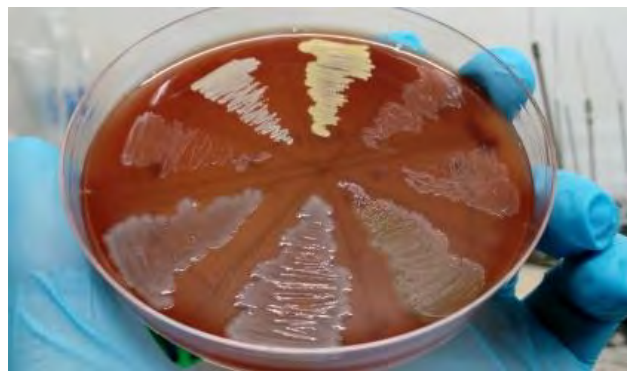
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	34	70
	<i>Streptococcus uberis</i>	24	
	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	10	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium stationis</i>	4	40
	<i>Corynebacterium xerosis</i>	36	
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>	15	15
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas levii</i>	22	22
<i>Peptococcaceae</i>	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	16	16
<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	14	14
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	11	84
	<i>Staphylococcus succinus</i>	10	
	<i>Staphylococcus equorum</i>	7	
	<i>Staphylococcus carnosus</i>	6	
	<i>Staphylococcus codimenti</i>	6	
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	5	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	25	
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides pyogenes</i>	24	24
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	12	32
	<i>Clostridium cadaveris</i>	20	
<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Tissierella praeacuta</i>	20	20
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	7	19
	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	12	
<i>Campylobacteriaceae</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>	10	10
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	7	7
<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Pichia manshurica</i>	10	26
	<i>Pichia fermentans</i>	11	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	5	
<i>Pichiaceae</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	5	5
<i>Trichomycetaceae</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	6
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus secorum</i>	5	5
<i>Odoribacteraceae</i>	<i>Odoribacter spp.</i>	4	4
<i>Dipodascaceae</i>	<i>Geotrichum silvicola</i>	8	8

Примечание: $n_{\text{вида}}$ – общее количество штаммов вида, $n_{\text{общее}}$ – общее количество штаммов представителей семейства

В большинстве случаев (86,9 %, 226 образцов) при бактериологических исследованиях маточного содержимого больных эндометритом коров идентифицировали ассоциации микроорганизмов (см. рисунок 5).



(А)



(Б)

Рисунок 5 – Ассоциативный рост микроорганизмов в образце маточного содержимого больной острым гнойно-катаральным эндометритом коровы № 2149 (МТФ «Озерцкое») на среде «Уриселект-4» – (А), полученные чистые линии изолятов разных видов бактерий на среде ВНИ-агар – (Б)

В 13,1 % при ярко выраженных клинических признаках эндометрита выделяли только один вид микроорганизмов. К таким видам относятся *Porphyromonas levii* (7 клинических случаев), *Trueperella pyogenes* (6 клинических случаев), *Fusobacterium necrophorum* (6 клинических случаев), *Staphylococcus haemolyticus* (6 клинических случаев), *Clostridium perfringers* (4 клинических случаев), *Staphylococcus aureus* (3 клинический случай), *Streptococcus agalactiae* (2 клинических случая).

В связи с большим видовым разнообразием биоценоза при эндометритах у коров необходимо было провести систематизацию и анализ полученных данных. Прежде всего перед нами стояла задача установить какие виды бактериальных агентов и в каких ассоциациях наиболее часто встречаются. Для анализа брали общее количество образцов за вычетом тех, в которых был обнаружен только один вид, т.е. для анализа ассоциативного действия количество образцов от больных эндометритом коров составило – 226. Результаты анализа распределения идентифицированных видов микроорганизмов по основным ассоциациям представлены ниже. Стоит отметить, что в большинстве случаев (86,9 %) бактериологических исследований мы идентифицировали более двух видов микроорганизмов в каждом образце. При анализе ассоциативного присутствия в патологическом материале, не учитывая виды бактерий, которые по литературным данным, а также по своим свойствам не представляли интерес как этиологический и

патогенетический элемент при эндометритах у коров. К таким видам бактерий отнесли *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus sp.*, *Propionibacterium granulosum*, *Tissierella praeacuta*, *Odoribacter spp.*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus codimenti*, *Staphylococcus chromogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovoronas*, *Kocuria carniphila*, *Enterococcus secorum*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillum glucanolyticus*, *Globicatella sp.*, *Aerococcus viridans*, *Facklamia hominis*, *Globicatella sulfidifaciens*.

Основные ассоциации микроорганизмов в образцах патологического материала в МТФ «Озерецкое» представлены на рисунке 6.

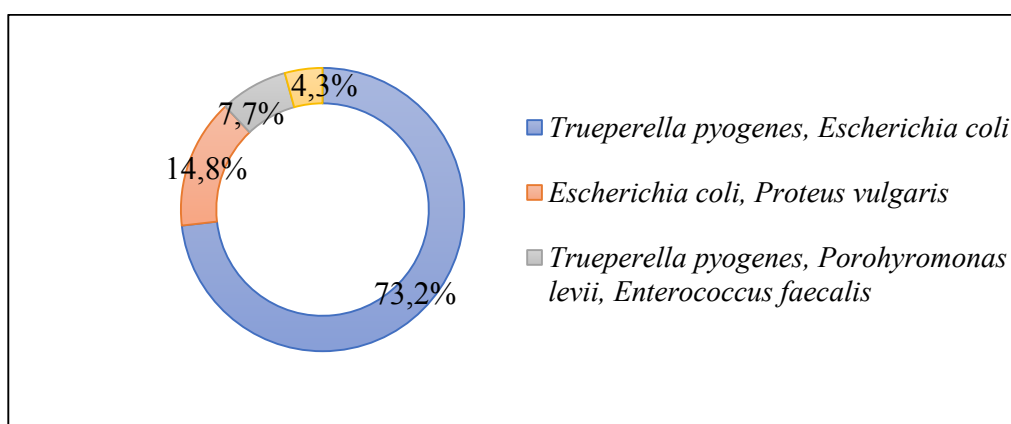


Рисунок 6 – Ассоциации микроорганизмов в пробах патологического материала от больных эндометритов коров в МТФ «Озерецкое»

Доминирующим элементом ассоциаций при послеродовых эндометритах у коров на МТФ «Озерецкое» включает виды бактерий *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, совместное присутствие данных видов бактерий в образцах отмечали в 73,24 % (104) случаев от всех заболевших (142). Две ассоциации представлены *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* 14,78 % (21 образец) и *Trueperella pyogenes*, *Porphyromonas levii*, *Enterococcus faecalis* 7,74 % (11 образцов), в которых были равномерно распределены другие выделенные микроорганизмы. Только в 14 % (20) из 142 образцов, случаев заболевания не присутствовали бактерии видов *Escherichia coli* и *Trueperella pyogenes*.

Основные ассоциации микроорганизмов в образцах патологического материала в МТФ «Колхоз Гжельский» представлены на рисунке 7.

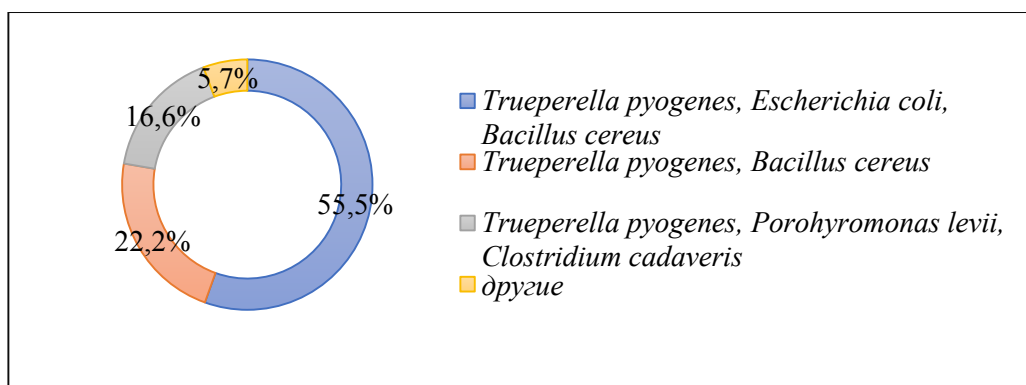


Рисунок 7 – Ассоциации микроорганизмов в пробах патологического материала от больных эндометритов коров в «Колхоз Гжельский»

Доминирующие ассоциации микроорганизмов в «Колхоз Гжельский» представлены: *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* – 55,5 %, *T. pyogenes*, *Bacillus cereus* – 22,2 %, *Trueperella pyogenes*, *Porphyromonas levii*, *Clostridium cadaveris* – 16,6 %.

Остальные микроорганизмы, выделенные и идентифицированные от больных коров, встречаются в малой инцидентности с равномерным распределением в представленных ассоциациях, что позволяет предполагать об их малой значимости в развитии болезни.

В результате исследований, из двух доминирующих видов преобладает *Trueperella pyogenes*. На фоне распространенности выделенных видов бактерий, можно отметить особенность вида *Bacillus cereus*, проявляющуюся в том, что данный вид в ЗАО «Колхоз Гжельский» встречается в одной ассоциации с *Trueperella pyogenes* с *Escherichia coli*, доля которой составляет 55,5 % от всех исследованных проб.

Ассоциации микроорганизмов маточного содержимого больных коров в СПА «Кузьминский» представлены *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli* и плесневым грибом *Geotrichum silvicola*. Стоит отметить, что в условиях СПА «Кузьминский» при бактериологическом исследовании патологического материала от коров больных острыми формами эндометритов, мы идентифицировали микроорганизмы в двух вариациях ассоциативного присутствия. Было отмечено, что грибная флора, представленная видом *Geotrichum silvicola* присутствовала в 70

% образцов с равным распределением между двумя представленными ассоциациями.

Основные ассоциации микроорганизмов в образцах патологического материала в СПА «Кузьминский» представлены на рисунке 8.

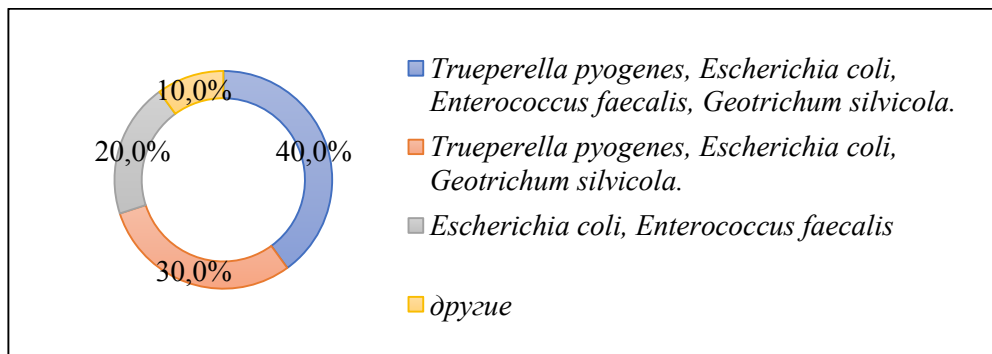


Рисунок 8 – Ассоциации микроорганизмов в пробах патологического материала от больных эндометритов коров в СПА «Кузьминский»

В 86 % случаев в образцах маточного содержимого больных коров в условиях МТФ «Царево» идентифицировали *Trueperella pyogenes*. Данный вид бактерий также присутствует во всех ассоциациях из патологического материала данного хозяйства, что косвенно свидетельствует об его предопределяющей роли в возникновении и развитии гнойно-катаральных и гнойных эндометритов в данном хозяйстве. Также, анализ представленных данных на рисунке 9 показывает, что виды *Staphylococcus haemolyticus*, *Bacillus cereus* в условиях этого хозяйства могут участвовать в развитии заболевания.

Основные ассоциации микроорганизмов в образцах патологического материала в МТФ «Царево» представлены на рисунке 9.

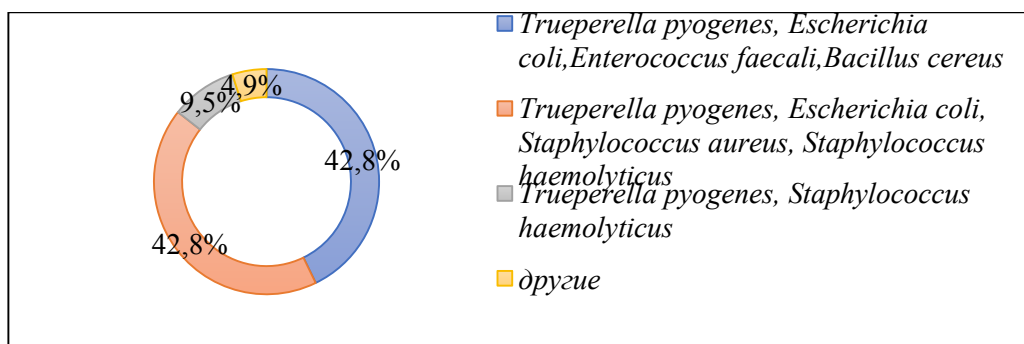


Рисунок 9 – Ассоциации микроорганизмов в пробах патологического материала от больных эндометритов коров в МТФ «Царево»

Основные ассоциации микроорганизмов в образцах патологического материала в МТФ «НИВА» представлены на рисунке 10.

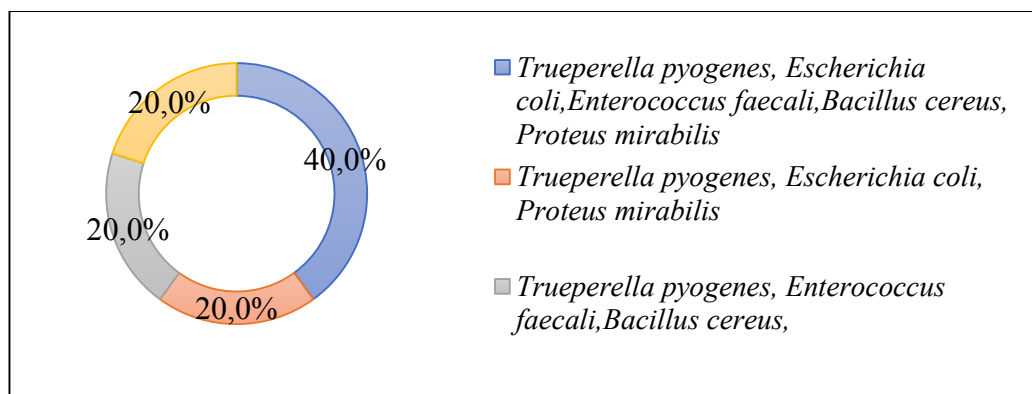


Рисунок 10 – Ассоциации микроорганизмов в пробах патологического материала от больных эндометритов коров в МТФ «НИВА»

В условиях ОАО «НИВА» доминирующими видами по инцидентности были *Trueperella pyogenes* и *Escherichia coli*, однако при этом, особенностью в отличие от других хозяйств, идентификации двух превалирующих видов является то, что ассоциативно данные два вида встречались лишь в 60 % от числа всех образцов патологического материала, отобранных из данной фермы. Также в данном хозяйстве было отмечено ярко выраженное ассоциативное действие *Bacillus cereus* и *Trueperella pyogenes*.

Основные ассоциации микроорганизмов в образцах патологического материала в МТФ «Закубежье» представлены на рисунке 11.

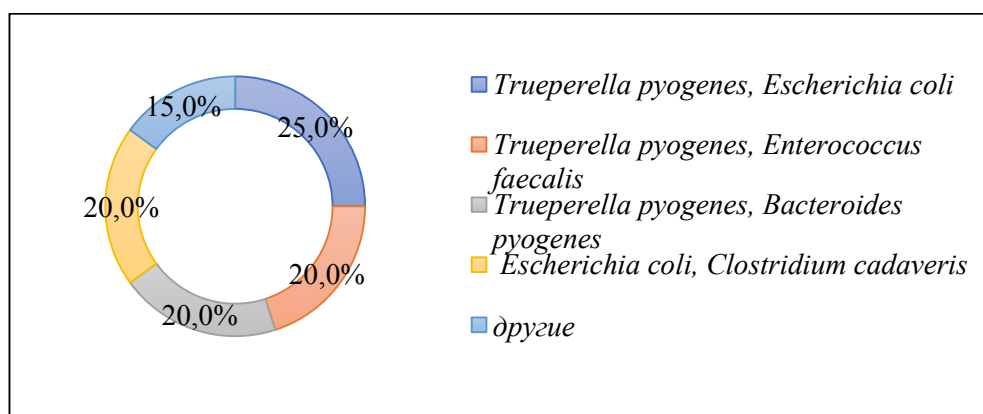


Рисунок 11 – Ассоциации микроорганизмов в пробах патологического материала от больных эндометритов коров в МТФ «Закубежье»

Выделенные микроорганизмы, которые не указаны в ассоциациях, в равных количествах распределены в ассоциациях с доминирующими микроорганизмами, описанными выше.

Сопоставительный и сравнительный анализ данных бактериологического мониторинга биоценоза маточного содержимого больных коров с клинической картиной и ассоциативным действием микроорганизмов, показывает, что необходимо провести изучение патогенных свойств изолятов *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aureginosa*. Также исходя из результатов, проведение исследования патогенности требуется для изолятов тех видов бактерий, которые выделяли в монокультуре без сопровождения другими микроорганизмами. В монокультуре выделяли – *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas levii*, *Clostridium perfringers*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*.

2.4. Патогенность микроорганизмов, изолированных при эндометритах у коров

Патогенность идентифицированных штаммов устанавливали на основании биохимических свойств культур (коагулазная активность), определённых при помощи тестовых наборов производства компании Lahema (см. рисунок 12), гемолитических свойств на среде ВНІ-агар с добавлением дефибринированной

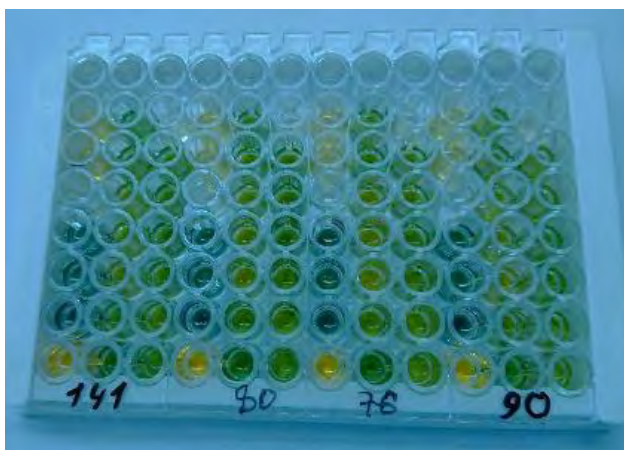


Рисунок 12 – Микропланшеты тест системы АЭРО-тест (Lahema) по определению сахаролитических свойств, заполненные штаммами *E. coli*

крови барана, изучения лецитиназной и липазной активности на желточном агаре, тестов на определение каталазной активности.

При определении патогенных свойств выделенных стафилококков использовали тест по определению коагулазной активности. При определении лецитиназной активности использовали положительный контроль на *Bacillus Cereus* ATCC 14579, на липазу – *Fusobacterium necrophoum* ATCC 25286, для постановки отрицательного контроля использовали *Escherichia coli* ATCC 25922.

Результаты исследований по выявлению гемолитических свойств, лецитиназной, каталазной и коагулазной активности изолятов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Патогенные свойства выделенных штаммов бактерий

Вид бактерий	Кол-во исследованных штаммов	Гемолитические свойства						Ферментативная активность					
		β-гемолиза		α-гемолиз		γ-гемолиз		Лецитиназа		Коагулаза		Каталаза	
		n+	n%	n+	n%	n+	n%	n+	n%	n+	n%	n+	n%
<i>Trueperella pyogenes</i>	150	115	76,7	19	12,7	16	10,7	2	1,3	н	н	24	16,0
<i>Escherichia coli</i>	150	79	52,7	18	12,0	53	35,3	0	0,0	н	н	19	12,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	40	21	52,5	7	17,5	12	30,0	0	0,0	н	н	0	0,0
<i>Proteus vulgaris</i>	60	11	18,3	16	26,7	33	55,0	0	0,0	н	н	0	0,0
<i>Bacillus cereus</i>	20	19	95,0	1	5,0	0	0,0	10	50,0	н	н	0	0,0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	20	20	100,0	0	0,0	0	0,0	17	85,0	5	25	6	30,0
<i>Porphyromonas levii</i>	20	9	45,0	1	5,0	10	50,0	0	0,0	н	н	0	0,0
<i>Clostridium perfringens</i>	12	1	8,3	6	50,0	5	41,7	5	41,7	н	н	0	0,0
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	10	3	30,0	0	0,0	7	70,0	0	0,0	н	н	0	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	2	20,0	1	10,0	8	80,0	3	30,0	8	80	6	60,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	2	28,6	1	14,3	4	57,1	1	10,0	н	н	0	0,0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	2	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	2	0	0,0

Примечание: n₊ – количество положительных проб, n% – процент положительных проб от общего числа исследованных штаммов данного вида, н – не исследовали

Анализ данных, представленных данных в таблице 3, показывает, что большая часть штаммов *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus* и два штамма *Streptococcus agalactiae* вызывают β -гемолиз эритроцитов. Большая часть штаммов *Staphylococcus aureus* обладают коагулазной (80 %) и каталазной (60 %) активностью, что свидетельствует об их агрессивности по отношению к защитным механизмам макроорганизма. Стоит отметить, что 17 из 20 выделенных штаммов (85 %) *Staphylococcus haemolyticus* обладали лецитиназной активностью, что также говорит об их патогенности. Таким образом мы определили наиболее агрессивные штаммы бактерий для дальнейшего изучения их свойств *in vivo*.

На следующем этапе нашей работы мы провели сопоставление полученных данных с масс-спектрами выделенных изолятов и установили принадлежность выделенных культур к циркулирующим штаммам. В результате проведенного анализа нами были отобраны целевые изоляты для изучения их патогенности методом биопробы (см. таблицу 4).

Таблица 4 – Принадлежность идентифицированных изолятов к оригинальным штаммам циркулирующих бактерий на молочных комплексах, выделенных при эндометритах у коров

Вид бактерии	«Озерецкое»	«Кузьминский»	«Закубежье»	«Колхоз Гжельский	«Царево»	«Нива»	Всего
<i>Trueperella pyogenes</i>	12	2	3	5	5	1	28
<i>Escherichia coli</i>	8	3	3	2	4	1	21
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1	1	-	1	1	9
<i>Proteus vulgaris</i>	7	-	-	-	-	-	7
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	4	3	7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	-	-	-	-	4	5
<i>Porphyromonas levii</i>	3	-	1	-	-	-	4
<i>Clostridium perfringers</i>	2	-	1	-	-	-	3
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2	-	-	-	-	-	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	4	-	4

<i>Pseudomonas aureginosa</i>	-	-	-	1	-	-	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	2	-	-	-	2

На следующем этапе работы перед нами стояла задача по изучению патогенности *in vivo* у штаммов бактерий. С этой целью мы использовали белых мышей аутбредной породы ICR с нелинейным геномом массой 18-20 г. Для каждого из обозначенных штаммов бактериальных культур *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae* использовали по 4 мыши. Суточные культуры микроорганизмов вводили внутривенно в дозах, начиная с 2 млн. мкр. кл. Если гибели подопытных мышей не происходило, то следующую дозу увеличивали в 4 раза, по данной методике проводили исследования до инфицирующей дозы 2 млрд. мкр. кл., в случае гибели хотя бы одной мыши считали штамм патогенным и способным вызывать или поддерживать течение эндометрита. Содержание и жизнеспособность бактериальных клеток в суспензиях, использованных для заражения мышей, определяли по методу MPN-most probable number (метод предельных разведений). За животными проводили наблюдение в течение 10 дней. Если подопытные умирали в течение нескольких часов после введения инфицирующей дозы, считали, что гибель мышей спровоцирована токсинами, а не инфекционным процессом на фоне введенного штамма. Результаты исследования патогенности штаммов представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Патогенность циркулирующих штаммов

Вид бактерий	Кол-во исследованных штаммов	Доза (млн. мкр. кл.)					
		2	8	32	128	512	2000
		n+					
<i>Trueperella pyogenes</i>	28	0	1	12	4	2	0
<i>Escherichia coli</i>	21	1	2	5	4	1	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	0	0	1	3	1	0
<i>Proteus vulgaris</i>	7	0	0	0	1	1	3
<i>Bacillus cereus</i>	7	0	0	2	1	1	1

<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	0	0	1	3	1	-
<i>Porphyromonas levii</i>	4	0	0	0	2	2	-
<i>Clostridium perfringers</i>	3	0	1	2	-	-	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2	0	0	0	2	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	0	0	2	-	-	-
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	1	0	1	-	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0	1	1	-	-	-

Примечание: n_+ – количество штаммов, вызвавших гибель хотя бы одной из подопытных мышей

Как видно из данных таблицы 5, патогенными свойствами обладали от 55 до 100 % отобранных штаммов, при этом стоит отметить, все штаммы *Fusobacterium necrophorum* (2 штамма), *Streptococcus agalactiae* (2 штамма), вызывали гибель всех 4 мышей при введении доз 128 и 8-32 млн. мкр. кл. соответственно. Также единственный полученный нами штамм *Pseudomonas aureginosa* вызывал гибель всех 4 мышей при инфицирующей дозе 8 млн. мкр. кл.

На основании сопоставительного анализа инцидентности, ассоциативного действия, изучения патогенности мы определили наиболее значимые виды бактерий, участвующие в этиопатогенезе эндометритов у коров: *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Porphyromonas levii*, *Clostridium perfringers*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae*.

2.5. Изучение возможности применения готового средства на основе бактериофагов для профилактики и лечения эндометритов у коров

Следующим этапом нашей работы было изучение возможности применения фаговых препаратов для профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров на основе готовых форм. Из предложенных на отечественном рынке препаратов на основе бактериофагов (производства компаний ООО НПЦ «МикроМир» и АО НПО «Микроген») наиболее подходящий по составу к определенным нами этиологически значимым видам бактерий был определен препарат «Фагогин» компании ООО НПЦ «МикроМир», состав которого включает бактериофаги к *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus spp.*, *Pseudo-*

monas aeruginosa, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Campylobacter spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Enterobacter spp.*, *Prevotella spp.*, т.е. к бактериям-участникам дисбактериальных отклонений в интимной сфере у людей. Бактериофаги в составе препарата «Фагогин» в большинстве гомологичны к видам бактерий, определённых нами как этиопатогенные при послеродовых эндометритах у коров.

Перед использованием данного средства мы изучали его литический спектр на актуальных изолятах, выделенных от больных коров в процессе бактериологического мониторинга. Средство «Фагогин» представлено в гелевой форме, что, в свою очередь, необходимо учесть при проведении исследования на чувствительность изолятов к гомологичным бактериофагам, входящим в его состав. Чтобы извлечь из взвеси геля бактериофаги, входящие в состав препарата, гель растирали при помощи одноразового пластикового шпателя Дригальского и отстаивали в течение 30 мин., далее центрифугировали при 5000 об/мин. в течение 10 мин., далее производили фильтрацию при помощи одноразовых фильтров с диаметром пор 1,2 мкм. Полученный фильтрат использовали в проведении спот-тестов по определению спектров литического действия бактериофагов средства «Фагогин». Для определения литического спектра бактериофагов использовали штаммы, определённые нами как этиопатогенные при бактериологических исследованиях биоценозов маточного содержимого больных эндометритом коров. При этом, также в исследования включали изоляты, которые были объединены нами на основании масс-спектров и биохимических свойств в группы (один или несколько штаммов) при изучении патогенности на лабораторных объектах, т.к. без серологических и геномных методов идентификации утверждать, что большое число идентифицированных изолятов вида бактерии являются одним или несколькими штаммами некорректно.

Результаты исследований литического спектра активности бактериофагов из гелевого средства «Фагогин» представлены таблице 6.

Таблица 6 – Литический спектр препарата «Фагогин»

п/п	Бактерия-мишень	Количество штаммов	Кол-во чувствительных изолятов	
			факт.	%
1	<i>Escherichia coli</i>	50	27	54
2	<i>Proteus vulgaris</i>	20	11	55
3	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	15	8	53
4	<i>Bacteroides pyogenes</i>	15	9	60
5	<i>Streptococcus uberis</i>	10	6	60
6	<i>Prevotella heparinolytica</i>	10	4	40
7	<i>Proteus mirabilis</i>	10	5	50
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	7	70
9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	7	70
10	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	10	5	50
11	<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	4	40

Из представленных в таблице 6 данных, делаем вывод, что литический спектр бактериофагов в препарате «Фагогин» находится на уровне 40 – 70 %, в зависимости от клетки хозяина.

Эксперименты по изучению возможности применения препарата «Фагогин» как готовой формы средства на основе бактериофагов, гомологичных к актуальным изолятам, проводили в ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Озерецкое». При ретроспективном анализе показателей заболеваемости после родовыми эндометритами в данном хозяйстве установили, что у новотельных коров чаще всего проявляются клинические признаки гнойно-катарального эндометрита в первые 3 недели после отела, уровень заболеваемости составляет 40-50 % в зависимости от времени года. Так, в зимне-весенний период (период массового отела) заболеваемость выше и находится на уровне 50 %. Именно этот период был выбран для проведения экспериментов.

Изначально проверку эффективности препарата проводили на новотельных коровах с профилактической схемой обработки. С этой целью коровам, отел которых прошел без вмешательства ветеринарного врача и клинический статус животного был удовлетворительным, вводили препарат «Фагогин» по 30 мл дважды с интервалом 5 дней, а также для профилактики субинволюции матки применяли препарат «Утеротон» по 10 мл 3 дня внутримышечно. Первое введение

препарата «Фагогин» осуществляли через 12-48 часов после отела, внутриматочно, используя пластиковый одноразовый катетер для искусственного осеменения и шприц Жанэ. В результате была сформирована опытная группа коров с количеством животных 19. Введение бактериофагов в первые 5 дней после отёла обусловлено тем, что в эти дни шейка матки открыта, и данный период наиболее благоприятный для развития условно-патогенных бактерий, способных вызвать оппортунистические инфекции мочеполовых путей.

Для объективной оценки эффективности проводили исследования в опытной группе сравнения (№ 2) с аналогичным количеством подопытных животных. Схема опытной группы сравнения включала:

1. «Кетоджект»: по 20 мл 3 дня внутримышечно;
2. «Цефтиосан»: по 10 мл 3 дня внутримышечно;
3. «Утеротон»: по 10 мл 3 дня внутримышечно;

Схема базировалась на применении антибиотика β -лактамной группы («Цефтиосан»), нестероидного противовоспалительного средства на основе кетопрофена («Кетоджект») и сокращающего гладкую мускулатуру β -адренолитика («Утеротон»). Наблюдение за животными проводили 30 дней, проводя обще клиническую и гинекологическую диспансеризацию. Основными критериями для оценки терапевтической эффективности считали отсутствие клинических признаков воспаления матки на протяжении 30 дней: флюктуации, ригидности, патологического расширения шейки матки, устанавливаемые при ректальном исследовании на 14 и 30 сутки после отела.

Результаты апробации препарата «Фагогин» указаны в таблице 7.

Таблица 7 – Эффективность схемы с применением препарата «Фагогин»

Группа	Кол-во животных в группе	Кол-во заболевших		Эффективность схем профилактики, %
		фактическое	%	
№ 1 (схема с препаратом «Фагогин»)	19	2	10,5	89,5
№ 2 (схема хозяйства)	19	9	47,4	52,6

Примечание: разница статистически достоверна при $\alpha = 0,05$

Несмотря на комплексную схему профилактики в опытной группе № 2 с использованием современных антибактериальных и противовоспалительных препаратов, показатели ее эффективности заметно уступают результатам в опытной группе № 1. Так, только у 9 коров из 19 (47,4 %) отмечали здоровье половых органов и отсутствие патологий при ректальном обследовании. В 2 случаях (10,5 %) фиксировали незначительную степень проявления признаков поражения эндометрия, что, тем не менее, требовало дополнительного лечения. В 7 случаях (36,8 %) диагностировали эндометрит.

Полученные данные показали, что эффективность профилактического применения препарата «Фагогин» с целью предупреждения послеродовых эндометритов у коров достаточно выражена и составила 89,5 %, тогда как комплексная схема с антибиотиками в контрольной группе эффективна на 52,6 %. Однако при дальнейшей апробации на большей выборке коров, которым применяли препарат «Фагогин» для профилактики, и на группе по лечению гнойно-катаральных эндометритов, препарат показал эффективность на уровне 50 % и ниже, что было, на наш взгляд, обусловлено отсутствием в составе препарата гомологичных бактериофагов к одному из ключевых видов бактерий, определенными нами как патогенные и участвующие в развитии эндометритов у коров – *Trueperella pyogenes*. Кроме того, данные исследования показали, что литический спектр препарата «Фагогин» на ветеринарных изолятах не достаточен для получения стабильно высокой эффективности от действия препарата.

Таким образом, поиск бактериофагов специфичных к этиологически значимым и играющим роль в патогенезе видам бактерий, определенным ранее в наших исследованиях актуален.

2.6. Разработка средства на основе бактериофагов для профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров

На данном этапе выполнения работ стало очевидно, что необходимо создать средство с новым составом, новый коктейль бактериофагов, который будет

активен в отношении актуальных видов бактерий при послеродовых эндометритах у коров. С этой целью были проведены дополнительные исследования по поиску фагов-кандидатов.

2.6.1. Выделение, отбор, селекционирование вирулентных бактериофагов

Для индикации бактериофагов отбирали образцы сточных вод хозяйств (52), клинического и патологического материала (39), воды ближайших к скотоводческим комплексам рек и озер (15), земли с пастбищ (19), навоза (17), поиск бактериофагов осуществляли по методу обогащения, предложенным Адамсом, а также Гольдфарбом. Изучение литической активности проводили по методу Апфельмана, морфологию пятен негативных зон роста и титр бактериофагов в пробах изучали по методу Грациа [2, 23].

В результате проведенной работы были выделены 39 штаммов бактериофагов, из них 15 с литической активностью не менее 10^{-7} по Апфельману. Посредством проведения первых исследований были отобраны бактериофаги-претенденты для дальнейшего их изучения. Таким образом, проведенные исследования позволили отобрать бактериофаги-претенденты для внесения в состав коктейля (см. таблицу 8).

Таблица 8 – Бактериофаги-претенденты для внесения в состав коктейля

Штамм бактериофага	Литическая активность	Специфичность фага	Источник выделения
Ph. Tr. pyogenes 2	10^{-7}	<i>Trueperella pyogenes</i>	сточные воды МТФ «Озерецкое»
vB-EcM-04	10^{-9}	<i>Escherichia coli</i>	сточные воды г. Пущино, Московской области
vB-EfS-027	10^{-8}	<i>Enterococcus faecalis</i>	сточные воды фермы «Лесные Поляны»
vB-PvS-22	10^{-9}	<i>Proteus vulgaris</i>	сточные воды, Московская область
Ph. B. cereus F	10^{-7}	<i>Bacillus cereus</i>	земля с пастбища ООО «Колхоз Гжельский»
Ph. S haemolyticus 9	10^{-7}	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	сточные воды, Московская область
vB-SaM-9,1	10^{-8}	<i>Staphylococcus aureus</i>	гнойный экссудат из абсцесса МТФ «Озерецкое»
vB-PaP-20	10^{-9}	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	сточные воды, Московская область

vB-SpM-293	10 ⁻⁸	<i>Streptococcus agalactiae</i>	гнойный экссудат от больной эндометритом коровы
------------	------------------	---------------------------------	---

Все выделенные бактериофаги к *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringers* не обладали достаточным уровнем литической активности для включения их в состав нового средства, поиски литически активных и вирулентных бактериофагов к данным видам микроорганизмов продолжаются.

Следующим этапом нашей работы было определение литического спектра выделенных бактериофагов-претендентов, для выполнения поставленной задачи отобраны изоляты бактерий ранее выделенные при бактериологических исследованиях и определенные нами как этиопатогенные при эндометритах у коров. Литический спектр бактериофагов-претендентов представлен в таблице 9.

Таблица 9 – Литический спектр производственно-перспективных бактериофагов

Бактериофаг	Исследования литического спектра		Кол-во чувствительных изолятов	
	Клетка мишень	Кол-во штаммов	факт.	процен.
Ph. T. pyogenes 2	<i>Trueperella pyogenes</i>	50	47	94
vB-EcM-04	<i>Escherichia coli</i>	50	44	88
vB-EfS-027	<i>Enterococcus faecalis</i>	30	26	86,7
vB-PvS-22	<i>Proteus vulgaris</i>	20	18	90
Ph. B. cereus F	<i>Bacillus cereus</i>	20	19	95
Ph. S haemolyticus 9	<i>Staphylococcus. haemolyticus</i>	20	15	75
vB-SaM-9,1	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	9	90
vB-PaP-20	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	10	9	90
vB-StraM-264	<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	8	80

Как видно из данных, представленных в таблице 9, выделенные бактериофаги обладают широким спектром литической активности, вызывают лизис бактериальных специфичных культур в диапазоне 80-95 %, что позволяет судить об их высокой вирулентности и широком спектре литического действия.

2.6.2. Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов.

Проведенный комплекс исследований морфологической структуры и параметров инфекционного процесса в системах «фаг-клетка» позволил охарактер-

ризовать выделенные бактериофаги для их паспортизации, за исключением бактериофага Ph. Tr. pyogenes 2.

Полученные результаты изучения биологических свойств выделенных бактериофагов представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристики выделенных бактериофагов

Фаг	Клетка-хозяин	Морфотип фага	Семейство фага	Параметры инфекционного процесса в системах фаг-клетка		
				константа скорости адсорции, мл/мин.	латентный период, мин.	урожаи-ность част/кл
Ph. Tr. pyogenes 2	<i>Trueperella pyogenes</i>	A1	<i>Myoviridae</i>	$0,3 \times 10^{-11}$	35	40
vB-EcM-04	<i>Escherichia coli</i>	A2	<i>Myoviridae</i>	$12,5 \times 10^{-11}$	30	280
vB-EfS-027	<i>Enterococcus faecalis</i>	B2	<i>Siphoviridae</i>	$3,2 \times 10^{-11}$	28	120
vB-PvS-22	<i>Proteus vulgaris</i>	B1	<i>Siphoviridae</i>	$1,3 \times 10^{-11}$	36	210
Ph. B. cereus F	<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Myoviridae</i>	$1,9 \times 10^{-10}$	60	170
Ph. S haemolyticus 9	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	A1	<i>Myoviridae</i>	$0,9 \times 10^{-11}$	45	90
vB-SaM-9,1	<i>Staphylococcus aureus</i>	A1	<i>Myoviridae</i>	$0,5 \times 10^{-11}$	27	80
vB-PaP-20	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	C1	<i>Podoviridae</i>	$7,1 \times 10^{-11}$	40	180
vB-StraM-264	<i>Streptococcus agalactiae</i>	B1	<i>Myoviridae</i>	$0,7 \times 10^{-11}$	34	100

Биологические свойства бактериофагов, представленных в таблице 10, позволили приступить к отработке методик культивирования бактериофагов-претендентов. Изучение морфометрических показателей бактериофагов-претендентов приведены ниже.

Бактериофаг Ph. Tr. pyogenes 2

Бактериофаг находится на стадии паспортизации и изучения морфометрических свойств. При наработке бактериофага Ph. Tr. pyogenes 2 не удается получить высокий титр в фаголизате, в результате чего изучение морфометрических свойств фаговых частиц по описанной методике затруднительно. Однако полученные изображения фага на первичных фотографиях позволяют предположить, что он относится к семейству *Myoviridae* A1.

Бактериофаг vB-EcM-04

Морфотип бактериофага – несколько вытянутая головка (110x76 нм) и сокращающийся хвостовой отросток со средней длиной 110 нм.

Аппарат адсорбции – базальная пластика и 6 хвостовых фибрилл. Бактериофаг vB-EcM-04 следует отнести к порядку Caudovirales и семейству Myoviridae (морфотип A2). Этот бактериальный вирус – представитель группы T4-подобных фагов (см. рисунок 13).

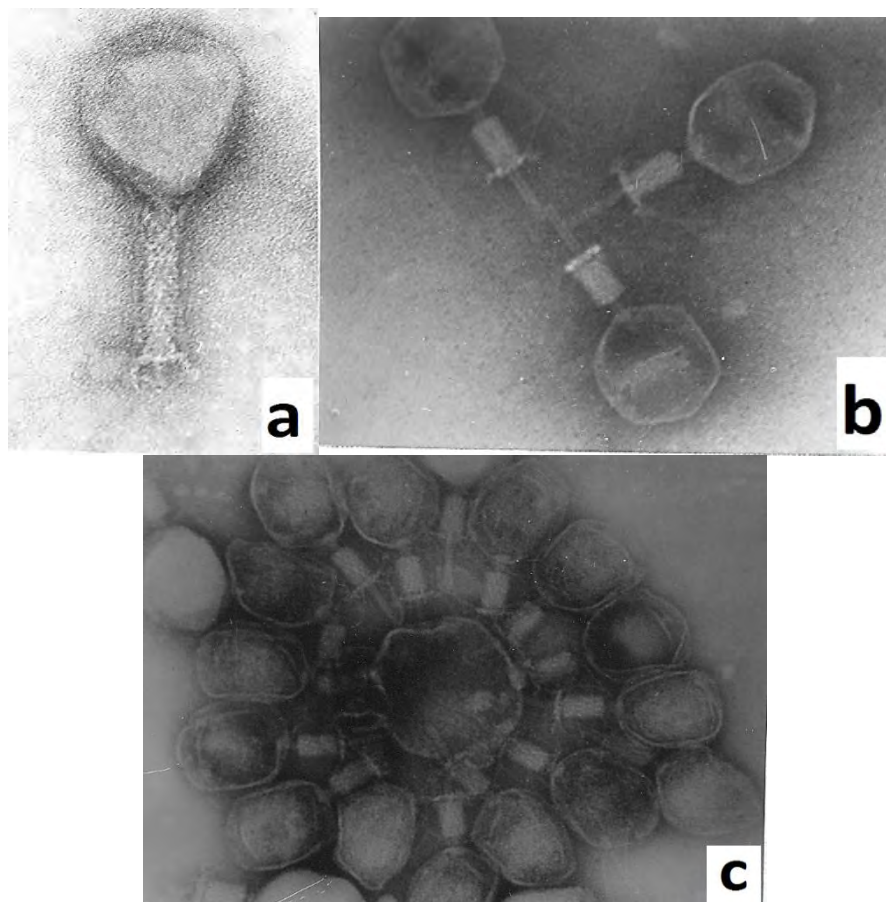


Рисунок 13 – Электронные микрофотографии бактериофага vB-EcM-04; а – интактная частица; б – частицы с пустыми головками и сокращенными хвостовыми отростками; с – фаги адсорбированы на липосоме *E. coli*. (увеличение 500000 раз)

Бактериофаг vB-EfS-027

Бактериофаг vB-EfS-027 относится к морфологическому типу B1. Головка имеет форму икосаэдра. Рассматриваемый бактериофаг имеет изгибаемый несокращаемый хвост. Длина головки в среднем составляет 54 нм, ширина головки составляет 54 нм. Бактериофаг vB-EfS-027 следует отнести к порядку Caudovirales и

семейству Siphoviridae (морфотип B2). Средняя длина хвоста составляет 202 нм, толщина хвоста 12 нм. (см. рисунок 14).

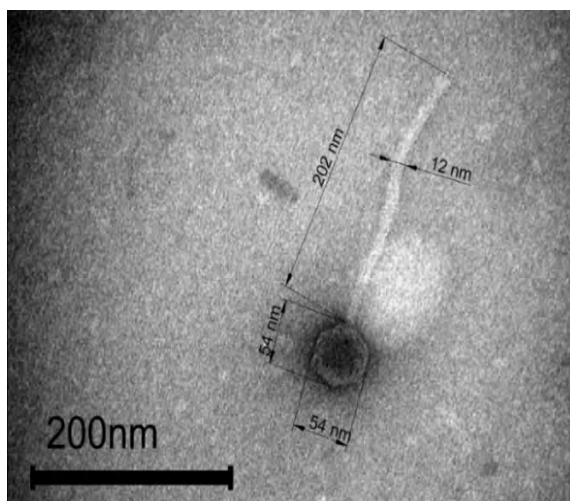


Рисунок 14 – Электронные микрофотографии фага vB-EfS-027 (увеличение 250000)

Бактериофаг vB-PvS-22

Бактериофаг vB-PvS-22 следует отнести к порядку Caudovirales и семейству Siphoviridae (морфотип B1). Головка имеет форму икосаэдра. Рассматриваемый бактериофаг имеет неизгибаемый сокращаемый хвост. Параметр головки в среднем составляет 72 нм. Средняя длина хвоста в несокращенном виде составляет 192 нм, (см. рисунок 15).

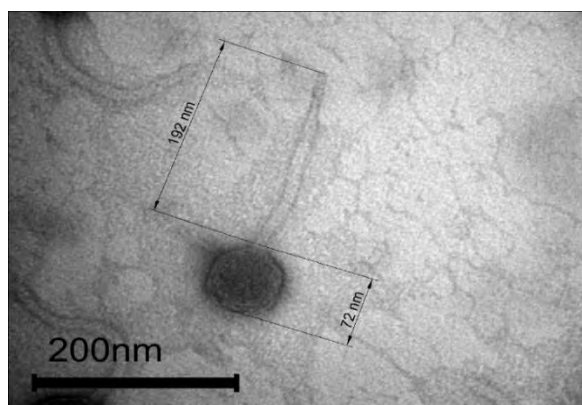


Рисунок 15 – Электронные микрофотографии фага vB-PvS-22 (увеличение 250000)

Бактериофаг Ph. B. cereus F

Бактериофаг находится на стадии паспортизации и изучения морфометрических свойств. Предварительные данные по электронной микроскопии свидетельствуют, что данный бактериофаг относится к морфотипу B1 (см. рисунок 16.)



Рисунок 16 – Электронные микрофотографии фага Ph. *B. cereus* F (увеличение 150000)

Бактериофаг Ph. *S. haemolyticus* 9

Бактериофаг Ph. *S. haemolyticus* 9 относится к морфологическому типу A1. Головка имеет форму икосаэдра. Рассматриваемый бактериофаг имеет изгибаемый сокращаемый хвост. Длина головки в среднем составляет 89 нм, ширина головки составляет 84 нм. Средняя длина хвоста в несокращенном виде составляет 210 нм, толщина хвоста 19 нм. В сокращенном виде длина чехла составляет 105 нм, длина стержня 178 нм. (см. рисунок 17).

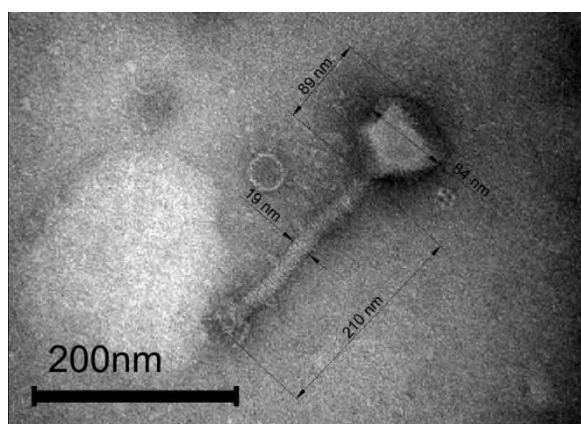


Рисунок 17 – Электронные микрофотографии фага Ph. *S. haemolyticus* 9 (увеличение 250000)

Бактериофаг vB-SaM-9,1

Бактериофаг vB-SaM-9,1 относится к морфологическому типу Twort, его следует отнести к порядку Caudovirales и семейству Myoviridae (морфотип A1). Головка имеет форму икосаэдра. Рассматриваемый бактериофаг имеет изгибаемый сокращаемый хвост. Длина головки в среднем составляет 81 нм, ширина головки составляет 82. Средняя длина хвоста в несокращенном виде составляет 205 нм, толщина хвоста 18 (см. рисунок 18).

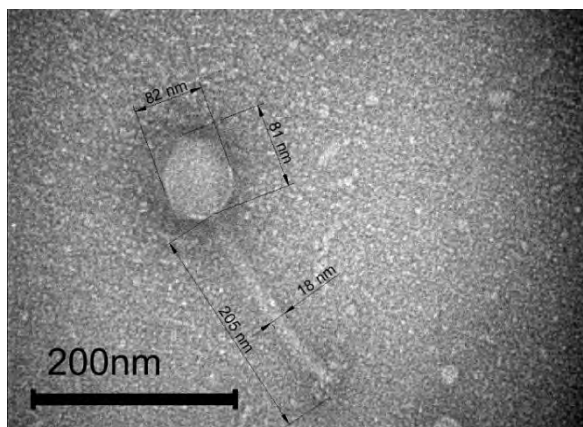


Рисунок 18 – Электронные микрофотографии фага vB-SaM-9,1 (увеличение 250000)
Бактериофаг vB-PaP-20

По морфологическим характеристикам фаг vB-PaP-20 следует отнести к порядку Caudovirales, семейство Podoviridae, морфотипу C1. Данный бактериофаг принадлежит к группе фKZ-подобных фагов. Вирион включает икосаэдрическую головку диаметром 117-121 нм и сокращающийся хвостовой отросток длиной 190-192 нм. На рисунке 19 представлены электронограмма бактериофага vB-PaP-20 в интактном виде и с сокращенными хвостовыми отростками.

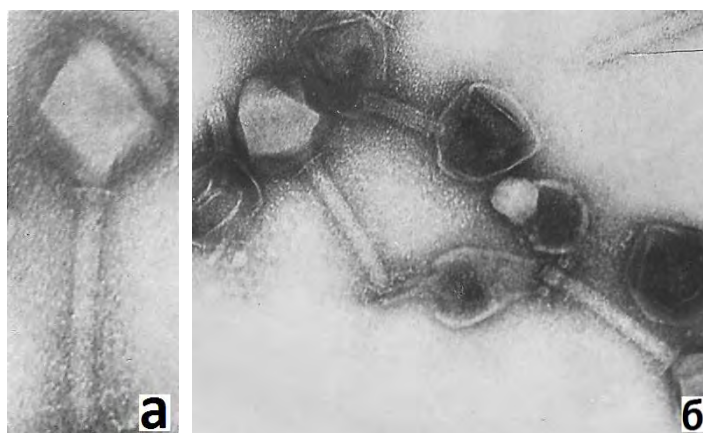


Рисунок 19 – Электронные микрофотографии фага vB-PaP-20; а – интактный фаг (увеличение 350000); б – фаги с сокращенными отростками (увеличение 300000).

Бактериофаг vB-StraM-264

Бактериофаг vB-StraM-264 следует отнести к Caudovirales, семейство Myoviridae, морфотипу B1. Данный бактериофаг относится к морфологическому типу Twort. Головка имеет форму икосаэдра. Рассматриваемый бактериофаг имеет изгибаемый сокращаемый хвост. Длина головки в среднем составляет 88 нм, ширина головки составляет 87 нм. Средняя длина хвоста в несокращенном виде

составляет 204 нм, толщина хвоста 20 нм. В сокращенном виде длина чехла составляет 102 нм, длина стержня 166 нм (см. рисунок 20).

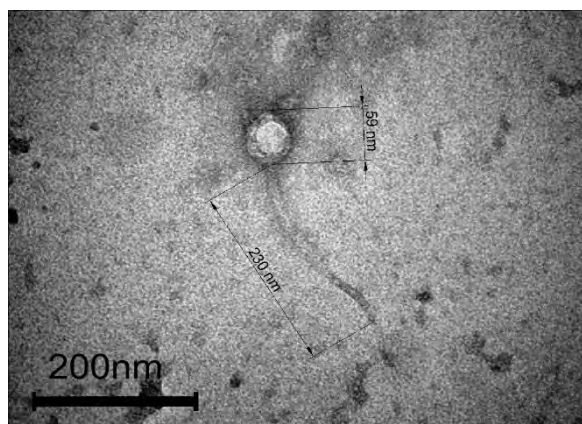


Рисунок 20 – Электронные микрофотографии фага vB-StraM-264 (увеличение 200000)

2.6.3. Подбор маточных бактериальных культур для бактериофагов-претендентов

Для отбора маточных культур бактерий с целью получения высоких титров бактериофагов исследовали выделенные изоляты в процессе бактериологического мониторинга. С целью изучения на наличие профага в бактериальных клетках использовали химический и физический фактор индукции профагов.

В качестве химического фактора воздействия использовали Митомицин С – наиболее часто используемый универсальный индуктор. Для разных систем фаг-клетка доза индуктора подбирается индивидуально [162]. В зависимости от вида клетки-хозяина концентрация может варьировать в пределах 0,1-2,5 мкг/см³, дозу Митомицина С увеличивали на 0,5 мкг/см³ до максимальной дозы 2,5 мкг/см³.

Как физический фактор воздействия использовали УФО (ультрафиолетовое излучение) с длиной волны 250 нм. С этой целью наносили 0,5 мл суточной культуры на чашки Петри со средой ВНИ с специальным кварцевым покрытием, не искажающим получаемую дозу УФО, оставляли на 10 мин. для подсыхания культуры, далее воздействовали в течение 5-7 мин., в зависимости от вида бактерий, с расстояния 1 м. Время воздействия устанавливали опытным путем. После облучения чашки помещали в термостат при 37° С, культуры *Trueperella py-*

ogenes 2, *Porphyromonas levii 22*, *Fusobacterium necrophorum 5* помещали в анаэробную станцию при 37° С на 24 часа. Воздействие УФО производили по аналогичной методике в трех повторностях, по завершению цикла воздействия УФО на культуры исследовали их на жизнеспособность по методу предельных разведений. Результат учитывали по наличию пятен лизиса, а также исследовали аликваты бактериальных культур на электронном микроскопе на наличие бактериофагов в образцах. Несмотря на то, что на момент исследований не выделены высоко литически активные бактериофаги к *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, исследования штаммов этих культур на лизогенность считали перспективным с целью их дальнейшего использования для поисков бактериофагов.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Отсутствие лизогенных свойств у отобранных штаммов

Штамм бактерий	Факторы воздействия			
	Митомицина С		УФО	
	доза (мкг/см ³)	результат	время экспозиции (мин.)	результат
<i>Trueperella pyogenes 2</i>	0,1-1,5	-	5	-
<i>Escherichia coli 19/1</i>	0,1-1,5	-	5	-
<i>Enterococcus faecalis 2</i>	0,1-1,5	-	5	-
<i>Proteus vulgaris 2</i>	0,1-1	-	5	-
<i>Bacillus cereus F</i>	0,1-1,5	-	7	-
<i>Staphylococcus haemolyticus 11</i>	0,1-1,5	-	5	-
<i>Porphyromonas levii 22</i>	0,1-1,5	-	5	-
<i>Fusobacterium necrophorum 5</i>	0,1-1,5	-	5	-
<i>Staphylococcus aureus 41</i>	0,1-2,0	-	7	-
<i>Pseudomonas aureginosa 416</i>	0,1-1,5	-	7	-
<i>Streptococcus agalactiae 4</i>	0,1-1,0	-	5	-

В результате нами были отобраны маточные культуры бактерий для воспроизводства бактериофагов (см. таблицу 12).

Таблица 12 – Перспективные для наработки фаговой биомассы штаммы видов бактерий

Бактериальный штамм	Штамм бактериофага
<i>Trueperella pyogenes</i> 2	Ph. T. pyogenes 2
<i>Escherichia coli</i> 19/1	vB-EcM-04
<i>Enterococcus faecalis</i> 2	vB-EfS-027
<i>Proteus vulgaris</i> 2	vB-PvS-22
<i>Bacillus cereus</i> F	Ph. B. cereus F
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 11	Ph. S haemolyticus 9
<i>Staphylococcus aureus</i> 41	vB-SaM-9,1
<i>Pseudomonas aureginosa</i> 416	vB-PaP-20
<i>Streptococcus agalactiae</i> 4	vB-StraM-264

Изоляты, представленные в таблице 12, не являются лизогенными культурами, что позволяет использовать их в дальнейших исследованиях для разработки способов культивирования бактериофагов с выходом больших титров вирусных частиц бактерий.

2.6.4. Получение высоких титров бактериофагов-претендентов для конструирования экспериментальных серий нового средства

При выборе способа культивирования бактериофагов исходили из того, что он должен быть технологичен и позволял бы получить высокие титры.

Для исследований использовали ранее выделенные и депонированные в коллекции ФГБУ ВГНКИ бактериофаги Ph. T. pyogenes 2, vB-EcM-04, vB-EfS-027, vB-PvS-22, Ph. B. cereus F, Ph. S haemolyticus 9, Ph. F. necrophorum 7, vB-SaM-9,1, vB-PaP-20, vB-StraM-264, которые активны в отношении изолятов: *Trueperella pyogenes* 2, *Escherichia coli* 19/1, *Enterococcus faecalis* 2, *Proteus vulgaris* 2, *Bacillus cereus* F, *Staphylococcus haemolyticus* 11, *Porphyromonas levii* 22, *Fusobacterium necrophorum* 5, *Staphylococcus aureus* 41, *Pseudomonas aureginosa* 416, *Streptococcus agalactiae* 4, которые репродуцировали на соответствующих тест-штаммах в бульоне Хоттингера. Для титрования бактериофагов и получения посевной культуры использовали 1,5 % МПА, а также полужидкий 0,75 % МПА.

Культивирование фагов проводили в колбах объемом 650 см³, используя термостатированную качалку. Аэрацию для бактерий аэробов осуществляли шуттелированием (140-160 кач/мин.). Исследования ряда авторов показали, что наибольший выход биомассы бактериофагов отмечается при сокультивировании фагов с бактериями во время экспоненциальной фазы роста маточных культур бактерий [94, 96]. Экспоненциальная фаза роста характеризуется незначительным количеством нежизнеспособных клеток, поэтому мы заражали клетки фагом в начале данной фазы.

Полученные данные в ходе изучения одиночного цикла развития фагов позволили определить оптимальную концентрацию бактерий-хозяев в момент заражения их фагом и множественность инфекции.

Методика культивирования фагов в жидкой питательной среде в колбах представлена на примере бактериофага vB-SaM-9,1 с использованием в качестве тест-культуры *Staphylococcus aureus* 41.

В колбы объемом 650 см³ с 50 см³ питательной среды (Бульон Хоттингера с pH 7,2-7,4) вносили по 0,5 см³ тест-культуры из концентрации 1,0x10⁹ кл/см³ и дополнительного культивирования при аэрации от 2,5 до 3 часов в условиях температуры 37 °С. Аэрацию для облигатных анаэробов не проводили. На следующем этапе добавляли бактериофаг из расчета различной множественности инфекции: 1:10; 1:20; 1:50, и после этого продолжали инкубировать при 37 °С в течение 18-24 часов до почти полного просветления фаголизата. Полученный фаголизат осветляли центрифугированием при 6000 об/мин., затем супернатант фильтровали через стерилизующие фильтры с диаметром пор 1,2 мкм., 0,45 мкм. и 0,22 мкм. В стерильном препарате фага определяли концентрацию БОЕ/см³ по методу Грация и литическую активность по Аппельману. Каждый бактериофаг культивировали индивидуально от других, такой подход позволил получать высокий титр заданного бактериофага. В результате этой работы были получены параметры наиболее оптимальных условий для культивирования выделенных бактериофагов, представленные в таблице 13.

Таблица 13 – Параметры получения высоких титров бактериофагов-претендентов в бульоне Хоттингера

Штамм бактериофага	Концентрация специфичной культуры, кл./см ³	Множественность заражения	Время подращивания клеток, час.	Время со-культивирования системы (фаг-бактерия), час.	Концентрация, БОЕ/см ³ по Грациа	Литическая активность фага по Аппельману
Ph. T. pyogenes 2	1,0x10 ⁷	1:10	4,0	18-24	1,0x10 ⁶	10 ⁻⁷
vB-EcM-04	1,7x10 ⁷	1:10	2,5	18-24	1,5x10 ⁹	10 ⁻⁹
vB-EfS-027	1,2x10 ⁸	1:10	2,5-3,0	18-24	1,0x10 ⁸	10 ⁻⁸
vB-PvS-22	1,0x10 ⁷	1:10	2,5	18-24	2,5x10 ⁹	10 ⁻⁸
Ph. B. cereus F	2,4x10 ⁷	1:10	2,5	18-24	3,6x10 ⁸	10 ⁻⁸
Ph. S haemolyticus 9	1,7x10 ⁸	1:10	2,5	18-24	1,1x10 ⁹	10 ⁻⁸
vB-SaM-9,1	1,0x10 ⁹	1:10	3,0-3,5	18-24	0,5x10 ⁹	10 ⁻⁸
vB-PaP-20	1,0x10 ⁷	1:10	2,5	18-24	1,5x10 ⁹	10 ⁻⁷
vB-StraM-264	8,0x10 ⁹	1:10	2,5	18-24	1,4x10 ⁹	10 ⁻⁷

Анализируя данные таблицы 13, можно сделать заключение, что наибольший «урожай» фагов наблюдается при внесении исходной концентрации клеток не менее 1,0x10⁷ с множественностью инфекции 1:10, при 2,5-3,5 часовом подращивании клеток и 18-24 часовом совместном культивировании фага с клетками в бульоне Хоттингера. Увеличение времени подращивания тест-культур и совместного культивирования фагов с клетками-мишенями не отражается на конечном результате.

Необходимо отметить, что мы в своей работе столкнулись со сложностью в получении высоких титров бактериофага Ph. T. pyogenes 2. В настоящее время для данного бактериофага разрабатываются особые условия наработки на плотной и жидкой питательной среде.

В остальном, выделенные и изученные бактериофаги обладали высокой литической активностью к клеткам-хозяевам, обладали перспективными свойствами по количеству выхода дочерних частиц (урожайность). Отработанная технология получения первичных образцов позволяет производить их дальнейшее изучение на возможность применения на практике.

2.6.5. Очистка фаголизатов, после наработки фаговой массы

Очистку образцов фагов осуществляли в два этапа. На первом этапе использовали дифференциальное центрифугирование. Первоначально фаголизаты центрифугировали в низкоскоростном режиме (5 тыс. об/мин., 15 мин.). Затем фаговые частицы переосаждали при 20 тыс. об/мин., 120 минут (центрифуга “Beckman” L5-50B, ротор SW27). Осадки ресуспендировали в 0,05 М Трис-НСl буфере (pH 7,0-7,2).

На втором этапе очистки препараты фагов центрифугировали в градиенте плотности хлористого цезия по следующей методике. В центрифужные пробирки (ротор Spinco SW-50.1) вносили 4,75 см³ 0,05М Трис-НСl буфера (pH 7,0-7,2); 0,25 см³ фаговой суспензии и 7,0 г. CsCl. Систему центрифугировали при 20 тыс. об/мин. в течение 5 часов. Затем содержимое пробирок фракционировали. Фракции исследовали под электронным микроскопом «JEOL-1011» на наличие фагов и на степень гомогенности образцов. Отобранные аликвоты бактериальных вирусов деионизировали в 0,05М Трис-НСl буфера (pH 7,0-7,2). Для работы необходимо использовать фракции, содержащие гомологичные фаговые частицы, которые составляют высокоочищенный фаговый препарат. Концентрирование бактериофагов производили при помощи ультрацентрифуги Beckman Coulter Optima L-90K, в роторе СВ-28 при 27 тыс. об/мин. в течение 1,5-2 ч.

При использовании этого метода степень очистки по белку составила $93,5 \pm 2,1$ % от первоначального содержания в фаголизатах общего белка.

В результате полученные высокие титры бактериофагов, за исключение фага Ph. T. ruogenes 2, позволили разводить концентрированные фаголизаты при производстве конечной формы препарата на несколько порядков, что дополнительно снижало содержание белков и липополисахаридов. Разведение фаголизатов производили с учетом полученных титров фагов после наработки, для чего проводили контрольное титрование по методу Грация перед отправкой фаголизатов на производственную линию ООО «АВЗ С-П» для разлива двух опытно-промышленных серий препарата, при этом первую серию препарата «Ветагин»

была произведена в лабораторных условиях Научно-производственного центра «МикроМир».

В очищенных таким образом препаратах концентрации общего белка и липополисахаридов составляли 10 ± 2 мкг/мл и 5 ± 1 мкг/мл, соответственно.

В каждом из полученных фаголизатов концентрация фаговых частиц варьировала в пределах 10^6 - 10^7 БОЕ/см³ по Грациа.

Конечный препарат, включающий бактериофаги, представленные выше получил временное наименование – «Ветагин». Окончательное название препарату будет присвоено при его регистрации как лекарственного средства для ветеринарного применения.

Разработка и утверждение нормативной документации на лекарственный препарат для ветеринарного применения «Ветагин» планируется в дальнейших исследованиях.

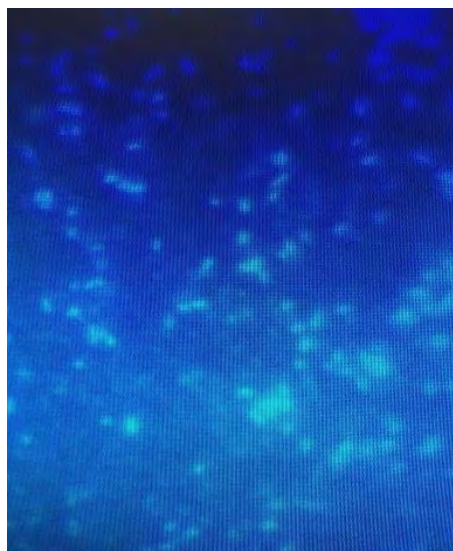
2.7. Доклинические исследования нового коктейля бактериофагов «Ветагин»

2.7.1. Изучение возможного взаимодействия компонентов препарата «Ветагин» с клетками отдельных представителей нормофлоры

В настоящем исследовании использовали два метода, позволяющие оценить возможность взаимодействия бактериофагов препарата «Ветагин» с представителями нормофлоры влагалища коров *Lactobacillus species*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bacillus licheniformis*, выделенных при бактериологическом мониторинге, в качестве положительного контроля использовали маточные культуры бактерий, гомологичных к бактериофагам-претендентам.

В экспериментах применяли методику флуоресцентной микроскопии. В геном фага включали флуоресцентный зонд 4,6-диамидин-2-фенилиндол (DAPI). Интеркаляция DAPI в фаговую ДНК, не нарушает морфогенез фага. Кроме того, DAPI-меченный фаг не утрачивает способности взаимодействовать с клеткой [165, 169].

Флуоресцентную микроскопию проводили на микроскопе «Opton». Клетки тестируемого бактериального штамма (10^7 КОЕ/см³) смешивали с DAPI-фагами (1:5). Через 30 мин. систему фиксировали 1,0 % глутаровым альдегидом (pH 7,0) и анализировали первоначально при фазовоконтрастном режиме. При этом клетки выглядят как темные образования на светлом фоне. Затем микроскоп переключается на флуоресцентный режим (334 нм-ехс-фильтр, 420 нм-sup-фильтр) и инфицированные фагом клетки приобретают характерное синевато-фиолетовое свечение, в качестве тест-культур использовали маточные штаммы бактерий, используемые для наработки специфичных бактериофагов, пример взаимодействия бактериофагов с маточной культурой *Staphylococcus aureus* и отсутствия адсорбции культурой *Lactobacillus species* (см. рисунок 21). В результате проведения флуоресцентной микроскопии установили, что бактериофаги, входящие в состав препарата «Ветагин» не взаимодействовали с бактериальными культурами *Lactobacillus species* (12 изолятов), *Bifidobacterium pseudolongum* (12 изолятов), *Bacillus licheniformis* (36 изолятов).



(А)



(Б)

Рисунок 21 – Флуоресцентная микроскопия; А) Положительный контроль препарата «Ветагин» с тест-культурой *Staphylococcus aureus*; Б) Отсутствие флуоресцентного свечения образцов препарата «Ветагин» с культурой *Lactobacillus species*

Также определили возможность взаимодействия бактериофагов, входящих в состав препарата «Ветагин» с культурами *Lactobacillus species*, *Bifidobacterium*

pseudolongum, *Bacillus licheniformis* используя методы спот-тестирования специфичности бактериофагов, описанных в работах Адамса М. и Гольдфарба Д.М. [2, 23]. Для исследования использовали смесь фаголизатов бактериофагов Результаты отображены в таблице 14.

Таблица 14 – Специфичность бактериофагов средства «Ветагин»

Изоляты культур нормофлоры влагалища	Кол-во изолятов	Кол-во положительных проб
<i>Lactobacillus species</i>	12	0
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	12	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	36	0

В результате ни один из бактериофагов в составе препарата «Ветагин» не лизировал бактериальные клетки нормофлоры, при этом, при проведении спот-теста на чувствительность на всех маточных культурах бактерий, отмечали зоны лизиса характерные для выделенных бактериофагов.

2.7.2. Изучение профилактической и лечебной эффективности *in vivo*

Работа проведена на базе лаборатории компании НПЦ «Микромир». Профилактическую и терапевтическую эффективность проводили с использованием образцов препарата «Ветагин» опытно-промышленной серии 010317, произведенные на ООО «АВЗ С-П» для доклинических и клинических испытаний.

Изучение эффективности *in vivo* средства «Ветагин» проводили в опытах с экспериментальным заражением самок белых мышей массой 18-20 г 3-4 недельного возраста видами бактерий, определенными нами как этиопатогенные при эндометритах у коров. В работе использовали паспортизированные штаммы бактерий коллекции НПЦ «МикроМир» с установленными дозами LD₅₀ (см. таблицу 15). Для изучения протективной активности коктейля бактериофагов инфицировали дозой 5LD₅₀ следующими штаммами бактерий: *Trueperella pyogenes* 101/R внутрибрюшинно, *Escherichia coli* ATCC 1271 внутрибрюшинно, *Enterococcus faecalis* 41 внутрибрюшинно, *Staphylococcus aureus* VRA 85 внутривенно (в хвостовую вену), *Bacillus cereus* 354 подкожно, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 327 85 внутривенно (в хвостовую вену), *Pseudomonas aureginosa* ATCC 678 внутрибрюшинно.

Таблица 15 – инфицирующие дозы бактерий, используемые при изучении протективной терапевтической эффективности

Возбудитель	LD ₅₀ , мкр. кл.	5LD ₅₀ , млн. мкр. кл.
<i>Trueperella pyogenes</i> 101/R	1,9x10 ⁸	950
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1271	2,4x10 ⁸	1200
<i>Enterococcus faecalis</i> 41	7,9x10 ⁷	390
<i>Staphylococcus aureus</i> VRA 85	4,5x10 ⁸	2250
<i>Bacillus cereus</i> 354	6,4x10 ⁷	320
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 327	9,1x10 ⁸	4550
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 678	6,8x10 ⁷	340

Эксперименты по определению эффективности средства «Ветагин» делятся на два этапа – фагопрофилактика и фаготерапия.

В экспериментах по фагопрофилактики, средство «Ветагин» вводили в трех вариантах:

1. однократное введение препарата в дозе 0,1 мл с титром фаговых частиц 1,0x10⁶-9,9x10⁷ БОЕ/см³, за 1 час до заражения перечисленными выше бактериями;
2. однократное введение препарата в дозе 0,1 мл с титром фаговых частиц 1,0x10⁶-9,9x10⁷ БОЕ/см³, за 24 часа до заражения перечисленными выше бактериями;
3. однократное введение препарата в дозе 0,1 мл с титром фаговых частиц 1,0x10⁶-9,9x10⁷ БОЕ/см³, за 48 часов до заражения перечисленными выше бактериями;

В каждом эксперименте формировали контрольную группу по 4 самки белых мышей массой 18-20 г 3-4 недельного возраста, с экспериментальным заражением без применения антибактериальных и других лекарственных средств. Метод введения средства «Ветагин» был идентичен методу инфицирования подопытных животных и осуществлялся непосредственно в место введения заражающих доз. Результаты изучения профилактической эффективности представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Профилактическая эффективность коктейля бактериофагов *in vivo*

Введение препарата за 1 ч до заражения				
Возбудитель	Выживаемость «Ветагин», %	Выживаемость (положительный контроль), %	Индикация возбудителя из крови, селезенки, печени, почек в %	
			«Ветагин»	Контроль
<i>Trueperella pyogenes</i> 101/R	80	0	3,0±0,2	99±0,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1271	80	10	3,5±0,3	99±0,2
<i>Enterococcus faecalis</i> 41	80	0	2,0±0,1	99±0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> VRA 85	70	10	2,0±0,2	99±0,2
<i>Bacillus cereus</i> 354	80	20	3,5±0,2	99±0,3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 327	70	10	3,3±0,1	99±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 678	70	0	3,3±0,3	99±0,2
Данные по группам	75,7±5,3	7,1±0,4	2,9±0,2	99±0,1
Введение препарата за 24 ч до заражения				
<i>Trueperella pyogenes</i> 101/R	80	0	3,5±0,1	99±0,1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1271	70	0	3,7±0,4	99±0,2
<i>Enterococcus faecalis</i> 41	70	0	2,5±0,3	99±0,3
<i>Staphylococcus aureus</i> VRA 85	70	10	2,5±0,1	99±0,2
<i>Bacillus cereus</i> 354	70	10	4±0,5	99±0,5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 327	80	10	3,0±0,1	99±0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 678	70	10	3,0±0,1	99±0,2
Данные по группам	72,9±4,9	5,7±5,4	3,2±0,2	99±0,1
Введение препарата за 48 ч до заражения				

<i>Trueperella pyogenes</i> 101/R	70	10	3,0±0,1	99±0,4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1271	70	0	3,0±0,2	99±0,3
<i>Enterococcus faecalis</i> 41	70	0	2,7±0,2	99±0,2
<i>Staphylococcus aureus</i> VRA 85	80	10	2,6±0,3	99±0,5
<i>Bacillus cereus</i> 354	60	10	3,5±0,4	99±0,2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 327	60	10	3,5±0,3	99±0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 678	50	0	3,5±0,3	99±0,1
Данные по группам	65,7±9,8	5,7±5,4	3,1±0,1	99±0,1

Анализ данных, представленных в таблице 15 показывает, что выживаемость зараженных мышей на фоне фагопрофилактики препаратом «Ветагин» составляет 75,7±5,3 %, 72,9±4,9 %, 65,7±9,8 % за 1, 24 и 48 ч до заражения соответственно. Высеваемость изолятов бактерий из внутренних органов мышей составила 2,9±0,2 %, 3,2±0,2 %, 3,1±0,1 % при введении препарата за 1, 24 и 48 ч до заражения соответственно. Отмечены статистически значимые различия внутри опытных групп при сравнении методики введения за 1 и 48 до заражения ($p<0,05$). Введение препарата за 1 ч до заражения более эффективно, чем введение препаратов за 48 ч.

В экспериментах по фаготерапии, жидкий препарат «Ветагин» бактериальных вирусов вводили в трех вариантах:

1. однократное введение препарата в дозе 0,1 мл с титром фаговых частиц $1,0 \times 10^6$ - $9,9 \times 10^7$ БОЕ/см³, через 1 час после заражения перечисленными выше бактериями;
2. однократное введение препарата в дозе 0,1 мл с титром фаговых частиц $1,0 \times 10^6$ - $9,9 \times 10^7$ БОЕ/см³, через 24 час после заражения перечисленными выше бактериями;

3. однократное введение препарата в дозе 0,1 мл с титром фаговых частиц $1,0 \times 10^6 - 9,9 \times 10^7$ БОЕ/см³, через 48 часов после заражения перечисленными выше бактериями;

В каждом эксперименте формировали контрольную группу по 4 самки белых мышей массой 18-20 г 3-4 недельного возраста, с экспериментальным заражением без применения антибактериальных и других лекарственных средств. Метод введения средства «Ветагин» был идентичен методу инфицирования подопытных животных и осуществился непосредственно в место введения заражающих доз. Результаты изучения лечебной эффективности представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Терапевтическая эффективность коктейля бактериофагов *in vivo*

Введение препарата через 1 ч после заражения				
Возбудитель	Выживаемость «Ветагин», %	Выживаемость (положительный контроль), %	Индикация возбудителя из крови, селезенки, печени, почек в %	
			«Ветагин»	Контроль
<i>Trueperella pyogenes</i> 101/R	90	10	2,5±0,3	99±0,1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1271	80	0	3,1±0,5	99±0,2
<i>Enterococcus faecalis</i> 41	80	10	2,0±0,1	99±0,6
<i>Staphylococcus aureus</i> VRA 85	80	10	2,2±0,2	99±0,2
<i>Bacillus cereus</i> 354	80	10	3,5±0,2	99±0,8
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 327	90	0	3,4±0,1	99±0,4
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 678	80	0	3,3±0,1	99±0,5
Данные по группам	82,9±5	5,7±5,1	2,8±0,2	99±0,3
Введение препарата через 24 ч после заражения				

<i>Trueperella pyogenes</i> 101/R	70	0	2,5±0,2	99±0,2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1271	80	10	3,7±0,1	99±0,2
<i>Enterococcus faecalis</i> 41	70	0	3,1±0,2	99±0,4
<i>Staphylococcus aureus</i> VRA 85	80	0	3,0±0,1	99±0,7
<i>Bacillus cereus</i> 354	70	0	3,6±0,2	99±0,5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 327	70	10	3,3±0,3	99±0,5
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 678	70	0	2,9±0,2	99±0,5
Данные по группам	72,9±5	3±4,1	3,2±0,1	99±0,2
Введение препарата через 48 ч после заражения				
<i>Trueperella pyogenes</i> 101/R	70	10	3,5±0,1	99±0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1271	70	0	3,9±0,2	99±0,2
<i>Enterococcus faecalis</i> 41	70	0	3,1±0,4	99±0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> VRA 85	80	10	3,0±0,2	99±0,4
<i>Bacillus cereus</i> 354	60		3,9±0,3	99±0,1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 327	60	10	3,3±0,2	99±0,6
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 678	60	0	4,0±0,3	99±0,6
Данные по группам	67,1±8	5,7±5,4	3,5±0,3	99±0,2

Анализ данных, представленных в таблице 17 показывает, что выживаемость зараженных мышей на фоне фаготерапии препаратом «Ветагин» составляет 82,9±5 %, 72,9±5 %, 67,1±8 % через 1, 24 и 48 ч после заражения соответ-

ственно. Высеваемость изолятов бактерий из внутренних органов мышей составила $2,8 \pm 0,2$ %, $3,2 \pm 0,1$ %, $3,5 \pm 0,3$ % при введении препарата через 1, 24 и 48 ч после заражения соответственно.

Отмечены статистически значимые различия при фагопрофилактике внутри опытных групп при сравнении методик введения за 1 и 48 до заражения ($p < 0,05$).

Выше приведенные данные позволяют сделать заключение об эффективности препарата «Ветагин» при фагопрофилактике и фаготерапии экспериментальной инфекции, вызванными специфичными видами бактерий, а также о возможности применения средства в ветеринарной практике с получением положительных результатов.

2.7.3. Стабильность готового коктейля бактериофагов по методу «ускоренного старения»

Отобранные образцы препарата из экспериментальной серии исследовали по методу «ускоренного старения», с этой целью были отобраны по 3 флакона конечного продукта и помещены в термостаты Binder BD-53 с температурным режимом $+40$ °C, предварительно отобрав 5 мл из каждого флакона, последующие каждые сутки из всех образцов отбирали по 5 мл для исследования титров бактериофагов по методу Грация.

Параллельно исследовали титры образцов препарата из этих же партий, хранящихся в условиях холодильной камеры (от $+2$ до $+8$ °C) – отрицательный контроль. Экспериментальное средство считали не пригодным к использованию при снижении титра до уровня ниже $5,0 \pm 0,1 \times 10^3$ БОЕ/см³. Согласно формуле (см. раздел «материалы и методы»), был подсчитан коэффициент соответствия:

$$K = 2,5^{\frac{40-8}{10}} = 18,8,$$

данный коэффициент одинаков для всех бактериофагов, т.к. исследования проводили на готовой форме средства со смесью бактериофагов, соответственно температурный режим экспериментального хранения аналогичен для всех бактериофагов.

Результаты исследований представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Экспериментальные сроки хранения средства «Ветагин»

Штамм бактериофага	К – коэффициент соответствия	Сутки существенного снижения титра	Изначальный титр, БОЕ	Титр на С ₃ (срок экспериментального хранения)	С – срок годности при температуре хранения t _{хр} (+ 8 °С), суток
Ph. T. pyogenes 2	18,8	20	1,1±0,2x10 ⁶	1,0±0,2x10 ³	376
vB-EcM-04		25	1,5±0,3x10 ⁷	3,2±0,2x10 ³	470
vB-EfS-027		23	9,2±0,1x10 ⁷	9,4±0,3x10 ²	488,8
vB-PvS-22		23	3,1±0,1x10 ⁷	1,6±0,1x10 ³	488,8
Ph. B. cereus F		21	6,0±0,4x10 ⁶	4,2±0,4x10 ³	394,8
Ph. S. haemolyticus 9		21	7,5±0,2x10 ⁷	3,3±0,1x10 ³	394,8
vB-SaM-9,1		20	4,8±0,3x10 ⁷	2,8±0,3x10 ³	376
vB-PaP-20		28	9,1±0,5x10 ⁷	4,5±0,2x10 ³	526,4
vB-StraM-264		24	6,3±0,3x10 ⁷	4,8±0,1x10 ³	451,2

Титры бактериофагов в препарате «Ветагин» вначале эксперимента варьировали в диапазоне 1,1x10⁶-9,2x10⁷ БОЕ/см³ в зависимости от вида фага. Исходя из полученных данных опыта, представленных в таблице 18, делаем вывод, что бактериофаги в составе средства «Ветагин» инактивируются при + 40 °С с разной скоростью. Анализ результатов показывает, что существенное снижение на 3 и более порядка происходило с 21 суток. При этом в контрольных образцах всех серий препарата за период наблюдений (28 суток) титры всех бактериофагов сохранились на уровне в рамках статистической погрешности в сравнении с начальным титром.

Таким образом, экспериментальные сроки хранения показали, что при температуре хранения от 2 до 8 °С коктейля бактериофагов «Ветагин», его активность сохраняется до 376 дней. Полученные данные позволили не вносить консерванты в состав препарата и приступить к клинической апробации нового средства «Ветагин».

2.7.4. Стабильность готового коктейля бактериофагов «Ветагин» по методу «долгосрочного испытания»

Исследования стабильности нового средства «Ветагин» проводили параллельно первичным клиническим испытаниям, а также в течение проведения расширенных клинических исследований и после завершения клинических испытаний. Исследования проводили на двух опытно-промышленных сериях 010317 и 021017. В течение изучения стабильности нового средства «Ветагин» по методу «долгосрочных испытаний» исследовали концентрацию бактериофагов по методу Грация, кислотность, а также стерильность. Стоит отметить, что данные исследования будут продолжаться до момента установления окончательного срока хранения средства «Ветагин» путем систематического исследования по методу «долгосрочных испытаний» [68] по показателям концентрации водородных ионов и титра бактериофагов, а также стерильности. Установление содержания общего белка и ЛПС в долгосрочных исследованиях не проводили, т.к. содержание данных примесей в конечном средстве «Ветагин» приближено к минимальным показателям, в том числе, и за счет разведения фаголизатов.

Таблица 19 – Стабильность опытно-промышленных серий средства «Ветагин»

Бактериофаг	№ ОПС	Временные точки отбора образцов*				
		1	2	3	4	5
#		Титры бактериофагов				
Ph. T. pyogenes 2	010317	1,1±0,2x10 ⁶	1,4±0,3x10 ⁶	1,2±0,3x10 ⁶	1,5±0,2x10 ⁶	2,3±0,5x10 ⁶
	021017	1,9±0,1x10 ⁶	2,4±0,2x10 ⁶	1,5±0,4x10 ⁶	1,7±0,3x10 ⁶	1,4±0,1x10 ⁶
vB-EcM-04	010317	2,3±0,3x10 ⁷	3,6±0,6x10 ⁷	2,2±0,4x10 ⁷	3,1±0,1x10 ⁷	1,7±0,2x10 ⁷
	021017	1,5±0,4x10 ⁷	1,8±0,2x10 ⁷	1,8±0,6x10 ⁷	2,0±0,1x10 ⁷	1,2±0,3x10 ⁷
vB-EfS-027	010317	7,9±1,9x10 ⁷	7,9±1,3x10 ⁷	8,9±0,3x10 ⁷	9,6±0,5x10 ⁷	8,2±0,1x10 ⁷
	021017	9,1±0,4x10 ⁷	8,8±0,1x10 ⁷	8,2±0,1x10 ⁷	7,4±0,4x10 ⁷	7,4±0,1x10 ⁷
vB-PvS-22	010317	3,5±0,3x10 ⁷	4,6±0,3x10 ⁷	4,3±0,4x10 ⁷	3,5±0,2x10 ⁷	3,7±0,4x10 ⁷
	021017	2,7±0,4x10 ⁷	3,6±0,2x10 ⁷	5,1±0,6x10 ⁷	3,7±0,4x10 ⁷	4,6±0,1x10 ⁷
Ph. B. cereus F	010317	6,9±0,4x10 ⁶	5,2±0,2x10 ⁶	5,6±0,4x10 ⁶	6,1±0,5x10 ⁶	6,6±0,4x10 ⁶
	021017	6,0±0,7x10 ⁶	6,5±0,9x10 ⁶	7,9±0,8x10 ⁶	6,6±0,9x10 ⁶	7,1±0,2x10 ⁶
Ph. S. haemolyticus	010317	7,1±1,2x10 ⁷	8,1±0,4x10 ⁷	7,2±0,8x10 ⁷	5,2±0,4x10 ⁷	6,4±0,6x10 ⁷
	021017	7,7±0,1x10 ⁷	6,3±0,8x10 ⁷	5,9±0,2x10 ⁷	7,1±0,7x10 ⁷	7,8±0,4x10 ⁷
vB-SaM-9.1	010317	5,4±0,6x10 ⁷	2,8±0,4x10 ⁷	5,9±0,3x10 ⁷	3,6±0,3x10 ⁷	2,2±1,3x10 ⁷
	021017	4,9±0,1x10 ⁷	5,9±0,7x10 ⁷	6,2±0,5x10 ⁷	2,9±0,8x10 ⁷	4,8±0,3x10 ⁷
vB-PaP-2	010317	8,3±0,1x10 ⁷	8,2±0,5x10 ⁷	7,6±0,7x10 ⁷	7,7±0,7x10 ⁷	7,1±0,6x10 ⁷
	021017	7,9±0,2x10 ⁷	8,5±0,3x10 ⁷	8,5±0,4x10 ⁷	8,8±0,5x10 ⁷	8,6±0,3x10 ⁷
vB-StraM-264	010317	6,5±0,6x10 ⁷	7,4±0,6x10 ⁷	8,2±0,7x10 ⁷	8,4±0,6x10 ⁷	8,2±0,5x10 ⁷
	021017	7,2±0,8x10 ⁷	8,1±0,3x10 ⁷	7,9±0,8x10 ⁷	7,3±0,3x10 ⁷	7,6±0,6x10 ⁷
Значения pH	010317	7,12±0,11	7,22±0,14	7,20±0,18	7,27±0,10	7,11±0,10
	021017	7,2±0,1	7,32±0,07	7,23±0,11	7,35±0,3	7,26±0,12

Примечание: *временные точки отбора образцов на исследования для серии 010317: 1 – 03.2017; 2 – 06.2017; 3 – 09.2017; 4 – 12.2017; 5 – 03.2018; для серии 021017: 1 – 10.2017; 2 – 01.2018; 3 – 03.2018; 4 – 06.2018; 5 – 09.2018.

Представленные данные в таблице 19, показывают, что при стандартных условиях хранения для иммунобиологических препаратов (2-8 °С) титр бактериофагов в составе средства «Ветагин» не снижается на протяжении 12 месяцев. Уровень концентрации водородных ионов также остался в пределах статистической погрешности от первоначальных данных в интервале рН 7,0-7,4.

Во всех временных точках, отобранные образцы средства «Ветагин» для исследования на стерильность показали, что в течение 12 месяцев хранения при температурном режиме (2-8 °С) стерильность средства сохраняется.

2.8. Клиническая апробация нового коктейля бактериофагов «Ветагин»

Первичные клинические апробации проводили в хозяйствах Московской области: Сергиев-Посадского района – ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Озерецкое», ООО «Русмолоко» МТФ «Закубежье», СПА «Кузьминский» село Кузьмино, Раменского района – ООО «Колхоз Гжельский»; Пушкинского района – в ООО «Лесные Поляны» село Царево; а также в хозяйстве Нижегородской области Лысковского района – ОАО «Нива». Длительные наблюдения за животными, которые были профилактированы и пролечены новым коктейлем бактериофагов осуществляли на базе хозяйства ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»» МТФ «Озерецкое».

2.8.1. Изучение безопасности применения нового коктейля бактериофагов

В руководстве по клиническим и доклиническим испытаниям иммунобиологических препаратов от 2012 г. [76, 77] указано, что в качестве испытуемых могут выступать кормящие женщины и дети любого возраста, что говорит о безопасности данного вида препаратов. Однако несмотря на данные рекомендации на I фазе клинических исследований необходимо проверить реактогенность препарата «Ветагин» на здоровых животных, с этой целью отобрали группы по 5 клинически здоровых по всем заболеваниям коров, после чего осуществили введение препарата «Ветагин» в дозе 100 мл. Введение препарата осуществляли внутриматочно, следовательно, необходимо было отобрать животных с открытым каналом шейки матки, с этой целью отбирали коров в начале половой охоты.

Реактогенность оценивали в течение первых 7 дней после отела путем клинического обследования половых органов, также проводили ежедневные ректальные исследования в течение всего периода наблюдений, к опытным группам ставили группы сравнения (контроль). В группах сравнения применяли плацебо по такой же методике что и средство «Ветагин», результаты исследований представлены в таблице 20.

Таблица 20 – отсутствие реактогенности средства «Ветагин»

Группа	Общеклинические изменения	Местно-раздражающее действие	Клинические изменения половых органов
опытная	н	н	н
контрольная	н	н	н

Примечание: (н) – признаков не выявлено

Из анализа данных таблицы 20 можно сделать вывод, что внутриматочное применение препарата «Ветагин» в дозе 100 мл с разовой кратностью не сказывается на общем состоянии организма.

2.8.2. Первичные эксперименты по разработке методики применения нового препарата

Эксперименты с целью отработки методик применения препарата проводили в ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»» на базе МТФ «Озерцкое».

Апробацию разделили на два направления:

1. профилактическое применение препарата;
2. терапевтическое применения препарата.

Для каждого направления были определены рандомизированные опытные группы с разными схемами применения препарата, сводная информация по группам представлена в таблице 21. Для отработки доз, с целью изучения терапевтической эффективности, отбирали коров с клиническими признаками гнойного или гнойно-катарального эндометрита.

Таблица 21 – Методики применения препарата «Ветагин»

№ группы	Профилактика		Кол-во коров в группе	Эффективность	
	доза	Кратность введения		фактиче- ская	процентная
профилактика					

1	50	1	10	7	70
2	50	2	10	6	60
3	100	1	10	8	80
4	100	2	10	8	80
лечение					
5	50	2	5	3	60
6	50	4	5	4	80
7	100	2	5	4	80
8	100	4	5	4	80

Из анализа представленных в таблице 21 данных, делаем вывод об наибольшей эффективности разовой дозы в 100 мл как для профилактического, так и для терапевтического применения, дозы и кратность применения для разных форм и течений заболевания могут корректироваться в процессе широкомасштабного проведения клинических испытаний.

На первых этапах апробаций предложено применять препарат для профилактики послеродовых эндометритов с разовой кратностью применения в первые 7 дней после отела, для терапевтического использования не менее двух раз с интервалом 48 часов.

2.8.3. Клиническая апробация нового коктейля бактериофагов «Ветагин»

Клинические апробации предварительно установленных методик применения препарата проводили в хозяйствах Московской области: Сергиев-Посадского района – ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Озерецкое», ООО «Русмолоко» МТФ «Закубежье», СПА «Кузьминский» село Кузьмино МТФ «Кузьмино», Раменского района – ООО «Колхоз Гжельский»; Пушкинского района – в ООО «Лесные Поляны» село Царево; а также в хозяйстве Нижегородской области Лысковского района – ОАО «Нива». Оценку эффективности проводили в сравнении с традиционными схемами профилактики и лечения послеродового эндометрита, используемых в хозяйстве с применением антибио-

тиков и химиотерапевтических антибактериальных препаратов – группы сравнения. Клинические апробационные исследования были выполнены в период декабрь 2016 – май 2018 года.

Сводные результаты апробаций препарата «Ветагин» представлены в таблицах 22 и 23.

Таблица 22 – Профилактическая эффективность препарата «Ветагин»

МТФ/МФ	Уровень Заболеваемости, %	Профилактика			
		Кол-во коров в группе	Кол-во здоровых на 30-40 день	Эффективность, %	Эффективность в группах сравнения, %
«Озерецкое»	50	20	17	85	70
«Закубежье»	75	10	8	80	80
«Кузьмино»	70	20	10	50	90
«Колхоз Гжельский»	70	20	16	80	70
«Лесные Поляны»	75	20	15	75	70
«НИВА»	70	20	10	50	60

Из анализа представленных в таблице 22 данных, делаем вывод о достаточно высокой профилактической эффективности в хозяйствах «Озерецкое» (85 %), «Закубежье» (80 %), «Колхоз Гжельский» (80 %), «Лесные Поляны» (75 %), при этом увеличение эффективности профилактики с применением препарата «Ветагин» в сравнении с группами, в которых использовали традиционные антибактериальные препараты отмечали в хозяйствах: «Озерецкое» на 15 %; «Колхоз Гжельский» на 10 %, «Лесные Поляны» на 5 %.

В хозяйствах «Кузьмино» и «НИВА», профилактическая эффективность препарата «Ветагин» оказалась недостаточной и ниже на 40 %, 10 % соответственно, чем в группах сравнения. При изучении микробиологической эффективности в данных хозяйствах было установлено, что в 50 % случаев заболевших коров были обнаружены определённые нами ранее актуальные виды бактерий *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli* при этом также присутствовала грибковая флора, представленная *Geotrichum silvicola*.

Таблица 23 – Лечебная эффективность препарата «Ветагин»

МТФ/МФ	Уровень Заболеваемости, %	Лечение			
		Кол-во коров в группе	Выздоровело	Эффективность, %	Эффективность в группах сравнения, %
«Озерецкое»	50	20	17	85	80
«Закубежье»	75	5	5	100	90
«Кузьмино»	70	-	-	-	-
«Колхоз Гжельский»	70	10	7	70	70
«Лесные Поляны»	90	10	6	60	80
«НИВА»	70	-	-	-	-

Из анализа данных представленных в таблице 23, делаем вывод о достаточно высокой терапевтической эффективности препарата Ветагин. Схема применения нового фагового коктейля во всех случаях сопровождалась использованием β -адреноблокатором – «Утеротон», кратность введения препарата «Ветагин» была не менее двух с интервалом 48 часов.

2.8.4. Результаты широких клинических исследований на базе ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» МТФ «Озерецкое»

Клинические исследования по применению препарата «Ветагин» с целью изучения профилактической эффективности на широком круге целевых объектов проводили на базе МТФ «Озерецкое» после проведения первичных апробаций препарата с полученной высокой эффективностью в данном хозяйстве. С этой целью препарат применяли в первые 2-7 дней после отела в дозе 100 мл однократно внутриматочно, после отделения последа. В целях накопления опыта применения нового коктейля бактериофагов, увеличения базы для оценки эффективности и отслеживания возможных отложенных НЛР (нежелательных лекарственных реакций), влияния нового препарата на плодотворную осеменность и, как следствие, протяженность сервис-периода, под контролем ветеринарной службы ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское», осуществляли поголовное введение препарата. Эксперимент был проведен в период 02.06.2016 –

29.06.2017, для сравнительного анализа эффективности применения нового средства провели ретроспективный анализ по заболеваемости и протяженности сервис-периода за период 02.04.2015 – 25.04.2016. При статистической обработке данных исключали животных, которые отелились раньше исследованных периодов, но плодотворного осеменились в момент исследований, часть коров были выбракованы по причинам, не связанным с эндометритами, исключены коровы с врождёнными патологиями полового аппарата. Период с 25.04.2016 по 02.06.2016 не включали в исследования, т.к. в этом временном отрезке проводили эксперименты по отработке методик применения нового средства, совместного применения антибиотиков и бактериофагов, проводили первичные апробационные эксперименты (I фаза клинических исследований). Стоит также отметить, что для сравнения данных двух периодов мы включали только тех коров, которые попадали в оба периода наблюдений (связанные выборки), чтобы установить возможную статистически достоверную разницу по уровню заболеваемости и протяженности сервис-периода. В сравнении средних величин данных двух выборок учитывали факторы селекционной работы по признакам удоев и осеменяемости, а также учитывали кормление животных. Так, в периоды наблюдений существенных изменений в кормлении животных не было, за исключением особенностей каждой сенажной ямы. В МТФ «Озерцкое» есть возможность вести целенаправленную селекцию по форме вымени, конституционным показателям, показателям заболеваемости маститом, состоянию яичников нестельных коров, по патологиям матки и шейки матки, что в свою очередь могло сказаться на результатах исследования, однако, при сравнении периодов, выбраковка по патологиям матки и акушерско-гинекологическим заболеваниям составила 0,5 % от среднегодового числа коров в хозяйстве.

Для статистического анализа связанных групп использовали парный t-критерий Стьюдента для связанных выборок. Необходимо отметить, что одним из ключевых требований для использования t-критерия Стьюдента является нор-

мальность распределения признака, в нашем случае для установления нормальности распределения использовали медиану и процентиля, т.к. при графическом анализе распределение было ассиметрично. Применение парного t-критерия Стьюдента для зависимых выборок стало возможным, поскольку 95 % значений заключено в пределах двух стандартных. Результаты исследований представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Сравнение данных двух выборок за период использования антибиотиков и нового средства на основе бактериофагов

#		Сервис период	Заболеваемость
Средняя величина значения в I период		118,63	12,23
Средняя ошибка средней арифметической выборки за I		2,27	0,31
Количество измерений в первой выборке, период I		692	692
Средняя величина значения в II период		108,25	10,9
Средняя ошибка средней арифметической выборки за II		2,03	0,35
Количество измерений в первой выборке, период II		692	692
Данные расчетов	Значение t-критерия Стьюдента:	1,77	2,84
	Число степеней свободы f =	1405	1405
	Критическое значение t-критерия Стьюдента =	1,972	1,972
	Значимость статистических различий при уровне значимости $\alpha = 0,05$	Различия статистически не значимы ($p=0,077502$)	Различия статистически значимы ($p=0,004509$)

Анализ представленных данных в таблице 24, свидетельствует что длительное применение препарата «Ветагин» статистически достоверно снизило количество заболевших эндометритом животных в сравнении с аналогичным периодом, где применяли комплексную схему, основу которой составило антибактериальное средство. При этом статистически значимой разности по протяженности сервис периодов нет. На рисунке 22 отображен тренд по снижению протяженности сервис-периода.

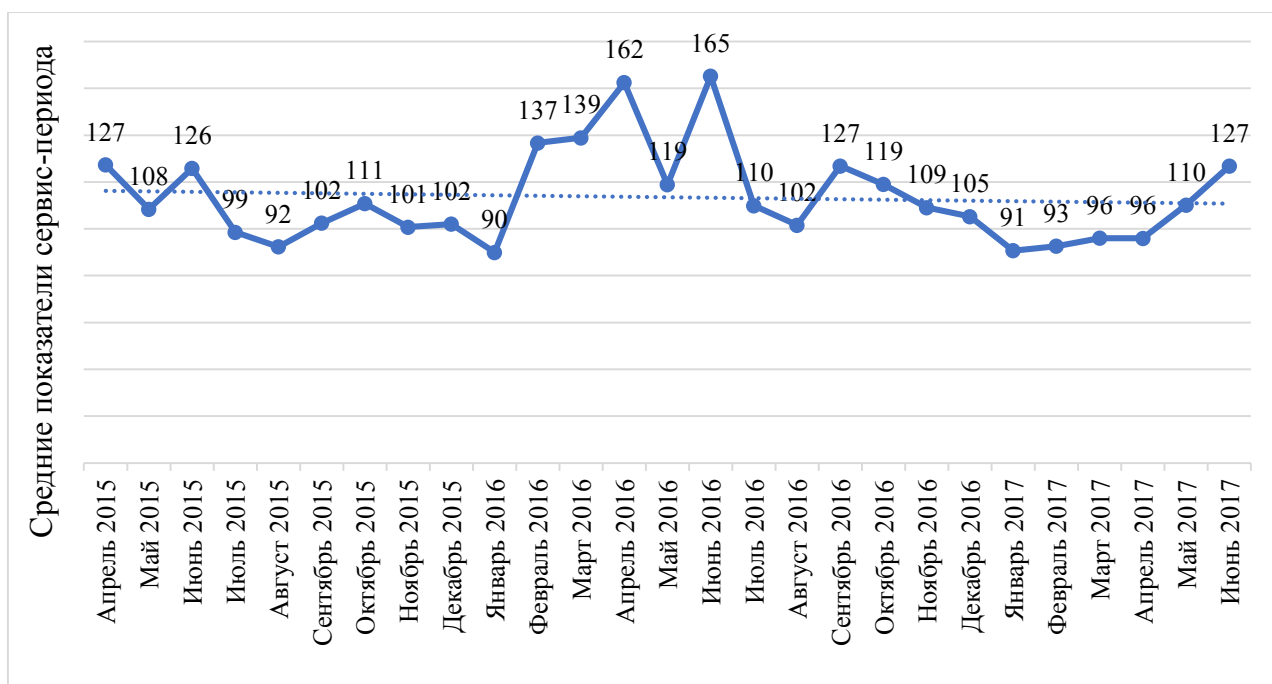


Рисунок 22 – Тренд снижения продолжительности сервис-периода в связанных выборках

На рисунке 22 отображен тренд по снижению протяженности сервис-периода, однако, как указано выше, на момент проведения анализа статистически достоверной разницы между двумя периодами наблюдений нет.

Достоверная разница по снижению уровня заболеваемости и тренд по снижению данного признака отображены на рисунке 23.

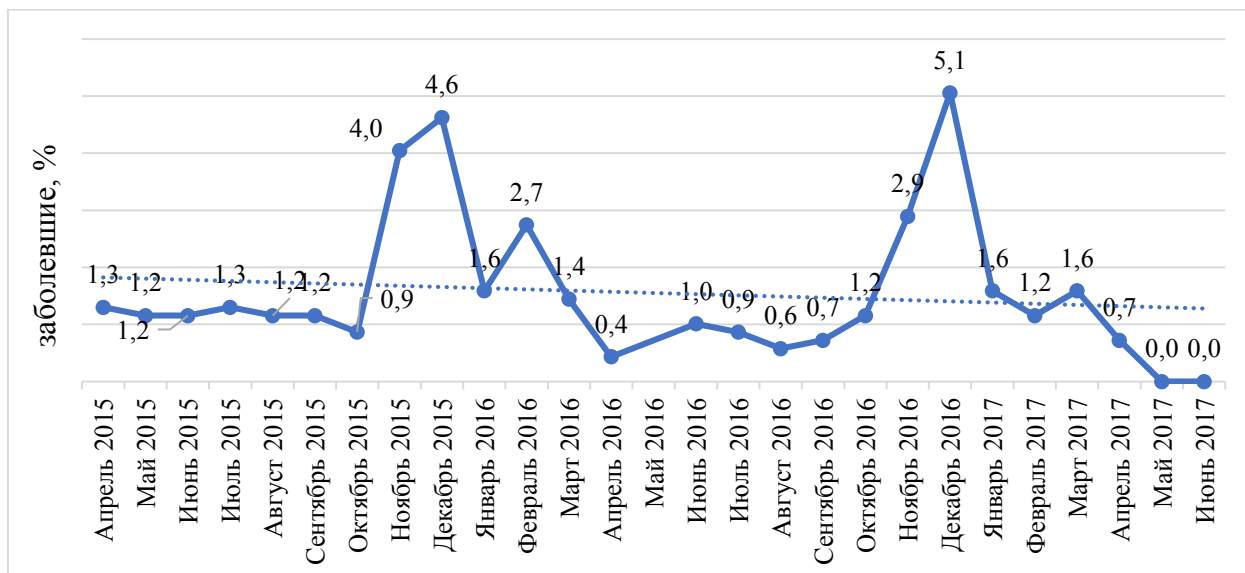


Рисунок 23 – Тренд по снижению заболеваемости клинически выраженными эндометритами в связанных выборках

На рисунке 23 отображен тренд по снижению уровня заболеваемости клиническими формами эндометрита. Нами было установлено, что по данному признаку между двумя периода наблюдений существует достоверная разница (см. таблицу 24), но на графиках отчетливо видно, что за период ноябрь-декабрь 2016 года (период применения препарата «Ветагин») наблюдали большую часть заболеваний относительно отелившихся коров. В аналогичный период в группе с применением антибиотиков уровень заболеваемости был ниже, при этом необходимо учитывать, что на клиническую выраженность эндометрита может влиять большое количество факторов.

2.9.Отсутствие маммических побочных эффектов

В ранних исследованиях по возможности применения бактериофагов на молочно-товарных фермах мы установили, что интрацистернальное введение бактериофагов вызывает ярко выраженную реактогенную реакцию организма, проявляющуюся в отеке соскового канала и долей вымени, резком увеличении количества соматических клеток до уровня значений предельных для измерения при помощи аппаратного метода с использованием «Соматос-мини». Как показали исследования, концентрация и видоспецифичность бактериофагов в вводимой интрацистернально дозе не сказывается на выраженности ответной реакции организма. Учитывая полученные данные при использовании бактериофагов для профилактики и терапии маститов, перед нами стояла задача изучения влияния фагов на молочную железу и их выделение с молоком при внутриматочном применении.

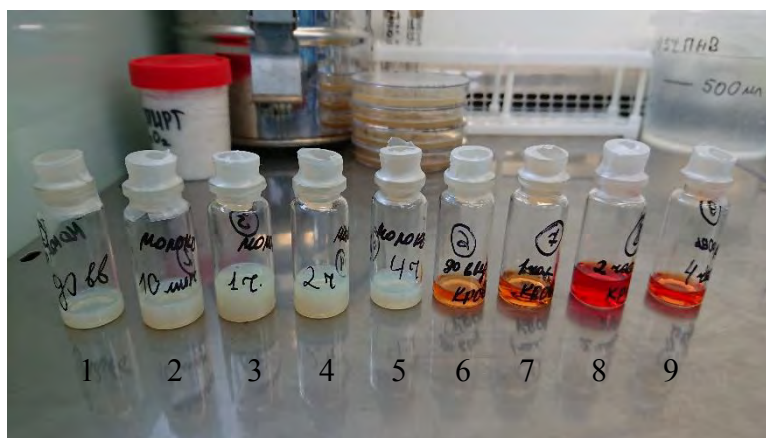
2.9.1.Изучение возможного выведения бактериофагов с молоком при внутриматочном введении препарата на основе коктейля бактериофагов

Исследования по исключению выделения лечебно-профилактических фагов с молоком при внутриматочном применении нового коктейля проводили при помощи спот-теста на выявление чувствительных бактериофагов сформированного фагового коктейля. С этой целью отбирали образцы молока и крови (в пробирки с антикоагулянтом GD020EK2) до внутриматочного введения препарата,

а также через 10 мин., 1 ч, 8 ч, 24 ч, после введения препарата с концентрацией бактериофагов в диапазоне $1,1 \pm 0,7 \times 10^6 - 4,5 \pm 1,2 \times 10^7$ БОЕ/см³ (см. рисунок 32 (а)).



(а)



(б)

Рисунок 24 – (а) – Отобранные образцы для исследования на наличие бактериофагов препарата «Ветагин»; (б) – фильтраты образцов, наносимые на индикаторные бактериальные культуры

Образцы центрифугировали при 5000 об/мин. в течение 10 мин. на ультрацентрифуге Avanti Optima J90K, полученные супернатанты фильтровали через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 1,2, 0,45, 0,22 мкм. Затем фильтраты (см. рисунок 32 (б)) наносили капельным методом на суточные культуры индикаторных штаммов бактерий видов: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus*, присутствие бактериофагов определяли по наличию пятен лизиса. К каждому эксперименту ставили положительный и отрицательный контроль. Для постановки положительного контроля использовали конкретный образец препарата, который вводили животному, для этого непосредственно перед внутриматочным введением препарата при его наборе в шприц Жанэ оставляли 10 мл препарата, использованные нами в дальнейшем. Данные исследования проводили в 5 повторностях.

Результаты исследований изображены на рисунке 25.

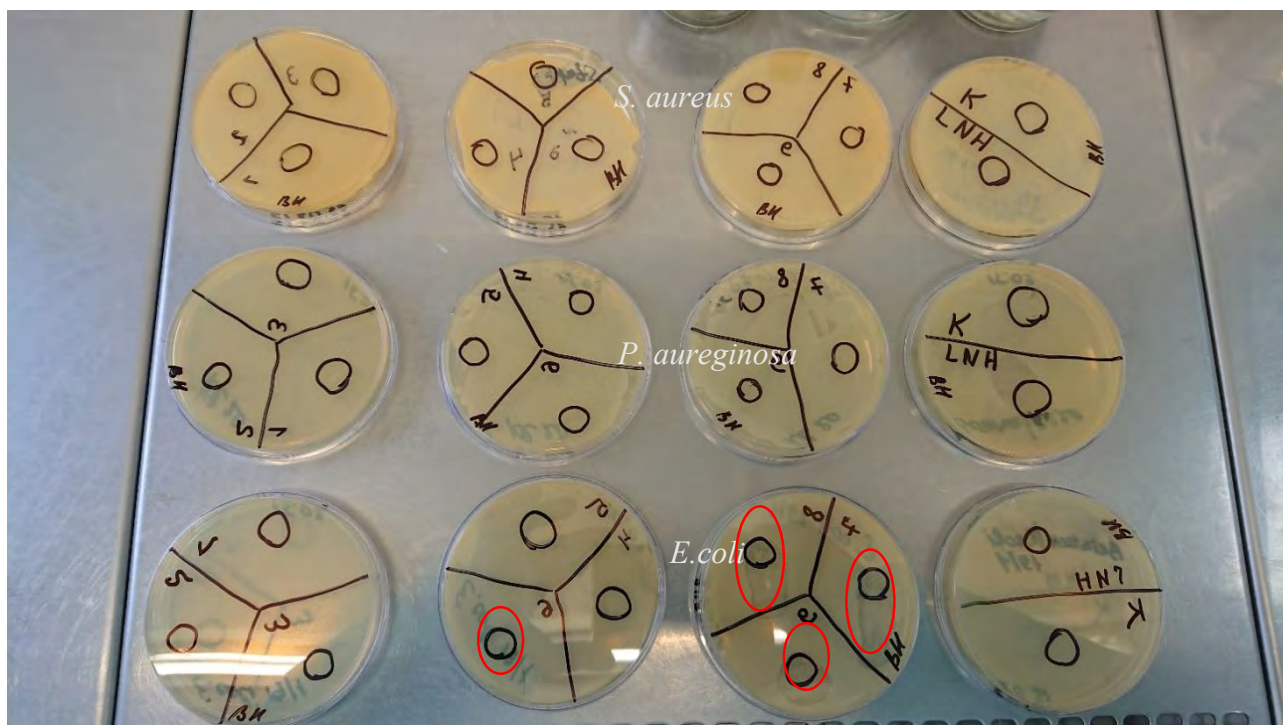


Рисунок 25 – Зоны лизиса в образцах фильтрата крови 6, 7, 8, 9 на индикаторной культуре *Escherichia coli*.

В 4 из 5 повторностей пятен лизиса на культурах *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus* ни в одном из образцов крови и молока обнаружены не были. Однако при проведении 5-го последнего в цикле данных исследований опыта, нами были обнаружены зоны негативного роста на культуре *Escherichia coli* визуально схожие с пятнами лизиса характерными для бактериофагов. На рисунке 25 изображены нечеткие просветления газона индикаторной культуры *Escherichia coli* в образцах крови № 6, 7, 8, 9. Стоит отметить, что подобные пятна лизиса могут давать ингибирующие факторы сыворотки крови. Для дальнейшего исследования из образцов крови 6, 7, 8, 9 были вырезаны и экстрадированы зоны просветления. Содержимые вещества в толще МПА экстрадировали в физрастворе объемом 2 мл путем растирания пластиковым шпателем Дригальского, остатки среды удаляли при помощи центрифугирования (2500 об./мин. в течение 5 минут) и фильтрации через нитроцеллюлозные фильтраты с диаметром пор 0,45 мкм. Полученные фильтраты засевали с индикаторными культурами по методу агаровых слоев. Анализ полученных результатов

показал, что экстрадированные агенты из образца крови № 8 (8 часов после внутриматочного введения средства «Ветагин») являются бактериофагами, данное предположение было подтверждено при помощи методов электронной микроскопии, описанных выше. На следующем этапе мы сравнивали морфометрические показатели, активность по методу Аппельмана, а также литический спектр выделенного из образцов крови бактериофага с условным наименованием Phagum K1 и бактериофага в составе средства «Ветагин» vB-ЕсМ-04. Результаты сравнения бактериофагов представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Различия характеристик фагов vB-ЕсМ-04 и Phagum K1

Бактериофаг	Активность по Аппельману	Спектр литического действия (на 30 штаммах <i>E. coli</i>)	Характер пятен на маточной культуре <i>E. coli</i>
vB-ЕсМ-04	10^{-7} - 10^{-8}	25	строго прозрачные округлые пятна диаметром 1,0-2,0 мм
Phagum K1	10^{-4} - 10^{-6}	14	пятна с вторичным ростом овальной формы диаметром 1,5-2,5 мм

Было установлено, что на маточной культуре, подобранной нами для работы бактериофага vB-ЕсМ-04, фаги Phagum K1 и vB-ЕсМ-04 проявляют отличные от друг друга активность по Аппельману, так, бактериофаг vB-ЕсМ-04 показывал активность на уровне 10^{-7} - 10^{-8} , в то время как активность бактериофага Phagum K1 была на уровне 10^{-4} - 10^{-6} . Также было отмечено, что характер формирования пятен лизиса на суточной маточной культуре *Escherichia coli* существенно различался, фаг vB-ЕсМ-04 формирует строго прозрачные округлые пятна лизиса диаметром 1,0-2,0 мм., в то время как бактериофаг Phagum K1 на той же самой культуре образовывал большие по диаметру пятна (1,5-2,5 мм), но со вторичной зоной роста. Электронно-микроскопические исследования показали, что морфометрические характеристики бактериофагов имеют достоверную статистическую разницу по размеру головки и хвоста. Полученные результаты служат основанием для утверждения, что эндогенные бактериофаги могут пер-

систировать в крови коров. Однако данные исследования необходимо продолжить с использованием метагеномных методов анализа. Таким образом, через молоко выделение индикаторных фагов средства «Ветагин» не фиксировали.

2.9.2. Влияние внутриматочного применения препарата «Ветагин» на количество соматических клеток в молоке

Данные исследования проведены с целью изучения влияния препарата «Ветагин» на динамику соматических клеток в молоке при внутриматочном введении.

Опыты проводили в ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»» Сергиев-Посадского района Московской области на МТФ «Алферьево». Для проведения опытов были отобраны 6 клинически здоровых коров без патологий молочной железы. Трем коровам препарат «Ветагин» вводили в разовой дозе 100 мл, с кратностью введения 1, 2 и 3 раза с интервалом между введениями 24 часа, каждому животному подбирали аналог для контроля, которому использовали по гомологичной схеме физиологический раствор. Количество соматических клеток в молоке измеряли при помощи аппарата «Соматос-мини». С этой целью отбирали 3 раза подряд по 10 мл цельного молока ручным методом в градуированные пластиковые пробирки для отбора приблизительно по 2,5 мл из всех 4 долей вымени от каждой коровы. Данный подход обусловлен тем, что анатомическая особенность строения вымени может обуславливать разное количество соматических клеток в каждой молочной цистерне доли. Первый отбор образцов от коров опытных групп производили непосредственно до введения препарата «Ветагин». Отобранное молоко исследовали в течение одного часа после отбора проб. Для проведения измерения готовили раствор препарата Мастоприм, 3,5 г препарата помешали в мерную колбу объемом 100 см³, после доливали дистиллированную воду, подогретую до 30-35 °С. Раствор тщательно перемешивали, разведенный раствор использовали в течение 24 часов. Отбор и исследования образцов молока продолжали на протяжении 14 суток со дня взятия первых проб (до применения препарата). Результаты исследований отображены на рисунке 26.

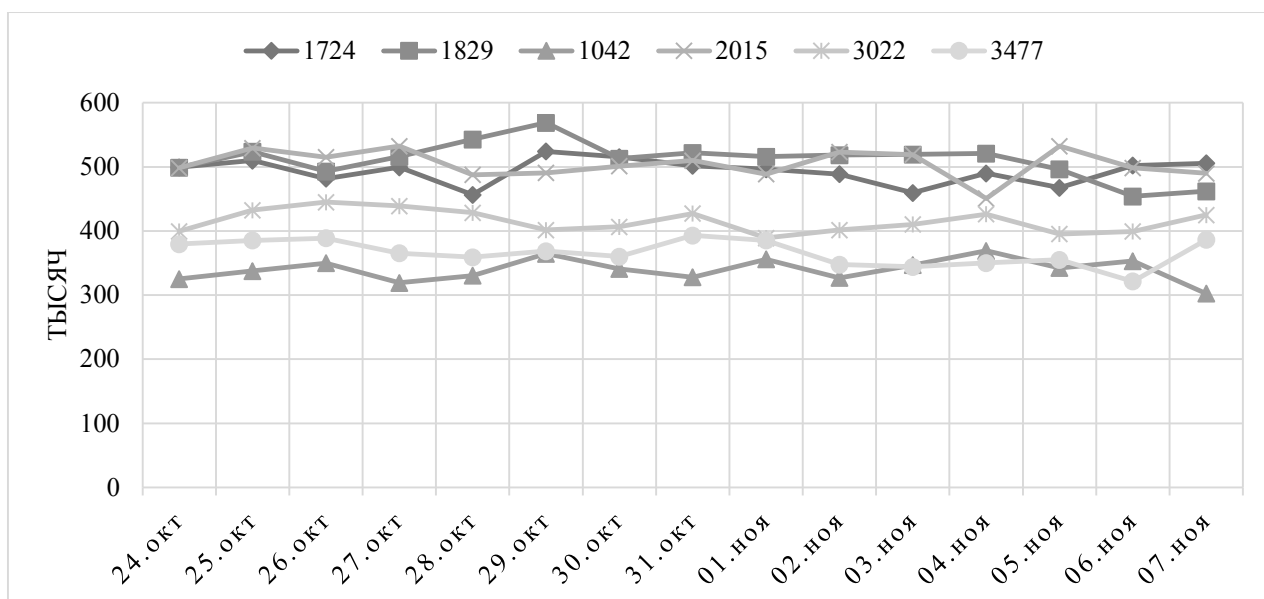


Рисунок 26 – Отсутствие влияния бактериофагов при внутриматочном введении на количественное содержание соматических клеток в молоке

Анализ полученных данных показал, что при внутриматочном введении средства «Ветагин» повышения количества соматических клеток в молоке относительно первоначальных данных не происходит.

3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарастающая глобальная проблема образования антибиотико- и полирезистентных штаммов патогенных и условно-патогенных бактерий ставит перед Человечеством задачу создания эффективных средств борьбы с заболеваниями, вызванными или опосредованными такими возбудителями. Разработка подобных средств бессмысленна без накопления знаний и понимания экологии микроорганизмов и осознания отношений, возникающих между микро- и макроорганизмами, в первую очередь бактерий. Антибиотики и другие химиотерапевтические антибактериальные препараты призваны уничтожать любой микроорганизм, сложившаяся концепция со времен великих микробиологов Луи Пастера и Роберта Коха – «мертвый микроб-хороший микроб» привела к широкомасштабному использованию этих средств, вызывая в мире бактерий естественный отбор по признаку устойчивости к данным веществам на уровне эволюционных единиц бактерий (штаммов). Еще во время разработки первых антибиотиков (пенициллина) Александр Флеминг утверждал: «Неосмотрительный человек, играющий с лечением пенициллином, морально ответственен за смерть человека, погибшего от инфекции, устойчивой к пенициллину. Надеюсь, этой беды можно избежать» [172].

«Победив» в войне с бактериями при помощи показывавших тогда высокую эффективность и надежность средств, сложилось убеждение, что с большинством болезней, вызванных и отягощенных бактериями, проблема решена навсегда. Возможно, мнение их было бы и верным, если бы применение этих средств было бы продуманным. Практическое применение антибиотиков, в том числе и как стимуляторов роста для животных, привело к тому, что частота встречаемости устойчивых штаммов бактерий стала расти с угрожающей скоростью. Стоит отметить, что антибактериальные средства, направленные на борьбу с этиопатогенными микроорганизмами, являются практически единственными этиотропным методом лечения и профилактики бактериальных болезней, за исключением некоторых вакцин.

Нельзя не обратить внимания, что наибольшее потребление данных средств приходится на сельское хозяйство, в частности, животноводство и птицеводство. От 50 до 70 % антибиотиков, используемых в мире, дают сельскохозяйственным животным [3, 47, 81, 99, 113, 140, 149]. Не смотря на то что проблему бесконтрольного применения антибиотиков поднимают на высоких уровнях [63, 80, 121, 178] уже несколько десятков лет ситуация не меняется, а продолжает развиваться в сторону роста антибиотикорезистентности. Ужесточение контроля над применением антибактериальных средств в животноводстве привело не к снижению их употребления, а поиску «обходных путей»: стали обретать популярность группы антибиотиков, остаточные количества которых трудно обнаружить в животноводческой продукции [3, 12, 35, 41]. Зачастую на фермах, птицефабриках, свиноводческих комплексах и других площадках, применение антибиотиков заменяется альтернативными средствами за определённый срок до проверки продукции, срок определяется группой антибактериальных препаратов, т.к. у каждого антибиотика свой период выведения и, следовательно, свой период каренции. Среди альтернативных средств, к которым прибегают в такие периоды, являются противовоспалительные и иммуностимулирующие препараты, органические кислоты, биологические дезинфектанты, повышенные дозы витаминных комплексов и другие средства. Обычно данные заменители менее эффективны и дороже, чем антибиотики. Сельскохозяйственные производители в условиях рыночной экономики, в особенности, без должной государственной поддержки, не могут отказаться от применения антибактериальных средств, не имея альтернативных решений, в том числе, которые были бы сопоставимы по затратам ресурсной базы.

На фоне увеличения количества случаев гибели людей и животных от болезней, вызванных устойчивыми штаммами, не только патогенных, но и убиквитарных сапрофитных (условно-патогенных) видов бактерий, остается актуаль-

ным поиск новых подходов и средств в профилактике и лечении таких заболеваний. И прежде всего, при создании новых средств необходимо учитывать новые концепции в отношениях микро- и макроорганизмов [116, 139, 163].

В скотоводстве широкое применение антибиотиков и химиотерапевтических средств приходится на лечение маститов, профилактику и лечение акушерско-гинекологических заболеваний различного генеза. Среди акушерско-гинекологических заболеваний лидирующее место по распространенности занимают послеродовые эндометриты [59, 65]. Несмотря на сложный этиологический профиль эндометритов в ветеринарной практике, лечение и профилактика осуществляется с использованием антибиотиков как основного, чаще всего единственно элемента в схеме. С целью профилактики и лечения послеродовых эндометритов используют сильнодействующие антибиотики разных групп широко спектра действия: макролиды – «Эндометраг-Т», «Тилозинокар», цефалоспорины – «Цефакар» «Цефтиосан», «Цефепим», комплексные препараты – «Прималакт», «Метролек-О», «Трициллин», «Диометр» и многие другие [18, 107, 183]. В подавляющем большинстве случаев терапевтическое использование антибактериальных препаратов осуществляется эмпирически, без предварительной идентификации возбудителя и определения чувствительности выделенного штамма к разным группам антибиотиков, что неизбежно усугубляет сложившуюся ситуацию с дрейфом антибиотикорезистентных штаммов. В таких условиях интерес представляют биологические средства борьбы с патогенными штаммами.

Одним из возможных альтернатив существующим средствам этиотропной терапии при эндометритах могут выступать бактериофаги, применение которых началось раньше эры антибиотиков [124, 125]. За свою историю фаготерапия претерпела много критики. В особенности это касается применения бактериофагов при уже начавшемся инфекционном процессе [122, 123, 144, 157]. Данные неудачи объясняются многими факторами, в том числе и не пониманием взаимодействия бактериофагов с гомологичными бактериями внутри макроорганизма [167]. В тоже время есть много упоминаний о высокой эффективности

применения бактериофагов как в профилактических, так и в терапевтических целях [115, 124, 125, 159, 173, 175].

При инфекционных болезнях применение моновалентных бактериофагов, воздействующих на возбудителя, может иметь высокую эффективность. Однако в случае с факторными инфекциями, вызванными не специфическими бактериальными агентами или заболеваний не бактериального генеза, но с отягощающим течение воздействием сапрофитной (условно-патогенной) микрофлоры, необходимо использовать комбинативный набор бактериофагов в составе одного препарата. Данное направление становится все более актуальным, что определило цель и задачи данной научно-исследовательской работы. Целью работы явилась разработка и изучение эффективности метода профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров при помощи бактериофагов. Для достижения поставленной цели были определены наиболее значимые в этиопатогенезе послеродовых эндометритов виды бактерий, изучена возможность применения существующего комплексного средства на основе бактериофагов, на основе результатов бактериологического мониторинга и изучения патогенных свойств идентифицированных штаммов бактерий, определен оптимальный состав коктейля бактериофагов для профилактического и лечебного применения. Произведен поиск и отбор промышленно-перспективных бактериофагов, гомологичных к большей части видов бактерий, установленных нами как этиопатогенные, проведено первичное изучение биологических свойств выделенных бактериофагов, на основе которых сконструирован коктейль бактериофагов – прототип лекарственного средства, получившего название «Ветагин», а также проведены первичные доклинические и клинические исследования эффективности нового экспериментального средства *in vivo*. Определена профилактическая и терапевтическая эффективность нового средства, изучена возможность выведения бактериофагов с молоком и исследовано влияние внутриматочного введения коктейля бактериофагов на протяженность сервис периода у коров.

На первом этапе работы проведены исследования микробиоты маточного содержимого больных эндометритов коров в шести хозяйствах Московской и Нижегородской областей. Отбор образцов осуществляли при помощи внутриматочных катетеров ECS без транспортной среды. Использование данных катетеров, на наш взгляд, позволило снизить риск контаминации проб. Однако после проведения первых бактериологических исследований мы получили идентифицированный широкий спектр видов бактерий из разных семейств, в том числе представителей нормофлоры влагалища. После первых исследований база для идентификации микрорганов была усилена, в итоге каждый отобранный образец высевали на: МПА, МПБ, ВНИ-агар/бульон, среду Эндо, клостридиозную среду, агар Левина, стрептококковый бульон, среду Шедлера, хромогенную среду Уриселект-4, маннит-солевой агар, ГРМ-агар, агар Сабуро, при необходимости использовали среду Олькеницкого. Дублирующие высевы для культивирования облигатных анаэробов осуществляли на среды ВНИ-агар, среда Шедлера, среда Эндо и на клостридиозную среду. Идентификацию проводили на основании культуральных, тинкториальных, морфологических, биохимических свойств, а также при помощи методов масс-спектрометрии. В результате исследований из полового аппарата коров, больных послеродовым эндометритом, были идентифицированы 53 вида микроорганизмов, принадлежащих к 24 семействам, всего было выделено 1085 изолятов культур, из них у 21 изолята не удалось установить видовую принадлежность (*Lactobacillus* sp. 12 изолятов, *Globicatella* sp. 7 изолятов, *Odoribacter* sp. 4 изолята). Выделенная микрофлора представлена 47 видами бактерий и 6 видами микроскопических грибов. Идентифицированные микроскопические грибы представлены видами: *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianis*, *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum silvicola*, *Pichia fermentans*, *Pichia manshurica*, их распространённость в общем числе исследованных образцов варьирует от 1,92 до 4,23 %. Представители царства бактерий принадлежат к семействам *Enterobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Staphylococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Corynebacteriaceae*,

Clostridiaceae, Bacteroidaceae, Micrococcaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Peptostreptococcaceae, Paenibacillaceae, Peptococcaceae, Propionibacteriaceae, Fusobacteriaceae, Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Campylobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Enterococcaceae.

При анализе данных бактериологических исследований установлено, что в 86,9 % всех исследованных образцов (260) маточного содержимого больных эндометритом коров идентифицировали ассоциации микроорганизмов. В 13,1 % при ярко выраженных клинических признаках эндометрита выделяли только один вид микроорганизмов, к таким видам относятся *Porphyromonas levii* (7 клинических случаев), *Trueperella pyogenes* (6 клинических случаев), *Fusobacterium necrophorum* (6 клинических случаев), *Staphylococcus haemolyticus* (6 клинических случаев), *Clostridium perfringens* (4 клинических случаев), *Staphylococcus aureus* (3 клинический случай), *Streptococcus agalactiae* (2 клинических случая), что позволило нам судить о этиологической роли данных микроорганизмов.

Наиболее распространёнными видами бактерий при эндометрите коров представлены *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Aerococcus viridans*, *Micrococcus luteus*, *Porphyromonas levii*, *Prevotella heparinolytica*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Clostridium cadaveris*, *Streptococcus uberis*, *Tissierella praeacuta*, *Propionibacterium granulosum*, *Bacteroides pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus pluranimalium*, *Proteus mirabilis*, среди которых *Trueperella pyogenes* и *Escherichia coli* встречаются на 35-38 % процентов чаще, чем следующий за ними по распространённости *Enterococcus faecalis*. На следующем этапе работы нами были определены наиболее патогенные виды микроорганизмов на основании анализа биохимических свойств, изучения ферментативной активности, изучения гемолитических свойств идентифицированных штаммов. Большая часть штаммов *Trueperella pyogenes* (115), *Escherichia coli* (79), *Enterococcus faecalis* (21), *Bacillus cereus* (19), *Staphylococcus haemolyticus* (20) вызывают β -гемолиз на среде

ВНІ-агар с добавлением дефибринированных эритроцитов баранов, что свидетельствует об их патогенных свойствах, большая часть идентифицированных штаммов *Staphylococcus haemolyticus* (5), *Staphylococcus aureus* (8) обладали коагулазной активностью, также штаммы *Staphylococcus haemolyticus* (17) показали липазную активность, в частности, лецитиназную. Анализ данных изучения сахаролитических свойств не выявил строгой патогенной направленности среди идентифицированных штаммов, показав типичные видовые характеристики.

Данные, полученные в ходе исследований, позволили сузить круг для поиска наиболее значимых видов бактерий при послеродовых эндометритах у коров.

Последующий анализ результатов бактериологических исследований по частоте встречаемости в образцах маточного содержимого больных эндометритом позволил определить доминирующие виды микроорганизмов, среди которых ведущую роль занимали *Trueperella pyogenes* и *Escherichia coli*, что подтверждается источниками литературы. Ассоциативное действие *Trueperella pyogenes* и *Escherichia coli* констатировали в наших исследованиях в 40-86 %. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в основном иностранных ученых [114, 118, 141, 142, 184, 185], при этом имеют ряд противоречий в сравнении с отечественными исследователями. Так, многие отечественные исследователи утверждают, что основным возбудителем и отягощающим течение эндометриты видов бактерий являются *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Streptococcus pyogenes* и др. [1, 39, 47, 52, 88, 100].

На следующем этапе работы изучали вирулентные свойства штаммов бактерий *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae* при помощи моделирования инфекционного процесса на

белых аутбредных мышах массой 18-21 г. Введение инфицирующих доз, отобранных штаммов в диапазоне от 8 млн. мкр. кл. до 2 млрд. мкр. кл. до вызвало гибель хотя бы одного подопытного животного в 55-100 % случаях.

Анализ полученных результатов бактериологических исследований маточного содержимого коров больных эндометритом позволил определить бактерии-мишени, к которым необходимо подобрать уже имеющиеся бактериофаги или осуществлять поиск новых. К таким видам бактерий отнесли *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Porphyromonas levii*, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*.

Следующим этапом нашей работы был поиск и изучение возможности применения готовых средств на основе бактериофагов. Путем анализа составов имеющихся на рынке препаратов нами было выбрано гелевое средство «Фагогин» производства ООО Научно-производственного центра «МикроМир», целевое назначение которого зарегистрировано как средство для коррективы микробиота интимной сферы. Состав данного препарата включал вирулентные бактериофаги специфичные к *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Campylobacter spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Enterobacter spp.*, *Prevotella spp.* Перед использованием данного средства изучили его литический спектр на актуальных штаммах бактерий, выделенных от больных коров в процессе бактериологического мониторинга. В результате бактериофаги в составе препарата «Фагогин» показали литическую активность на уровне на 40-70 % к гомологичным патогенным бактериям, что на наш взгляд, являлось достаточным уровнем для проведения первичных экспериментов по изучению эффективности бактериофагов для внутриматочного применения.

Эксперименты по изучению возможности применения препарата «Фагогин» проводили в условиях молочно-товарной фермы «Озерецкое» с высоким

уровнем заболеваемости клиническими формами эндометрита. При ретроспективном анализе показателей заболеваемости послеродовыми эндометритами в данном хозяйстве установили, что у новотельных коров чаще всего проявляются клинические признаки гнойно-катарального эндометрита в первые 3 недели после отела, уровень заболеваемости составлял 40-50 % в зависимости от времени года, в зимне-весенний период (период массового отела) заболеваемость выше и находится на уровне 50 %. Именно этот период был выбран для проведения экспериментов. Первые пилотные эксперименты проводили на новотельных коровах с целью профилактики у них эндометритов. Инструкция по применению препарата «Фагогин» для людей подразумевает нанесение геля в дозе одного нажатия (2,5 мл) на пораженные участки слизистой несколько раз в день на протяжении от одной до двух недель. В процессе первичных апробаций мы установили, что наиболее оптимальное время введения препаратов для профилактики послеродовых эндометритов первые 5 дней после отела, доза препарата при этом должна быть не менее 20 мл, для равномерного распределения в матке после его внесения внутрь, при этом гель не заполнял матку целиком, а только лишь ventральную часть слизистой эндометрия. С этой целью коровам, отел которых прошел без вмешательства ветеринарного врача и клинический статус животного был удовлетворительным, вводили препарат «Фагогин» по 30 мл дважды с интервалом 5 дней, для профилактики субинволюции матки применяли β -адренолитик «Утеротон» по 10 мл 3 дня внутримышечно. Первое введение препарата «Фагогин» осуществляли через 12-48 часов после отела, внутриматочно, используя пластиковый одноразовый катетер для искусственного осеменения и шприц Жанэ. В группе сравнения применяли комплексную схему включающую: «Кетоджект» по 20 мл 3 дня внутримышечно; «Цефтиосан» по 10 мл 3 дня внутримышечно; «Утеротон» по 10 мл 3 дня внутримышечно. Эффективность по профилактическому применению препарата «Фагогин» в комплексной схеме была на уровне 89,5%, что на 36,9 % оказалась выше, чем в группе с применением антибиотика. Высокая профилактическая эффективность позволила нам выйти на

апробацию средства «Фагогин» в лечебных целях. С лечебной целью препарат применяли сразу после появления первых клинических признаков заболевания в дозе 30 мл, количество введений до 5 раз с интервалом 24 часа. Лечебная эффективность препарата оказалась на уровне 50 %. Недостаточный уровень эффективности, на наш взгляд, был обусловлен отсутствием в составе препарата гомотических бактериофагов к одному из ключевых видов бактерий, определенными нами как этиопатогенными при эндометритах у коров, в частности, к *Trueperella pyogenes*. Кроме того, данные исследования показали, что литический спектр препарата «Фагогин» на ветеринарных изолятах не достаточен для получения стабильно высокой эффективности от действия препарата. Возможно, данный факт обусловлен спецификой ветеринарных штаммов бактерий, т.к. литический спектр средства «Фагогин» находится на уровне 90-95 % к актуальным клиническим изолятам, выделенным от больных женщин, систематически исследуемый разработчиком для проверки эффективности препарата. Таким образом, перед нами стояла задача по поиску и селекции новых литически активных бактериофагов к этиопатогенным видам бактерий при послеродовых эндометритах.

Бактериофаги выделяли из объектов окружающей среды по методу обогащения из проб сточных вод хозяйств, клинического и патологического материала, воды рек, озер, земли с пастбищ, навоза, ила производили по методу обогащения. В результате работы были выделены 39 штаммов бактериофагов, однако только 10 из них смогли пройти отбор по литической активности, который должен составлять не менее 10^{-7} по Аппельману. Выделенные бактериофаги активны в отношении *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae*, в ходе работы не удалось выделить бактериофаги с высокой литической активностью к *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringers*.

После их отбора произвели изучение основных биологических свойств, литический спектр, константу скорости адсорбции на специфичных клетках бактерий, латентный период в системе «фаг-клетка» и показатель «урожайности», также была проведена морфометрия выделенных бактериофагов. После изучения биологических свойств была подобрана методика получения высоких титров выделенных бактериофагов в жидкой питательной среде, заключающаяся в подборе времени подращивания (2,5-4,0 часа) при множественности инфекции 1:10 и времени сокультивирования с суточными культурами бактерий (18-24 часа). Титр по Грациа всех бактериофагов, за исключением фага Ph. Tr. pyogenes 2, специфичного к *Trueperella pyogenes*, составлял не менее $1,0 \times 10^9$ БОЕ/см³. Для бактериофага Tr. pyogenes 2 необходимо разработать особые условия наработки высокого титра, вероятно, на плотной питательной среде, т.к. на данный момент титр по завершению наращивания составляет $1,0 \times 10^6$ БОЕ/см³.

На следующем этапе нашей работы необходимо было очистить фаголизаты от общего белка и липополисахаридов. С этой целью осуществляли очистку в два этапа с использованием центрифугирования (низкоскоростного и высокоскоростного), а также центрифугирование с использованием буферных систем (CsCl). Очищенные таким образом фаголизаты позволили достичь хороших результатов по количеству остаточных ЛПС (10 ± 2 мкг/мл) и общего белка (5 ± 1 мкг/мл). При использовании этого метода степень очистки по белку составила $93,5 \pm 2,1$ % от изначального содержания после культивирования бактериофагов с целью получения высоких титров. Получаемые высокие титры бактериофагов, за исключение фага Ph. T. pyogenes 2, позволяют разводить концентрированные фаголизаты при производстве конечной формы препарата на несколько порядков, что дополнительно снижает содержание белков и ЛПС. Разведение фаголизатов необходимо производить с учетом полученных титров фагов после наработки. Для этого мы проводили контрольное титрование по методу Грациа перед отправкой фаголизатов на производственную линию для розлива. Разработку

технических условий и формирование требований к контролю на стерильность планируется провести в дальнейших исследованиях.

Конечный препарат, включающий бактериофаги, представленные выше получил временное наименование – «Ветагин». Окончательное название препарату будет присвоено при его регистрации в качестве лекарственного средства для ветеринарного применения. В составе конечной формы препарата «Ветагин» бактериофаги Ph. T. pyogenes 2, vB-EcM-04, vB-EfS-027, vB-PvS-22, Ph. B. cereus F, Ph. S haemolyticus 9, vB-SaM-9,1, vB-PaP-20, vB-StraM-264 содержались в концентрации $1,0 \times 10^6$ - $9,9 \times 10^7$ БОЕ/см³, которые активны в отношении изолятов: *Trueperella pyogenes* 2, *Escherichia coli* 19/1, *Enterococcus faecalis* 2, *Proteus vulgaris* 2, *Bacillus cereus* F, *Staphylococcus haemolyticus* 11, *Staphylococcus aureus* 41, *Pseudomonas aureginosa* 416, *Streptococcus agalactiae* 4.

Выходя на апробацию препарата в хозяйстве, необходимо было изучить его токсикологические свойства и отсутствие взаимодействия с бактериальными культурами нормофлоры. Исследования острой и подострой токсичности нового средства проводил Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России), по заключению которого препарат-коктейль бактериофагов «Ветагин» относится к IV классу (практически безвредные препараты).

Наши исследования по возможности взаимодействия бактериофагов в составе препарата «Ветагин» с бактериальными культурами нормофлоры влагалища, выделенными при бактериологическом мониторинге, показали, что адсорбции на культурах *Lactobacillus species* (12 изолятов), *Bifidobacterium pseudolongum* (12 изолятов), *Bacillus licheniformis* (36 изолятов) не происходит. Следующим этапом мы изучили стабильность коктейля бактериофагов – «Ветагин», с этой целью мы использовали методики «ускоренного старения» и «долгосрочных испытаний» согласно общей фармакопейной статье [68]. Исследования показали, что при хранении средства «Ветагин» по методу «ускоренного ста-

рения» при температуре 40 °С бактериофаги сохраняют свою активность в течение 376 суток. Так, титр бактериофагов Ph. T. pyogenes 2, vB-SaM-9,1 падал до минимальных значений к 376 дня, при этом титр бактериофага vB-PaP-20 специфичный к *Pseudomonas aureginosa* сохранял свою активность в течение 526,4 суток. Стоит отметить, что данная методика позволяет провести оценочные сроки хранения. Полученные данные позволили не вносить консерванты в состав средства «Ветагин» для производства опытно-промышленных серий. Опытно-промышленные серии произвели на «АВЗ С-П», технологический процесс заключался только в смешивании фаголизатов с буферным раствором (натрий-фосфатный буфер). Долгосрочные испытания проводили в течение 12 месяцев с момента производства конечной формы, в результате было установлено, что титр всех бактериофагов, входящих в состав средства «Ветагин» при температурном режиме хранения 2-8 °С на протяжении 12 месяцев не меняется.

Полученные данные по срокам экспериментального хранения позволили приступить к изучению эффективности *in vivo* средства «Ветагин». Исследования проводили в опытах с экспериментальным заражением самок белых мышей массой 18-20 г 3-4 недельного возраста видами бактерий, определенными нами как этиопатогенные при эндометритах у коров. В нашей работе мы не устанавливали степень вирулентности циркулирующих штаммов. Соответственно для изучения эффективности средства «Ветагин» использовали паспортизированные штаммы бактерий коллекции НПЦ «МикроМир» с установленными дозами LD₅₀. В целях изучения эффективности использовали дозы 5LD₅₀ с различными методами заражения, которые зависели от вида бактерии, отобранные штаммы с методом заражения представлены: *Trueperella pyogenes* 101/R внутрибрюшинно, *Escherichia coli* ATCC 1271 внутрибрюшинно, *Enterococcus faecalis* 41 внутрибрюшинно, *Staphylococcus aureus* VRA 85 внутривенно (в хвостовую вену), *Bacillus cereus* 354 подкожно, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 327 85 внутривенно (в хвостовую вену), *Pseudomonas aureginosa* ATCC 678 внутрибрюшинно. Метод

введения средства «Ветагин» идентичен выбранному методу заражения. Исследования провели по двум направлениям – фагопрофилактика (заражение за 1, 24, 48 часов до введения фагов) и фаготерапия (заражение после 1, 24, 48 часов до введения фагов). Установлено, что защитная активность средства «Ветагин» имела прямую зависимость от интервала между заражением и введением препарата, чем интервал был меньше, тем эффективность применения возрастала. Так, профилактическая эффективность составила $75,7 \pm 5,3$ %, $72,9 \pm 4,9$ %, $65,7 \pm 9,8$ % за 1, 24 и 48 ч до заражения соответственно. Высеваемость изолятов бактерий из внутренних органов мышей составила $2,9 \pm 0,2$ %, $3,2 \pm 0,2$ %, $3,1 \pm 0,1$ % при введении препарата за 1, 24 и 48 ч до заражения соответственно. Отмечены статистически значимые различия внутри опытных групп при сравнении методики введения за 1 и 48 до заражения ($p < 0,05$). Введение препарата за 1 ч до заражения более эффективно, чем введение препаратов за 48 ч. Терапевтическая эффективность составила $82,9 \pm 5$ %, $72,9 \pm 5$ %, $67,1 \pm 8$ % при введении средства через 1, 24 и 48 ч после заражения соответственно. Высеваемость изолятов бактерий из внутренних органов мышей составила $2,8 \pm 0,2$ %, $3,2 \pm 0,1$ %, $3,5 \pm 0,3$ % при введении препарата через 1, 24 и 48 ч после заражения соответственно. Результаты экспериментов позволили сделать заключение об эффективности препарата «Ветагин» при фагопрофилактике и фаготерапии экспериментальных инфекций, вызванных специфичными видами бактерий, а также об перспективности практического применения нового средства.

Успешное проведение доклинических исследований позволило нам провести I фазу клинических испытаний препарата «Ветагин». Первую фазу проводили на здоровых животных с целью отслеживания возможных нежелательных лекарственных реакций. С этой целью отбирали по 5 клинически здоровых коров в 4 хозяйствах, введение препарата осуществляли внутриматочно, следовательно, необходимо было отобрать животных с открытым каналом шейки матки. В результате исследований изменений, вызванных применением коктейля бактериофагов, не отмечали.

После подтверждения безопасности нового коктейля бактериофагов перед нами стояла задача по отработке методик применения и созданию первичной инструкции по применению. В результате определили оптимальную разовую дозу препарата – 100 мл, такой объём препарата при введении через внутриматочный катетер равномерно распределялся на вентральной стороне матки, также данная доза была обусловлена возможной потерей части препарата как при введении, так и после вследствие сокращений матки. Скорость взаимодействия бактериофагов в составе средства с клетками бактерий, как мы установили, в среднем составляет 27-60 мин., таким образом, препарат должен находиться внутри матки не менее чем 60 мин после введения. Стоит отметить, что дозы и кратность применения для разных форм и течений заболевания могут корректироваться в процессе широкомасштабного проведения клинических испытаний. На первых этапах апробаций предложено однократно применять препарат для профилактики послеродовых эндометритов в первые 7 дней после отела, для терапевтического использования не менее двух раз с интервалом 48 часов. Это согласуется с немногочисленными данными по применению бактериофагов при эндометритах у коров [28, 150].

Оценку эффективности разработанного метода профилактики и терапии эндометритов бактериального этиопатогенеза проводили в сравнении с традиционными схемами профилактики и лечения послеродового эндометрита, используемыми в хозяйствах. Отмечено, что с применением антибиотиков и химиотерапевтических антибактериальных препаратов разных групп в разных производственных условиях предложенная схема биопрофилактики не уступала в эффективности в хозяйствах «Озерецкое», «Колхоз Гжельский», «Лесные Поляны».

В хозяйствах «Кузьмино» и «НИВА», профилактическая эффективность препарата «Ветагин» оказалась недостаточной и ниже, чем в группах сравнения на 40 и 10 % соответственно. При изучении эффективности в данных хозяйствах было установлено, что в 50 % случаев у заболевших коров были обнаружены

определённые нами ранее актуальные виды бактерий *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, при этом также присутствовала грибковая микрофлора, представленная *Geotrichum silvicola*. Это позволило в перспективах развития данного направления фагопрофилактики и фаготерапии эндометритов на молочной ферме установить направления совершенствования средства для универсализации его применения. Так, состав средства необходимо дорабатывать, в том числе добавлять бактериофаги разных семейств специфичных к одному виду бактерий. Это позволит увеличить шанс лизиса клетки-мишени за счет разного механизма адсорбции бактериофагов, отличных друг от друга, на клеточной стенке бактерий. Также, предложенные методики применения препарата, скорее всего будут корректироваться в процессе широкого использования в ветеринарной практике, сформировав наиболее эффективные схемы применения.

Расширенные клинические исследования по применению препарата «Ветагин» с целью изучения профилактической эффективности проводили на базе МТФ «Озерецкое». В результате исследований за период с применением антибиотиков апрель 2015 – апрель 2016 (период I) года отелилось 821 корова, из всех отелившихся коров из исследований исключили 40 коров. За период июнь 2016 – июнь 2017 (период II) года отелилось 715 коров из которых выбраковали 45 коров. Стоит отметить, что для сравнения данных двух периодов мы включали только тех коров, которые попадали в оба периода наблюдений (связанные выборки), чтобы установить возможную статистически достоверную разницу по уровню заболеваемости и протяженности сервис-периода. При помощи методов статистического анализа мы установили, что различия по сервис периодам статистически не значимы – $118,63 \pm 32,6$ (период I), $108,25 \pm 27,3$ (период II). Статистический анализ данных заболеваемости выявил различия между первым и вторым периодами наблюдений $12,23 \pm 0,31$ (период I), $10,9 \pm 0,35$ (период II), $12,23 \pm 0,31$ и $10,9 \pm 0,35$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$, показав, что заболевших в II период достоверно меньше. Однако различия в показателях заболеваемости

между двумя периодами минимальны, что может объясняться воздействием факторов, не связанных с патологиями матки, которые трудно учесть при статистической обработке данных. Результаты исследований показывают, что длительное внутриматочное применение бактериофагов не оказывает негативного влияния на плодотворное осеменение коров, что подтверждается отсутствием различий с период применения антибиотиков.

В ранних исследованиях на возможность применения бактериофагов на молочно-товарных фермах мы установили, что интрацистернальное введение бактериофагов вызывает выраженную реактогенную реакцию со стороны молочной железы, проявляющуюся в отеке соскового канала и долей вымени, резком увеличении количества соматических клеток до уровня значений предельных для измерения при помощи аппаратного метода с использованием «Соматосмини». Как показали исследования, концентрация и видоспецифичность бактериофагов в вводимой интрацистернально дозе не сказывается на выраженности ответной реакции организма. Поскольку соматические клетки, элиминирующиеся с цельным молоком служат показателем физиологического состояния молочной железы и организма в целом, так, при развитии заболеваний, в том числе не связанных с молочной железой, количество соматических клеток возрастает [58, 82], перед нами стояла задача по изучению возможного влияния бактериофагов на молочную железу при их внутриматочном введении. Прежде всего необходимо было установить: выводятся ли бактериофаги с молоком при их внутриматочном введении. С этой целью мы отбирали образцы молока и крови до и после применения средства «Ветагин», образцы крови отбирали с целью изучения возможной персистенции бактериофагов в кровяном русле при данном способе введения. При исследовании образцов молока в его составе бактериофагов средства «Ветагин» не обнаружено. Из образцов крови после применения средства «Ветагин» нами был выделен бактериофаг, специфичный к бактериям вида *Escherichia coli*. Однако изучение литической активности при помощи методов Аппельмана

и Грация, литического спектра, а также морфометрического изучения выделенного бактериофага показали, что идентифицированный фаг отличается от фага vB-EcM-04, внесенного в состав средства «Ветагин». Несмотря на полученные результаты, необходимо продолжить данные исследования с расширением исследовательской базы и привлечением методов генетического анализа.

В связи с полученными результатами необходимо было провести изучение влияния внутриматочного введения бактериофагов на количество соматических клеток в молоке. Проведенные исследования показали, что количество соматических клеток в молоке животных, получивших средство «Ветагин» остается неизменным на протяжении 14 суток после введения.

Таким образом, в ходе работы были установлены наиболее значимые в развитии послеродовых эндометритов виды бактерий: *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Porphyromonas levii*, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae*. Практически во всех случаях исследований образцов маточного содержимого нами идентифицировались ассоциации микроорганизмов, что сильно затрудняет установление возбудителей эндометритов. Это дало обоснование созданию средства на основе коктейля бактериофагов, в состав которого входят литически активные специфичные фаговые частицы к большинству доминирующих при данном заболевании бактериальных штаммов. Согласно такому подходу выделенные нами штаммы бактериофагов-претендентов прошли изучение биологических свойств, на основании чего были внедрены в состав препарата «Ветагин».

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Послеродовой эндометрит у коров как болезнь, вызванная убиквитарными патогенными и условно-патогенными бактериями на фоне провоцирующих факторов, является актуальной проблемой. Эндометриты обусловлены технологиче-

ской нагрузкой на животных, ненадлежащим содержанием, несбалансированностью рациона, недостаточным моционом, отсутствием комплексного подхода к обеспечению здоровья у коров. Решение задачи по профилактике и лечению эндометритов у коров требует переориентирования медикаментозного вмешательства.

Предложенные средство и метод могут существенно снизить употребление антибиотиков. Применения средства с бактериофагами *Ph. Tr. pyogenes* 2, *vB-EcM-04*, *vB-EfS-027*, *vB-PvS-22*, *Ph. B. cereus* F, *Ph. S haemolyticus* 9, *vB-SaM-9,1*, *vB-PaP-20*, *vB-SpM-293* специфичные к *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae* при однократном внутриматочном введении в первые дни после отела в дозе 100 мл с титром фагов не менее $1,0 \times 10^6 - 9,9 \times 10^7$ БОЕ/см³ обеспечивает достаточную пристеночную защитную активность. Разработанное средство позволяет нивелировать образование антибиотико-резистентных штаммов бактерий в условиях МТФ при профилактике и лечении эндометритов коров и подходит к биологическим методам борьбы с стороны урегулирования отношений холобионта.

5. ВЫВОДЫ

На основании результатов исследований были сделаны выводы:

1. Этиопатогенные бактерии при послеродовых эндометритах у коров представлены видами *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Clostridium perfringers*, *Streptococcus agalactiae*, среди которых доминирующими являются *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*.

2. В большинстве случаев (86,9 %) заболевание сопровождается ассоциативным действием убиквитарных бактерий. Из них ассоциация *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli* встречается в 40-86 % случаев. Только в 13,1 % при выраженных клинических признаках эндометрита из полового аппарата коров

идентифицирован один вид микроорганизмов – *Porphyromonas levii* (7 клинических случаев), *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* и *Staphylococcus haemolyticus* по 6, *Clostridium perfringers* – 4, *Staphylococcus aureus* – 3, *Streptococcus agalactiae* (2 клинических случая).

3. Идентифицированные изоляты бактерий обладали типичными биологическими свойствами, характерными для вида. Большинство (55-100 %) циркулирующих штаммов *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Clostridium perfringers*, *Streptococcus agalactiae* обладали патогенностью для лабораторных объектов, а также колонизационной способностью для слизистой матки коров.

4. Выделенные из естественных источников бактериофаги-претенденты *Phagum Trueperella pyogenes* 2, *vB-EcM-04*, *vB-EfS-027*, *vB-PvS-22*, *Phagum Bacillus cereus* F, *Phagum Staphylococcus haemolyticus* 9, *vB-SaM-9,1*, *vB-PaP-20*, *vB-SpM-293*, гомологичные к бактериям соответственно *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae*, обладали основными свойствами производственных штаммов, такими как: литическая активность не менее 10^{-7} по методу Аппельмана, широкий литический спектр, высокая урожайность (90-280 фаговых частиц в системе единичного цикла развития, за исключением бактериофага *Phagum Trueperella pyogenes* 2). Выделенные бактериофаги принадлежат к семействам *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*.

5. На основе коктейля из бактериофагов разработано средство для профилактики и лечения эндометритов у коров. Степень многоступенчатой очистки нового средства с использованием высокоскоростного центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия позволила получать фильтраты фаговых ча-

стиц с концентрацией белка и липополисахаридов 10 ± 2 мкг/мл и 5 ± 1 мкг/мл. соответственно. Хранение биопрепарата при температуре 2-8 °С в течение 376 дней не снижает титр каждого из фагов в его составе.

6. Разработанное инновационное средство – «Ветагин» на основе фагового коктейля против актуальных бактерий-патогенов, участвующих в возникновении и развитии послеродовых эндометритов у коров, обладает профилактической эффективностью на уровне 50-80 % при однократном применении в течение первых 7 суток после отела в дозе 100 мл.

7. Новое средство «Ветагин» показало 60-100 % уровень терапевтической эффективности при доклинической и широкой клинической апробации на целевых объектах. Метод лечения на основе нового средства (коктейля бактериофагов) при послеродовых эндометритах бактериального этиопатогенеза у коров не уступает по эффективности комплексным терапевтическим схемам с использованием антибиотиков и может являться им альтернативой.

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров в составе комплексной терапии рекомендуется использовать новое средство «Ветагин» в качестве этиотропного и патогенетического метода, воздействующего на патогенную и сапрофитную микробиоту полового аппарата больных коров. Данный метод позволяет отказаться от использования антибиотиков или минимизировать их использование при эндометритах у коров.

Профилактику послеродовых эндометритов рекомендуется осуществлять разработанным средством «Ветагин»: введение препарата проводить в первые 7 дней после отела в дозе 100 мл с кратностью применения 1-2 раза с интервалом 24 часа в зависимости от состояния животного. Для лечения эндометритов рекомендуется использовать литически активные бактериофаги, например, коктейль в основе экспериментального средства «Ветагин» в разовой дозе не менее 100

мл, с кратностью 2 и более раз, до выздоровления, с интервалом между введениями 24-48 часов.

7. ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ НАУЧНОЙ РАБОТЫ

Дальнейший систематический постоянный поиск вирулентных бактериофагов к *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus agalactiae* позволит отбирать производственно перспективные бактериофаги для включения в состав препарата «Ветагин» и совершенствования его лечебно-профилактических свойств.

Также, перспективным направлением является изучение возможности применения экспериментального средства «Ветагин» для свиноматок, т.к. этиопатогенные бактерии, по литературным данным, вызывающие и отягощающие течение эндометритов у коров, актуальны и при эндометритах у свиноматок.

8. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеенко, В.С. Перинатальная патология и методы ее коррекции у крупного рогатого скота (клинико-экспериментальное исследование) // автореферат дисс. ...кандидата ветеринарных наук. Вр.: 1993 – 43 с.
2. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Издательство иностранной литературы, 1961. – 587 с.
3. Азибежян, А.С. Антибиотики в нашей пище / А.С. Азибежян, В.А. Курьсько, Г.Н. Заичко // Успехи в химии и химической технологии. – 2013. – Т. 5. – № 145. – С. 123-126.
4. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть I: История исследований до широкого применения антибиотиков / А.В. Алешкин [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – № 2. – С. 8-16.
5. Алешкин, А.В. Исторический обзор опыта применения бактериофагов в России [Электронный ресурс] // Медицинский совет. – 2015. – № 7. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/istoricheskiy-obzor-opyta-primeneniya-bakterio-fagov-v-rossii> (дата обращения: 06.11.2018).
6. Артемьева, О.А. Антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока высокопродуктивных коров / О.А. Артемьева [и др.] // С.-х. биол., Сельхозбиология, S-h biol, Sel-hoz biol, Sel'skokhozyaistvennaya biologiya, Agricultural Biology. – 2016. – № 6. – С. 867-874.
7. Асланов, Б.И. Бактериофаги - эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам // Медицинский Совет. – 2015. – № 13. – С. 106-110.
8. Афонюшкин, В.Н. Нанобойболиты бактериофаги как альтернатива антибиотикам в ветеринарии / В.Н. Афонюшкин, М.Л. Филипенко, Ю.Н. Козлова // Наука из первых рук. – 2016. – Т. 4. – № 70. – С. 82-87.
9. Баймишев, М.Х. К этиологии послеродовых осложнений у коров черно-пестрой породы / М.Х. Баймишев, В.С. Григорьев // Известия ОГАУ. – 2009. – Т. 22. – № 2. – С. 267-269.

10. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Под. Ред. Элизабет Каттер, Александра Сулаквелидзе // Пер. с англ. Коллектив переводчиков; науч. Ред. А.В. Летаров. – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.: ил. Э. Картер и Сулаквелидзе.
11. Басалгина, М.А. Задержание последа у коров в условиях молочно-товарной фермы // Молодежь и наука. – 2017. – № 4. – С. 19;
12. Батаева, Д.С. Риски, связанные с наличием в мясе и в продуктах убоя животных остаточных количеств антимикробных препаратов / Д.С. Батаева, Е.В. Зайко // Теория и практика переработки мяса. – 2016. – № 3. – С. 4-12
13. Белова, И.Н. Рынок органических продуктов: мировые тенденции и перспективы развития в России / И.Н. Белова, Е.А. Карслянц // Вестник РУДН. Серия: Экономика. – 2014. – № 2. – С. 40-48.
14. Бондаревич, Н.В. Бактериофаги и иммунный ответ организма человека / Н.В. Бондаревич, Г.И. Новик // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. – 2015. – № 2. – С. 112-116.
15. Бондарчук, П.М. Динамика основных иммунологических параметров у коров при послеродовом эндометрите и возможность их коррекции // автореферат дисс... кандидата ветеринарных наук. М.: 2003 – 18 с.
16. Борисович, Л.М. Продукты функционального назначения и их роль в питании человека / Л.М. Борисович, Л.Н. Зонова // Вятский медицинский вестник. – 2010. – №. 2. – С. 48-53.
17. Вахитов, И.И. Изучение этиологии и распространения послеродовых эндометритов у коров в хозяйствах Республики Татарстан / И.И. Вахитов [и др.] // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2012. – № 3. – С.229-232.
18. Войтенко, Л.Г. Система комплексной фармакотерапии острого послеродового эндометрита у коров // автореферат дисс. ... доктора ветеринарных наук. КРД.: 2012 – 41 С.
19. Воробьев, Н.Н. Формирование и расширение рынка экологически чистой сельскохозяйственной продукции / Н.Н. Воробьев, А.Н. Потапова // Вестник

- Адыгейского государственного университета. Серия 5: Экономика. – 2013. – Т. 1. – № 115. – С. 6.
20. Всемирная Организация Здравоохранения Выступление гендиректора ВОЗ М. Че [Электронный ресурс].
[URL: http://www.who.int/dg/speeches/2012/amr_20120314/ru/](http://www.who.int/dg/speeches/2012/amr_20120314/ru/) (дата обращения 09.09.2016).
21. Всемирная Организация Здравоохранения Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам [Электронный ресурс]. URL: http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_Russian.pdf (дата обращения 09.09.2016).
22. Вяткин А.Н. Цитологическая диагностика эндометритов у коров / А.Н. Вяткин // Науч. труды Омского вет. института 1974. - Т. 30. – № 2. – С. 7177.
23. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб; под ред. и с предисл. В. Д. Тимакова. – М.: Медгиз. – 1961. – 297 с.
24. Горпинченко, Е.А. Причинно-следственные факторы функционального расстройства матки и яичников у коров на промышленных фермах / Е.А. Горпинченко, А.Н. Шевченко, А.Н. Турченко // Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. – 2016. – № 121. – С. 1-9.
25. Горпинченко, Е.А. Факторы, способствующие возникновению функциональных расстройств родополового аппарата у коров / Е.А. Горпинченко, И.С. Коба, М.Н. Лифенцова // Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. – 2016. – № 121. – С. 1-10.
26. Грига, О.Э. Причины, способствующие возникновению гнойно-катарального эндометрита у коров / О.Э. Грига, С.Е. Боженков, Э.Н. Грига // Сборник научных трудов ВНИИОК. – 2013. – V. 6. – № 1. – С. 4.
27. Грига, О.Э. Применение низкоинтенсивного лазерного излучения для лечения послеродового гнойно-катарального эндометрита у коров / О.Э. Грига, С.Е. Боженков, Э.Н. Грига // Сборник научных трудов ВНИИОК. – 2013. – Т. 6. – № 1. – С. 7.

28. Григорьева, Г.И. Эффективность применения биологических препаратов (пробиотики и бактериофаги) при лечении коров острым течением эндометрита / Г.И. Григорьева, И.В. Гордеева, М.А. Кульчицкая, Т.А. Аникина // ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ: статья в журнале - материалы конференции – 2006. – № 1. – С. 52-56.
29. Григорьева, Т.Е. Оценка комплексных способов лечения эндометритов у коров с использованием акупунктуры, эндометромага-био и иммуномодуляторов / Т.Е. Григорьева, Н.С. Сергеева // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2013. – Т. 5. – № 36. – С. 51-53.
30. Григорьева, Т.Е. Эффективность лечения острого эндометрита у коров с использованием лазеропунктуры / Т.Е. Григорьева, С.Г. Кондручина, Л.А. Трифонова // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2014. – № 3. – С. 136-140.
31. Гриценко, С.В. Спектрофотометрическое определение амидопирина и анальгина в таблетках / С.В. Гриценко, Л.Е. Щедрина, Л.И. Брутко // Фармация. – 1975. – Т. 24. – № 2. – С. 77-79.
32. Данилова, Н.В. Мультирезистентность бактерий к ветеринарным антибиотикам в образцах навоза и помета сельскохозяйственных животных / Н.В. Данилова, П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – №4. Т. 158, кн. 4 – С. 507–516.
33. Дегтярев, В.П. Профилактика бесплодия, вызванного половыми инфекциями у молочных коров / В.П. Дегтярев, С.В. Федотов, Г.М. Удалов // Вестник АГАУ. – 2015. – № 12. – С. 118-122.
34. Денисова, Н.В. Отечественный и зарубежный опыт производства молока // Вестник НГИЭИ. – 2012. – №1. – С. 32-38.
35. Додова, Е.Г. Постантибиотиковая эра: бактериофаги как лечебная стратегия / Е.Г. Додова, Е.А. Горбунова, И.А. Аполихина // Медицинский совет. – 2015. – № 11. – С. 49-53.

36. Дроздова, Л.И. Патоморфология плацентарного барьера животных / Л. И. Дроздова; рец.: В. И. Плешакова, А. Ф. Колчина; Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, ФГОУ ВПО "Уральская государственная сельскохозяйственная академия". – Екатеринбург: УрГСХА. – 2011. – 245 с.
37. Дыдыкин, А.С. Функциональные продукты на мясной основе /А.С. Дыдыкин, М.А. Асланова // Журнал Все о мясе. – 2015. – № 6. – С. 28-29.
38. Епанчинцева, О. С. Патоморфологические изменения в матке коров при послеродовом гнойном эндометрите // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2013. – № 2. – С. 178-192.
39. Епанчинцева, О.С. Микробный пейзаж содержимого матки и секрета молочной железы / О.С. Епанчинцева, С.О. Семеруненко // Вестник ветеринарии. – 2012. – №. 4. – С. 42-44.
40. Ефимочкина, Н.Р. Антибиотикорезистентность штаммов *Campylobacter jejuni*, выделенных из пищевых продуктов / Н.Р. Ефимочкина, Ю.В. [и др.] // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86. – № 1. – С. 17-27.
41. Забровская, А.В. Чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства // Farm Animals. – 2013. – № 1. – С. 78-83.
42. Закирова, С.В. Влияние бактоцеллолактоина на бактериальную и цитологическую картину половых органов коров / С.В. Закирова, Е.В. Паньков, А.А. Ивановский // Достижения науки и техники АПК. – 2007. – № 9. – С. 28-29.
43. Зуева, Л. П. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике ИСМП / Л.П. Зуева, И. Асланов, В. Г. Акимкин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т.1. – № 74. – С. 43-49.
44. Зурабов, А. Ю. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов / А.Ю. Зурабов [и др.] // Биомедицина. – 2012. – № 1. – С. 134-138.
45. Зурабов, А.Ю. Снова о фаготерапии: что не так, а что так? / А.Ю. Зурабов, Е.Л. Жиленков, В.М. Попова // МС. – 2016. – № 16. – С. 44-50.

46. Иванов, А.В. Потенциал и перспективы производства экологически чистой продукции сельского хозяйства в трансграничных регионах Алтая и Монголии / А.В. Иванов, В.А. Кундиус // Вестник АГАУ. – 2014. – Т. 11. – № 121. – С. 149-155.
47. Иванова, Е.А. Микробный пейзаж матки у коров голштино-фризской породы при остром послеродовом гнойно-катаральном эндометрите / Е.А. Иванова [и др.] // ОНВ. – 2015. – Т. 2. – № 144. – С. 211-214.
48. Ильина, Т.С. Нитчатые бактериофаги и их роль в вирулентности и эволюции патогенных бактерий // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – № 1. – С. 3-10.
49. Камилов, М.К. Органическая продукция сельского хозяйства - одно из актуальных направлений экологизации АПК / М.К. Камилов [и др.] // РППЭ. – 2017. – Т. 5. – № 79. – С. 20-28.
50. Камошенков, А.Р. Использование фильтрата культуры *B. subtilis* для терапии эндометритов коров / А.Р. Камошенков [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2009. – № 4. – С. 9-11.
51. Коба, И.С. Распространение острых и хронических эндометритов у коров в сельскохозяйственных организациях Краснодарского края / И.С. Коба, М.Б. Решетка, М.С. Дубовиков // Вестник АГАУ. – 2016. – Т. 2. – № 136. – С. 103-106.
52. Косолович, Л.Н. Микрофлора содержимого матки коров при послеродовых эндометритах и ее чувствительность к антибактериальным средствам и прополису / Л.Н. Косолович, И.С. Николаевна // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2013. – Т. 1. – № 21. – С. 83-88.
53. Красочко, П.А. Комплексное использование пробиотических препаратов с аспарагиновой аминокислотой для лечения коров с послеродовым эндометритом / П.А. Красочко, Т.В. Снитко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2012. – Т. 15. – № 2. – С. 338-342.

54. Кузьмич, Р.Г. Послеродовые эндометриты у коров (этиология, патогенез, профилактика и терапия) // автореферат дисс. ... кандидата ветеринарных наук. Вб.: 2010 – 39 с.
55. Лапина, М.Н. Этиология временного и постоянного бесплодия коров чернопестрой породы / М.Н. Лапина, В.А. Витол, Г.П. Ковалева // Сборник научных трудов ВНИИОК. – 2013. – Т. 6. – № 1. – С. 2.
56. Лободин, К.А. Фундаментальные и прикладные аспекты контроля за воспроизводительной функцией молочных коров в сухостойный и послеродовый период / К.А. Лободин, А.Г. Нежданов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. – № 3. – С. 97-103.
57. Локтев, Д.Б. Продукты функционального назначения и их роль в питании человека / Д.Б. Локтев, Зонова Л.Н. // Вятский медицинский вестник. – 2010. – № 2. – С. 48-51.
58. Макаров, А.В. Морфо-биохимические и физико-химические показатели крови и молока в зависимости от состояния здоровья животных // Вестник КрасГАУ. – 2008. – №4. – С. 190-193.
59. Марцинковская, И.В. Эпизоотологические аспекты эндометритов крупного рогатого скота, оптимизация системы лечебно-профилактических мероприятий с использованием пробиотиков: дис. Канд. Вет. Наук: 16.00.03: защищена 2008: СПб., 162 с.
60. Медведев, Г.Ф. Задержание последа у коров: этиология и патогенез / Г.Ф. Медведев, Н.И. Гавриченко, В.С. Бегунов // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2010. – Т. 13. – № 2. – С. 361-367.
61. Медведев, Г.Ф. Частота проявления, лечение и профилактика болезней метритного комплекса // Актуальные проблемы ветеринарного акушерства и репродукции животных: материалы Международной научно-практической конференции. – Горки. – 2013. – С. 465-473.
62. Медицинская статистика [Электронный ресурс]: Открытый доступ, URL: <http://www.medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html>.

63. Министерство здравоохранения Российской Федерации «Актуальность решения проблемы резистентности к противомикробным препаратам для достижения ЦУР, в особенности, связанных со здоровьем» Материал опубликован 21 сентября 2016. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/news/2016/09/21>.
64. Мищенко, В.А. Анализ причин заболеваний высокопродуктивных коров // Вестник ОрелГАУ. – 2008. – № 2. – С. 20-24.
65. Музартаяев, Р.Э. Особенности диагностики у коров в начале острого послеродового эндометрита и субинволюции матки / Р.Э. Музартаяев, Н.О. Ляшенко, В.С. Авдеенко, Д.В. Кривенко // Дальневосточный аграрный вестник. – 2016. – Т. 2. – № 38. – С. 62-68.
66. Нежданов, А. Г. Болезни органов размножения у коров и проблемы их терапии, диагностики и профилактики / А. Г. Нежданов, В. Д. Мисайлов, А. Г. Шахов // Актуальные проблемы болезней органов размножения и молочной железы у животных: материалы Международной научно-практической конференции. – Воронеж. – 2005. – С. 8-11.
67. Николаев, С.В. Заболеваемость коров разного возраста послеродовым эндометритом в условиях привязного содержания и его профилактика с применением озонированной эмульсии / С.В. Николаев, И.Г. Конопельцев // Пермский аграрный вестник. – 2016. – Т. 2. – № 14. – С. 133-139.
68. «Общая фармакопейная статья 1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств»»: информационный портал о регистрации лекарственных средств в России: [сайт]. URL: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0009-15-sroki-godnosti-lekarstvennyh-sredstv/>.
69. Олейник, А. Экономика в ветеринарии современного молочного комплекса // Молочное и мясное скотоводство. – 2012. – спецвыпуск по молочному скотоводству. – С. 37-39.
70. Ошуркова, Ю.Л. Опыт применения прибора detA Ritm-13 при лечении гнойного эндометрита у коров / Ю.Л. Ошуркова, Е.С. Баруздина, А.Ф. Мякшин // Молочнохозяйственный вестник. – 2014. – Т. 4. – № 16. – С. 22-27.

71. Пименов, Н.В. Перспективы применения бактериофагов в ветеринарии // Ветеринария и кормление. – 2009. – № 5. – С. 34-35.
72. Поносов, С.В. Адаптационная пластичность голштинского скота при применении Витадаптина и Имунофана / С.В. Поносов, Н.В. Старцева // Известия ОГАУ. – 2016. – Т. 6. – № 62. – С. 108-110.
73. Пошвина, Д.В. Антибиотикорезистентность клинических изолятов бактерий рода *Enterococcus*, выделенных от животных / Д.В. Пошвина, М.В. Сычёва // БОНЦ УрО РАН. – 2014. – № 3. – С. 9.
74. Пристяжнюк, О. Н. Новый препарат «Утеромастин» при лечении послеродовых осложнений у коров / О.Н. Пристяжнюк [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. – № 3. – С. 145-148.
75. Прытков, Ю. А., Вареников М. В. Использование фитопрепаратов для нормализации воспроизводительной функции у коров / Ю.А. Прытков, М.В. Вареников // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 10. – С. 49-51.
76. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты) Часть вторая./ Под ред. А.Н. Мироннова - М., 2012. – 212 С.
77. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты) Часть вторая./ Под ред. А.Н. Мироннова - М., 2012. – 212 С.
78. Сафина, Д.Д. Н. *pylori*, микробиота кишечника, антибиотикорезистентность: есть ли взаимосвязь? / Д.Д. Сафина, [и др.] // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 3. – С. 248-252.
79. Сбойчаков, В.Б. Бактериофаги как альтернатива обозримого финиша эры антибиотиков / В.Б. Сбойчаков [и др.] // V Лужские научные чтения. Современное научное знание: материалы международной научной конференции. – СПб.: Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина. – 2017. – С. 160-164.

80. Светоч Э.А., Антибиотикорезистентность культур *Enterococcus* spp., выделенных от промышленной птицы в 2013–2016 гг. В хозяйствах Российской Федерации, и детекция у них генов резистентности к ванкомицину / Э.А. Светоч [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2017. – Т. 2. – № 45. – С. 138-146.
81. Семина, Л.К. Чувствительность микрофлоры, выделенной из секрета вымени больных маститом коров, к препаратам пролонгированного действия / Л.К. Семина, Т.Г. Ворошилова, Е.В. Ремизова // Российский ветеринарный журнал. – 2015. – № 2. – С. 22-23.
82. Соболева, Н.В. Влияние генотипа коров по каппа-казеину на морфологический состав соматических клеток в молоке / Н.В. Соболева, С.В. Карамаев, А.С. Карамаева // Известия ОГАУ. – 2016. – Т. 57. – № 1. – С. 96-98.
83. Стальная, М.И. О пользе использования низкокалорийных молочных продуктов / М.И. Стальная, Т.И. Сидорина // Новые технологии. – 2006. – № 1. – С. 4.
84. Столярова, О.А. Повышение конкурентоспособности и эффективности молочнопродуктового подкомплекса // Нива Поволжья. – 2017. – Т. 3. – № 44. – С. 147-155.
85. Студенцов, А.П. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, В.Я. Никитин и др. М: Колос. – 2000. – С. 495.
86. Тагиров, Х.Х. Трансформация протеина и энергии рационов в продукцию [Электронный ресурс] / Х.Х. Тагиров, Э.М. Андриянова, Ю.А. Карнаухов // Известия ОГАУ. – 2010. – № 26-1.
87. Татаринова, С.С. Применение штаммов *Bacillus subtilis* в профилактике послеродовых осложнений коров австрийской селекции в условиях Якутии / С.С. Татаринова, М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 5. – С. 66-68.

88. Терентьева, Н.Ю. Роль микроорганизмов в этиологии акушерских заболеваний коров / Н.Ю. Терентьева, В.А. Ермолаев // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2015. – Т. 4. – № 32. – С. 147-155.
89. Терентьева, Н.Ю. Профилактическая эффективность фитопрепаратов при патологии послеродового периода у высокопродуктивных молочных коров: Дисс. соиск канд. вет. наук. – Ульяновск, 2004. – 173 с.
90. Топурия, Л.Ю. Влияние препаратов природного происхождения на воспроизводительную способность и иммунный статус коров / Л.Ю. Топурия, Г.М. Топурия // Вестник АГАУ. – 2007. – Т. 5. – № 31. – С. 52-55.
91. Туркутюков, В. Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам [Электронный ресурс] // ТМЖ. – 2011. – Т. 2. – № 44. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarno-geneticheskiy-monitoring-rezistentnosti-mikroorganizmov-k-antibiotikam> (дата обращения: 14.03.2017).
92. Устарханов, П.Д. Патоморфологические изменения при эндометритах у коров / П.Д. Устарханов, М.Г. Халипаев, И.М. Азизов // Известия ОГАУ. – 2014. – № 1. – С. 76-79.
93. Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. М., URL: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/enterprise/economy/ (дата обращения 26.12.2016).
94. Феоктистова, Н.А. Выделение бактериофагов рода *Proteus* и подбор параметров культивирования / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской ГСА. – 2017. – Т. 38. – № 2. – С. 90-96.
95. Филиппова, И. А. Бактериофаги - работа над ошибками антибиотикотерапии // Ремедиум. – 2015. – № 6. – С. 36-39.
96. Хлебопрос, Т.Р., Исследование взаимодействия в системе фаг бактерия / Т.Р. Хлебопрос, М.И. Теремова, Т.И. Письман // Микробиология. – 1980. – Т. XLIX. – № 3. – С. 507-512.
97. Шевкунова, Е.С. Анализ уровня потребления продуктов питания // Научный журнал КубГАУ. – 2014. – Т. 101. – № 7. – С. 1-16.

98. Шкиль, Н.Н. Динамика изменения антибиотикочувствительности у возбудителей заболеваний молодняка крупного рогатого скота // Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. – 2011. – № 72. – С.1-13.
99. Шульга, Н.Н. К проблеме антибиотиков в продуктах животноводства / Н.Н. Шульга, И.С. Шульга, Л.П. Плавшак // Дальневосточный аграрный вестник. – 2017. – Т. 4. – № 44. – С. 150-156.
100. Юсупов, С.Р. Результаты изучения содержимого матки при эндометритах коров / С.Р. Юсупов, А.Г. Дарменова, Р.Ф. Мавлиханов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2016. – № 4. – С. 30-35.
101. Яшин, И.В. Коррекция показателей фагоцитоза у коров / И.В. Яшин, Г.В. Зоткин, А.В. Дубинин // Вестник АГАУ. – 2016. – Т. 11. – № 145. – С. 135-139.
102. Яшин, И.В. Показатели адаптивного и неспецифического иммунитета у коров и полученных от них телят / И.В. Яшин [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 2. – С. 180-182.
103. Ackerman H.-W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*. – 2001. – V. 146. – № 7. – P. 843–857.
104. Ackerman H.-W. Tailed bacteriophages. The order Caudoveralis // *Advances in virus research*. – 1998. – V. 51. – P. 135–201.
105. Adhya, S. Therapeutic and Prophylactic Applications of Bacteriophage Components in Modern Medicine / S. Adhya, C. Merrill, B. Biswas // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2014. – V. 4. – № 1. – P. 1-13.
106. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* / David E. Noakes [et al.] - 8 edition: – 2001. – 868 p. ISBN - 978-0-7020-2556-3.
107. Bademkiran, S. Comparison of Pelargoniumsidoide, Placebo and Antibiotic Treatment of Chronic Endometritis in Dairy Cows: A Field Trial / S. Bademkiran [et al.] // *Journal of Animal and Veterinary Advances* – 2009. – V. 8. – № 4. – P. 788-793.
108. Barański, W. Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis / W. Barański [et al.] // *Theriogenology*. – 2013. – V.80. – № 7. – P. 766-772.

109. Barr, J. A bacteriophages journey through the human body // Immunological reviews. – 2017. – V. 279. – №. 1. – P. 106-122.
110. Barr, J. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity / J.J. Barr [et al.] // PNAS. – 2013. – V. 110. – № 26. – P. 10771-10776;
111. Barr, J. Innate and acquired bacteriophage-mediated immunity / M. Youle, F. Rohwer // Bacteriophage. – 2013. – V. 3. – № 3. – P. 6.
112. Barr, J. Subdiffusive motion of bacteriophage in mucosal surfaces increases the frequency of bacterial encounters / J. Bar [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – V. 112. – № 44. – P. 13675-13680.
113. Behr, C. Impact of lincosamides antibiotics on the composition of the rat gut microbiota and the metabolite profile of plasma and feces / C. Behr [et al.] // Toxicology Letters. – 2018. – V. 296. – P. 139-151.
114. Bicalho, M.L.S. Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows / M.L.S. Bicalho [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2017. – V. 100. – № 5. – P. 3850-3862.
115. Biswas, B. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* / B. Biswas [et al.] // Infect Immun. – 2002. – V. 70. – № 1. – P. 204-210.
116. Borre, Y. The Impact of Microbiota on Brain and Behavior: Mechanisms & Therapeutic Potential / Y. Borre [et al.] // Advances in experimental medicine and biology. – 2014. – V. 817. – P. 373-403.
117. Borysowski, J. The effects of T4 and A3/R phage preparations on whole-blood monocyte and neutrophil respiratory burst / J. Borysowski [et al.] // Viral Immunol. – 2010. – V. 23. – № 5. – P. 541–544.
118. Brodzki, P. *Trueperella pyogenes* and *Escherichia coli* as an etiological factor of endometritis in cows and the susceptibility of these bacteria to selected antibiotics / P. Brodzki [et al.] // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2014. – № 17. – P. 657-664.

119. Brussow, H. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion // H. Brussow, C. Canchaya, W.D. Hardt / Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – V 68. – №. 3. – P. 560-602.
120. Canchaya, C. The impact of prophages on bacterial chromosomes / C. Canchaya, G. Fournous, H. Brussow // Mol. Microbiol. – 2004. – V. 53. – № 1. – P. 9-18.
121. CDC Biggest Threats - Antibiotic/Antimicrobial Resistance - CDC. Retrieved 2013, From. https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html
122. Clark, P.F. Bacteriophage active against virulent hemolytic *streptococcus* / P.F. Clark, A.S. Clark // Proc. Soc. Biol. and Med. – 1927. – V 24. – № 7. – P. 635-639.
123. Colvin, M.G. Relationship of bacteriophage to natural and experimental diseases of laboratory animals, with special reference to lymphadenitis of guinea pigs / J Infect Dis. – 1932. – № 51. – P.17-29.
124. d’Herelle, F. Le bacteriophage: son role dans l’immunité. Masson et Cie, Paris, 1921. d’Herelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Compt Rend Acad Sci (Paris) 165: 373-375, 1917.
125. d’Herelle, F. The Bacteriophage and Its Behavior. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Md.: – 1926. Comptes rendus Acad Sci (Paris) 162:570-573, 1916.
126. Dąbrowska, K. Activity of bacteriophages in murine tumor models depends on the route of phage administration / K. Dąbrowska, A. Opolski, J. Wietrzyk // Oncol. Res. – 2005. – V. 15. – № 4. – P. 183–187.
127. Dąbrowska, K. Antitumor activity of bacteriophages in murine experimental cancer models caused possibly by inhibition of beta3 integrin signaling pathway / K. Dąbrowska [et al.] // Acta Virol. – 2004. – V. 48. – № 4. – P.241–248.
128. Dąbrowska, K. Bacteriophage penetration in vertebrates / K. Dąbrowska [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2005. – № 98. – P.7-13.
129. Dhaliwal, G.S. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis / G.S Dhaliwal, R.D Murray, Z. Woldehiwet // Animal Reproduction Science. – 2001. – V. 67. – № 3–4. – P. 135-152.

130. Dufour, N. Commentary: morphologically distinct *Escherichia coli* bacteriophages differ in their efficacy and ability to stimulate cytokine release *in vitro* / N. Dufour [et al.] // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. – № 437. – P. 1-3.
131. Eriksson, F. Tumor-specific bacteriophages induce tumor destruction through activation of tumor-associated macrophages / F. Eriksson [et al.] // J. Immunol. – 2009. – V. 182. – № 5. – P.3105–3111.
132. Esposito, G. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows / G. Esposito, P.C. Irons, E.C. Webb, A. Chapwanya // Anim. Reprod. Sci. – 2014. – V. 144. – № 3-4. – P. 60-97.
133. G. Mari, Evaluation of the effectiveness of intrauterine treatment with formosulphathiazole of clinical endometritis in postpartum dairy cows / G. Mari [et al.] // Theriogenology. – 2012. – V. 78. – № 1. – P.189-200.
134. Ghasemi, F. Characterization of Endometritis in Postpartum Dairy Cows. Thesis...Veterinary Medicine MSc Retrieved. – 2011. Режим доступа: https://harvest.usask.ca/bitstream/handle/10388/etd-08272011-210219/FarhadGasemi_MSc_Thesis.pdf
135. Górski, A. Phage therapy: combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases / A. Górski, R. Międzybrodzki, B. Weber-Dąbrowska // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. – № 1515. – P. 1-9.
136. Górski, A. Phages and immunomodulation / A. Górski [et al.] // Journal Article DP, Future Microbiology. – 2017. – V. 12. – № 10. – P.905-914.
137. Górski, A. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens / A. Górski, B. Weber-Dąbrowska // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – V. 62. – P. 511-519.
138. Heuwieser, W. Effect of three programmes for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd / W. Heuwieser [et al.] // Veterinary Record. – 2000. – V. 146. – № 12. – P. 338–341.

139. Jeffrey Morris, J. What is the hologenome concept of evolution? // F1000Research. – 2018. – V. 7. – P. 9.
140. Josué, L. Castro-Mejía Gut microbiota recovery and immune response in ampicillin-treated mice / Josué L. Castro-Mejía [et al.] // Research in Veterinary Science. – 2018. – V. 118. – P. 357-364.
141. Jun Wang, Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR / Jun Wang [et al.] // Anaerobe. – 2016. – V. 38. – P. 1-6.
142. Knudsen, L.R. Molecular characterisation of the uterine microbiome of dairy cows suffering from endometritis, metritis, and pyometra. Thesis... Veterinary Medicine PhD Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark (DTU). – 2014. Режим доступа: http://orbit.dtu.dk/files/119955402/PhD_Thesis_Lif_Knudsen.pdf
143. Koba, I.S. Effective treatment of chronic endometritis in cows by florinazol preparation / I.S. Koba [et al.] // Indian Veterinary Journal. – 2017. – № 94. – P. 15-18.
144. Krueger, A.P. Bacteriophage in experimental *Staphylococcal* septicemia / A.P. Krueger, R. Lich, K.R. Schulze // Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. – 1932. – № 30. – P. 73-75.
145. Kucharski, J. Immuno-endocrine uterine defense mechanisms in bacterial infections // Medycyna Weterynaryjna. – 2003. – № 59. – P. 868-871.
146. LeBlanc, S.J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows / S.J. LeBlanc, T. Osawa, J. Dubuc // Theriogenology. – 2011. – V. 76. – № 9. – P. 1610-1618.
147. Lefebvre, R.C. Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F2 α in postpartum dairy cows with clinical endometritis: An evidence-based evaluation / R.C. Lefebvre, A.E. Stock // Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. – 2012. – V. 28. – № 1. – P. 79-96.
148. Letarov, A.V. Bacteriophages as a part of human microbiome. In: Abedon S.T., Hyman P. Bacteriophages in Health and Disease. MPG Books Ltd. – 2012. – P. 150.

149. Maarten L. De Mol, Hidden antibiotics: Where to uncover? [Электронный ресурс] / Maarten L. De Mol [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2018. ISSN 0734-9750. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.008>.
150. Machado, V.S. The effect of intrauterine administration of mannose or bacteriophage on uterine health and fertility of dairy cows with special focus on *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* / V.S. Machado // *Journal of dairy science*. – 2012. – V. 95. – № 6. – P. 3100–3109.
151. Madoz, L.V. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows / L.V. Madoz, M.J. Giuliadori, A.L. Migliorisi, M. Jaureguiberry, R.L. Sota // *J. Dairy Sci.* – 2014. – V. 97. – № 1. – P. 195-201.
152. Mandhwani, R. Insights into bovine endometritis with special reference to phytotherapy / R. Mandhwani [et al.] // *Vet World*. – 2017. – V. 10. – № 12. – P. 1529-1532.
153. Mazaheri, Nezhad Fard R., Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. / Mazaheri Nezhad Fard R., Barton M.D., Heuzenroeder M.W. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2011. – V. 52. – № 6. – P. 559-564.
154. Międzybrodzki, R. Bacterial viruses against viruses pathogenic for man? / R. Międzybrodzki [et al.] // *Virus Res.* – 2005. – V. 110. – № 1–2. – P. 1-8.
155. Międzybrodzki, R. Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes / R. Międzybrodzki [et al.] // *Virus Res.* – 2008. – V. 131. – № 2. – P.233–242.
156. Miernikiewicz, P. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production / P. Miernikiewicz [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 8. – P. 1-13.
157. Naidu, B.P.B. Bacteriophage in the treatment of plague / B.P.B. Naidu, C.R. Avari // *Ind Jour Med Res.* – 1932. – V. 19. – P. 737-748.
158. Oblinger, J.L. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique / J.L. Oblinger, J.A. Koburger // *Milk Food Technol.* – 1975. – V. 38. – № 9. – P. 540–545.

159. Pimenov, N. V. Specific control of Salmonella in poultry // RJOAS. – 2013. – V. 11. – № 23. – P. 16-23.
160. Priya, P. M. A Unique Case of Trueperella Pyogenes Causing Hepatic Abscesses in Pigeons [Электронный ресурс] / P. M Priya, G. Abhinay, R. Ambily, S. Joseph // International Journal of Veterinary Medicine. – 2013. DOI: 10.5171/2013.486054.
161. Rahi, S. Phytotherapy for endometritis and subsequent conception rate in repeat breeding crossbred cows / S. Rahi, H. Gupta // The Indian Journal of Animal Reproduction. – 2013. – V.34. – № 1. – P. 9-12.
162. Raya, R.R. Isolation of Phage via Induction of Lysogens / R.R. Raya, E.M. H'bert // Bacteriophages. – 2009. – V. 501 – P. 23-32.
163. Rosenberg, E. The hologenome concept of evolution after 10 years / E. Rosenberg, I. Zilber-Rosenberg // Microbiome. – 2018. – V. – № 78. – P. 14.
164. Ruobing, W. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1 / W. Ruobing [et al.] // Nature Communications. – 2018. – V. 9. – №. 1179. – P. 1-9.
165. Rwer, P. In situ fluorescence microscopy of bacteriophage aggregates / P. Rwer [et al.] // Journal of Microscopy. – 2007. – V. 228. – P. 309-321.
166. Sarah, P. Influence of intrauterine administration of *Lactobacillus buchneri* on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis / P. Sarah [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1-13.
167. Sarkar, B.L. Biological activity and interaction of *Vibrio cholerae* bacteriophages in rabbit ileal loop. / B.L. Sarkar [et al.] // Indian J Med Res. – 1996. – V. 104. – P. 139-141.
168. Schicklmaier, P. Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex / P. Schicklmaier, H. Schmieger // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – № 61. – P. 1637-1640.
169. Shao, Q. Phage DNA dynamics in cells with different fates. / Q. Shao, A. Hawkins, L. Zeng // Biophysical journal. – 2015. – V. 8. – № 108. – P. 2048-2060.

170. Sharma, A. Bacterial Isolation, Culture Sensitivity Test, Endometrial Cytology of Postpartum Cows and Assessment of Their Reproductive Performance / A. Sharma [et al.] // international journal of current microbiology and applied sciences. – 2017. – V. 6. – № 9. – P. 519-527.
171. Signorile, P.G. Endometriosis: New concepts in the pathogenesis / P.G. Signorile, A. Baldi // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 2010. – № 42. – P.778-780.
172. Sir Alexander Fleming – Nobel Lecture. NobelPrize.org., December 11, 1945 [Электронный ресурс]: открытый доступ, URL: https://assets.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf?_ga=2.102517441.1742203896.1536917998-115487168.1536917998 (дата обращения 14.09.2018).
173. Smith, H.W. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves, piglets and lambs / H.W. Smith, M.B. Huggins // J Gen Microbiol. – 1983. – V. 5. – № 129. – P. 2659-2675.
174. Smith, H.W. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages / H.W. Smith, H.B. Huggins, K.M. Shaw // Journal of General Microbiology. – 1987. – № 133. – P. 1111–1126.
175. Soothill, J.S. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages / J. Med. Microbiol. – 1992. – V. 37. – P. 258-261.
176. Sugiura, T. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus / T. Sugiura [et al.] // The Journal of reproduction and development. – 2018. – V. 64. – № 2. – P. 135-143.
177. Takeshi, K. Optimization of diagnostic methods and criteria of endometritis for various postpartum days to evaluate infertility in dairy cows / K. Takeshi [et al.] // Theriogenology. – 2018. – V. 119. – P. 225-232.
178. Taylor, J. [et al.], Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: Model and Results, The Wellcome Trust, RR-911-WT, 2014. As of December 09, 2018: https://www.rand.org/pubs/research_reports/RR911.html.

179. Tikhonenko, A.S. Electron-microscopic study of the serological affinity between the antigenic components of phages T4 and DDVI / A.S. Tikhonenko [et al.] // Mol Biol (Mosk). – 1976. – V. 10. – № 4. – P. 667-673.
180. Topley, W.W.C. Further observations of the role of the Twort-d'Herelle phenomenon in the epidemic spread of murine typhoid / W.W.C. Topley, J. Wilson // J. Hyg. – 1925. – V. 24. – № 3-4. – P. 295-300.
181. Topley, W.W.C. Role of the Twort-d'Herelle phenomenon in the epidemics of mouse typhoid / W.W.C. Topley, J. Wilson, E.R. Lewis // J. Hyg. – 1925. – V. 24. – № 1. – P. 17-36.
182. Torres Luque, A. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the reproductive tract microbiota of cows and sows / A. Torres Luque [et al.] // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2017. – V. 55. – P. 13-19.
183. Udhayavel, S. Antibigram pattern of bacteria causing endometritis in cows / S. Udhayavel, S. Malmarugan, K. Palanisamy, J. Rajeswar // Vet World. – 2013. – V. 6. – № 2. – P. 100-102. doi: 10.5455/vetworld.2013.100-102.
URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/transformatsiya-proteina-i-energii-ratsionov-v-produktsiyu> (дата обращения: 10.10.2015).
184. Wagener, K. Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows / K. Wagener [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2015. – V. 175. № 2–4. – P. 286-293.
185. Wagener, K. Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis / K. Wagener [et al.] // The Veterinary Journal. – 2014. – V. 202. – № 3. – P. 527-532.

ПРИЛОЖЕНИЕ

К диссертационной работе прилагаются следующие документы или их копии:

1-7 Справки о депонировании бактериофагов vB-EcM-04, vB-EfS-027, vB-PvS-22, vB-SaM-9,1, vB-PaP-20, vB-SpM-293;

8-9 Временная инструкция по применению средства «Ветагин» рассмотренная и утвержденная ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина;

10-11 Согласование проведения клинических испытаний с Главным управлением ветеринарии Московской области;

12-17 Комиссионный акт проведенных клинических исследований на базе ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»;

18-19 Патент «Способ профилактики эндометритов у коров»;

20-21 Методические рекомендации «Рекомендации по применению препаратов на основе бактериофагов для профилактики и лечения эндометритов у коров».

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «гарантийное хранение»* штамм:

название штамма: vB-EfS-027 (порядок Caudovirales, семейство Siphoviridae)

Дата депонирования: 31.07.2017г.

Депозитор: Общество с ограниченной ответственностью научно-производственный центр «Микромир» (ООО НПЦ «Микромир»).

Назначение штамма: может быть использован в качестве производственного штамма при изготовлении фагосодержащих препаратов для последующего применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ - Ф - 01П

И.о. директора



Киш Л.К.

*Срок «гарантийного хранения» - 1 год

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «гарантийное хранение»* штамм:

название штамма: бактериофаг vB-EcM-04 (порядок Caudovirales, семейство Myoviridae).

Дата депонирования: 31.07.2017г.

Депозитор: Общество с ограниченной ответственностью научно-производственный центр «Микромир» (ООО НПЦ «Микромир»).

Назначение штамма: может быть использован в качестве производственного штамма при изготовлении фагосодержащих препаратов для последующего применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ - Ф - 03П

И.о. директора



Киш Л.К.

*Срок «гарантийного хранения» - 1 год

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «гарантийное хранение»* штамм:

название штамма: vB-PaP-2 (порядок Caudovirales, семейство Podoviridae)

Дата депонирования: 31.07.2017г.

Депозитор: Общество с ограниченной ответственностью научно-производственный центр «Микромир» (ООО НПЦ «Микромир»).

Назначение штамма: может быть использован в качестве производственного штамма при изготовлении фагосодержащих препаратов для последующего применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ - Ф - 04П

И.о. директора



Киш Л.К.

*Срок «гарантийного хранения» - 1 год

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «гарантийное хранение»* штамм:

название штамма: vB-PvS-22 (порядок Caudovirales, семейство Siphoviridae)

Дата депонирования: 31.07.2017г.

Депозитор: Общество с ограниченной ответственностью научно-производственный центр «Микромир» (ООО НПЦ «Микромир»).

Назначение штамма: может быть использован в качестве производственного штамма при изготовлении фагосодержащих препаратов для последующего применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ - Ф - 05П

И.о. директора



Киш Л.К.

*Срок «гарантийного хранения» - 1 год

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «гарантийное хранение»* штамм:

название штамма: vB-SaM-9.1 (порядок Caudovirales, семейство Myoviridae)

Дата депонирования: 31.07.2017г.

Депозитор: Общество с ограниченной ответственностью научно-производственный центр «Микромир» (ООО НПЦ «Микромир»).

Назначение штамма: может быть использован в качестве производственного штамма при изготовлении фагосодержащих препаратов для последующего применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ - Ф - 06П

И.о. директора



Киш Л.К.

*Срок «гарантийного хранения» - 1 год

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)**



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «гарантийное хранение»* штамм:

название штамма: vB-SpM-293 (порядок Caudovirales, семейство Myoviridae)

Дата депонирования: 31.07.2017г.

Депозитор: Общество с ограниченной ответственностью научно-производственный центр «Микромир» (ООО НПЦ «Микромир»).

Назначение штамма: может быть использован в качестве производственного штамма при изготовлении фагосодержащих препаратов для последующего применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ - Ф - 07П

И.о. директора



Киш Л.К.

*Срок «гарантийного хранения» - 1 год

Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственный центр «МикроМир»

Россия, 107031, г. Москва, Нижний Кисельный пер, д. 5/23, стр. 1.
ИНН 7702649180 КПП 770201001

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО

Дата 21.11.2018

Настоящим письмом генеральный директор Зурабов Александр Юрьевич компании ООО НПЦ «МикроМир» информирует, что аспирант Глазунов Егор Андреевич ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина по совместительству работавший в компании в должности специалист дирекции по развитию новых проектов, принимал участие на всех стадиях депонирования бактериофагов vB-EcM-04 (ВКШМ - Ф - 03П), vB-EfS-027 (ВКШМ - Ф - 01П), vB-PvS-22 (ВКШМ - Ф - 05П), vB-SaM-9,1 (ВКШМ - Ф - 06П), vB-PaP-20 (ВКШМ - Ф - 04П), vB-SpM-293 (ВКШМ - Ф - 07 П), которые были выделены и охарактеризованы Глазуновым Егором Андреевичем в процессе выполнения научных исследований по теме диссертационной работы.

С уважением,
Генеральный директор
ООО НПЦ «МикроМир»



Зурабов А.Ю.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО МГАВМиБ
– МВА имени К.И. Скрябина,
академик РАН Ф.И. Василевич

« _____ » 2017 г.

Инструкция по применению препарата «ВЕТАГИН» для профилактики и лечения эндометритов у коров

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Наименование препарата: ВЕТАГИН.
2. Форма выпуска: препарат выпускается в жидкой форме – стерильный концентрат фаголизата равномерно распределенный в физиологическом растворе, расфасованный в стеклянные флаконы объемом 100 мл. Жидкость по внешнему виду прозрачная со слабым желтоватым оттенком, без специфического запаха и вкуса.
3. Препарат хранят в закрытой упаковке производителя, в сухом, защищённом от прямых солнечных лучей месте, отдельно от продуктов питания и кормов, при температуре от 4 °С до 10 °С.
- Срок годности препарата при соблюдении условий хранения составляет 1 год со дня производства.
- Не допускается применять препарат в случае помутнения жидкости.
4. Неиспользованные препараты утилизируются в соответствии с требованиями законодательства.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

5. ВЕТАГИН относится к группе иммунобиологических препаратов. Бактериофаги, входящие в состав препарата, обеспечивают широкий спектр бактерицидного действия в отношении бактерий, характерных при заболеваниях эндометрия и внешних половых органов.
6. ВЕТАГИН по степени воздействия на организм относится к безопасным веществам. В рекомендуемых дозах препарат не оказывает раздражающего действия на ткани и слизистую.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. ВЕТАГИН назначают:
 - в целях профилактики послеродовых эндометритов, разовая доза на одно животное составляет – 100 мл. Рекомендуемая кратность введения 1 раз, для хозяйств с заболеваемостью на уровне 30 % от общего поголовья стада. При заболеваемости более 30 % рекомендуемая кратность применения препарата - 2-3 раза с интервалом 24 часа в течение первых 5 дней после отела;
 - в случаях тяжело протекающих родов и задержании последа с целью профилактики эндометрита препарат применять сразу после оперативного или медикаментозного отделения последа с увеличенной кратностью 2-3 раза с интервалом 24 часа, разовая доза 100 мл;
 - для лечения эндометрита разовая доза на одно животное составляет – 100 мл. Рекомендуемая кратность введения 3 и более раз с интервалом 24 часа.
8. Для введения препарата используются шприц Жане и одноразовые стерильные катетеры.

9. Противопоказанием к применению препарата ВЕТАГИН является индивидуальная повышенная чувствительность животного к компонентам препарата.

10. Побочных действий, явлений или осложнений после применения препарата, а также при превышении рекомендуемых доз не выявлено.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

11. При применении препарата ВЕТАГИН не требуется соблюдения каких-либо специальных мер предосторожности. После работы следует тщательно вымыть руки теплой водой с мылом. Во время работы с препаратом не разрешается курить, принимать пищу и воду.

12. Пустые флаконы из-под препарата запрещается использовать для бытовых целей, флаконы подлежат утилизации в соответствии с законодательством РФ.

**МСЭД**

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

ул. Садовая-Триумфальная, д. 10/13,
г. Москва, ГСП-4 127006

т/ф (495) 518-92-10, (499) 550-23-50
e-mail: mosuprvet@bk.ru

Начальнику
ГБУВ МО «Территориальное
ветеринарное управление № 2»

Главное управление ветеринарии Московской области (далее - Главное управление) согласовывает проведение клинических испытаний лекарственного препарата для ветеринарного применения «ВЕТАГИН бактериофаг комплексный», разработчик ООО НПЦ «МикроМир», производство ООО «АВЗ С-П», предназначенного для профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров и допуск специалиста дирекции по разведению новых проектов НПЦ «МикроМир», ветеринарного врача, аспиранта МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина Глазунова Е.А. в хозяйство ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское», расположенного по адресу: Московская область, Сергиево-Посадский муниципальный район, с. Васильевское.

Начальнику ГБУВ МО «Территориальное ветеринарное управление № 2» в рамках своей компетенции оказать содействие в проведении клинических испытаний лекарственного препарата.

Главное управление указывает на личную ответственность главного ветеринарного врача хозяйства ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» и ветеринарного врача, аспиранта МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина Глазунова Е.А. за соблюдение законодательства Российской Федерации.

Начальник –
главный государственный
ветеринарный инспектор
Московской области

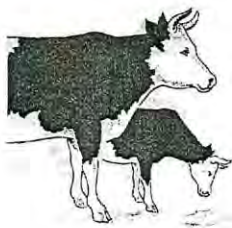
М.А. Ереза

Лист согласования к документу № Исх-10531/32-03-02 от 07.09.2017. В ответ на № Вх-15051 (06.09.2017)
Инициатор согласования: Доми И.А. Консультант
Согласование инициировано: 07.09.2017 09:10

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЯ

Тип согласования: **последовательное**

№	ФИО	Срок согласования	Результат согласования	Замечания/Комментарии
1	Сугрובה И.С.		Согласовано 07.09.2017 09:40	-
2	Ереза М.А.		ЭП Подписано 07.09.2017 09:41	-



Закрытое акционерное общество

«Племрепродуктор «ВАСИЛЬЕВСКОЕ»

141355, Московская область, Сергиево-Посадский район, с. Васильевское
ИНН/КПП 5042011162/504201001
р/с 40702810204800640385
БИК 044525181
к/с 30101810900000000181
Банк «Возрождение» (ПАО) г. Москва
тел: 8-496-54-83-134; e-mail: pr-vasil@bk.ru

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «ПР «Васильевское»

С.М. Горячев

« 12 »

2018 г.



АКТ

о клинических испытаниях лекарственного препарата для ветеринарного применения Ветагин для профилактики и лечения эндометритов у коров, организация разработчик Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственный центр «МикроМир»

1. Ведение:

Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт в том, что с 10 сентября 2017 по 10 июля 2018 г. в Закрытом акционерном обществе "Племрепродуктор «Васильевское», юридический адрес: 141355, Московская область, Сергиев-Посадский район, с. Васильевское, дом № 26/1, проводились клинические испытания I, II и III фаз лекарственного препарата для ветеринарного применения Ветагин в качестве средства профилактики и лечения эндометритов различного генеза у коров. Организация-разработчик: Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственный центр «МикроМир», Россия.

Лекарственное средство для ветеринарного применения Ветагин представляет из себя суспензию фаговых частиц в физиологическом растворе, активных в отношении бактерий, патогенных для коров и предназначено для внутриматочного введения, оказывает бактерицидное действие, способствует повышению резистентности организма. В ходе клинических испытаний использовались опытные серии препарата Ветагин: серия 010317, срок годности 04 2018; серия 021017, срок годности 11 2018.

2. Спонсор исследований:

Организация-разработчик Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственный центр «МикроМир», Россия, 107031, г. Москва, Нижний Кисельный пер., д. 5/23, стр. 1. Телефон: +7 495 625 3265

3. Цель исследований:

Целью работы являлось изучение эффективности лекарственного препарата для ветеринарного применения Ветагин для профилактики и лечения послеродового эндометрита у коров, изучение его безопасности, переносимости животными и удобства использования в условиях действующего сельскохозяйственного предприятия с высокой интенсивностью производства. Проведение клинических исследований I, II, III фаз, оценка клинической и микробиологической эффективности препарата при эндометритах различных форм у коров и отработки методик применения.

4. Задачи:

В ходе опыта были выполнены задачи:

1. определена безопасность и переносимость препарата (I фаза, частично II фаза);
2. отработаны методики и схемы применения препарата (II фаза, дополнение информации по безопасности и отслеживание на возможные отложенные нежелательные лекарственные реакции);
3. изучена эффективность препарата а также проведено отслеживание нежелательных лекарственных реакций на больших группах животных (проведение III фазы клинических исследований с целью).

5. Объект исследования:

Лекарственный препарат для ветеринарного применения Ветагин, организация-разработчик Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственный центр «МикроМир», Россия.

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование препарата: Ветагин (Vetagyn)
2. Состав:

Наименование ингредиентов			Масса, г
стерильная суспензия фаговых частиц в физиологическом растворе (активность по Аппельману 10^{-9} - 10^{-11}):			6,0
Наименование бактериофага	Регистрационный номер ФГБУ «ВГНКИ»	Бактерия – мишень	
vB-EfS-027	ВКШМ-Ф-01П	<i>Enterococcus faecalis</i>	
vB-KpnM-20	ВКШМ-Ф-02П	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
vB-EcM-04	ВКШМ-Ф-03П	<i>Escherichia coli</i>	
vB-PaP-2	ВКШМ-Ф-04П	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
vB-PvS-22	ВКШМ-Ф-05П	<i>Proteus vulgaris</i>	
vB-SaM-9.1	ВКШМ-Ф-06П	<i>Staphylococcus aureus</i>	
vB-SpM-293	ВКШМ-Ф-07П	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
физиологический раствор (ФС 42-5350-95) pH 7,0-7,4			до 100,0

3. Форма выпуска: препарат выпускается в жидкой форме – стерильная суспензия фаговых частиц для профилактики и лечения эндометритов у коров, фаголизата, расфасованный стеклянные флаконы объёмом 100 мл.

4. Жидкость прозрачная со слабым желтоватым оттенком, без запаха и вкуса. Срок годности лекарственного препарата при соблюдении условий хранения – 1 (один) год со дня производства, после вскрытия флакона лекарственный препарат не пригоден к применению. Запрещается применять препарат по истечении срока годности.

5. Флаконы стеклянные по 100 мл.

6. Лекарственный препарат хранят при температуре от 4° до 10° С.

7. Лекарственный препарат хранят в закрытой упаковке производителя в сухом, защищенном от света месте, отдельно от продуктов питания и кормов, при температуре от 4° до 10° С. Ветагин следует хранить в недоступном для детей месте;

8. Не использованный лекарственный препарат утилизируют в соответствии с требованиями законодательства;
9. Без рецепта ветеринарного врача;

II. Биологические свойства

10. Ветагин относится к иммунобиологическим препаратам для ветеринарного применения.
11. Бактериофаги, входящие в состав препарата, являются специфическим вирусом бактерии, которые адсорбируются на мембране клетки бактерии, проникают в клетку и лизируют ее.

III. Порядок применения

11. Ветагин применяют для профилактики и лечения эндометритов у коров.
12. Противопоказанием к применению Ветагин служит повышенная индивидуальная чувствительность животных компонентам препарата.
13. При применении Ветагин следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственным средством.
14. Особенности применения препарата беременным животным, в период лактации, у потомства не установлено.
15. Ветагин применяют внутриматочно с профилактической и лечебной целью:
 - для профилактики послеродовых эндометритов в дозе 100 мл на корову однократно при заболеваемости не более 30% от общего поголовья животных и 2 – 3-хкратно с интервалом 24 часа при заболеваемости более 30 % от общего поголовья животных.
 - для лечения эндометритов разовая доза составляет 100 мл на голову, 2-5кратно с интервалом 24 часа;
16. При применении препарата в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не отмечается.
17. Симптомов отравления или других патологических признаков при передозировке препарата не установлено.
18. Не рекомендуется применение препарата с кислотами ацетилсалициловой кислоты, аскорбиновой кислоты и т. п.), ввиду возможного снижения антибактериального эффекта.
19. Особенности реакции организма животного при первичном и последующих введениях не установлены.
20. Следует избегать нарушения схемы лечения, поскольку это может привести к снижению эффективности препарата. В случае пропуска введения препарата необходимо возобновить лечение как можно скорее. При пропуске одной или нескольких доз лекарственного препарата необходимо продолжить применение до полного излечения животного.
21. После применения препарата Ветагин продукцию животноводства молоко, мясо и другие продукты уоя можно использовать без ограничений.

Исследуемый лекарственный препарат для ветеринарного применения Ветагин, организация-разработчик Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственный центр «МикроМир», Россия, был предоставлен спонсором.

В работе использовали три производственные серии препарата Ветагин производства «АВЗ С-П»

6. Животные, включённые в испытание и группы исследуемых животных

Критерия включения и исключения приведены в Протоколе клинических исследований 2501/18. Исследования проводили на коровах черно-пестрой породы (голландизированной) группы формировали по принципу рандомизации. I фазу клинических исследований проводили на 5 здоровых животных с детальным изучением показателей крови (кровь отбирал главный исследователь совместно с исследователем от

спонсора) и микробиологических исследований маточного содержимого (материал передавался в лабораторию НПЦ «МикроМир»), оценивали местно-раздражающее действие, аллергенность и переносимость. Дополнительно исследовали общий клинический статус, а также состояние органов размножения при помощи методов УЗИ диагностики, используя секторальный датчик и ректальные исследования. В результате проведения I фазы клинических исследований никаких нежелательных лекарственных реакций отмечено не было, местно-раздражающее действие отсутствовало, аллергических проявлений не отмечено, нарушения сердечного ритма не зафиксировано, ЧДД у всех подопытных коров находились в пределах физиологических норм, тип дыхания не менялся под действием препарата. Исследования крови показали, что применение препарата никак не отражается на биохимических показателях крови, общий клинический анализ крови не выявил взаимодействие препарата с иммунокомпетентными и другими клетками крови коров, что позволило согласно протоколу (плану исследований) приступить в II фазе исследований.

В II фазе исследований проводили отработку схем применения препарата Ветагин, дополнительно изучали безопасность применения препарата Ветагин (изучали возможные отложенные нежелательные лекарственные реакции), профилактировали животных и производили комплексную терапию с препаратов Ветагин легких форм эндометритов у коров. Для этого были сформированы две опытные группы по 20 коров, первая опытная группа – профилактика, вторая – лечение, общее количество животных составило 40 коров. Провели детальное изучение биохимических показателей крови до и после применения препарата, общего клинического анализа крови коров до и после применения, оценили микробиологическую эффективность до и после применения препарата. Оценили клиническую эффективность препарата. В результате проведенных исследований II фазы клинических исследований установили, что применение препарата согласно первичной инструкции по применению, отложенных нежелательных лекарственных реакций не отмечено, эффективность отработанной пилотной схемы применения составила: профилактика – 79-80 %, при уровне заболеваемости 40-60 %; лечение препаратом Ветагин как этиотропное средство – 89 %. При проведении исследований терапевтической эффективности ставили опытную группу сравнения с применением комплексного препарата «Прималакт». Группа сравнения по численности (20 коров) контингентов сопоставима с группой, где применяли Ветагин (19 коров, одна корова в начале исследований была исключена из-за возникновения не связанного с исследованиями заболевания – мастит), в результате в группе сравнения эффективность составила 80 %.

Полученные результаты позволили приступить к выполнению III фазы клинических исследований согласно успешно завершённым испытаниям II фазы. На III фазе клинических исследований изучали профилактическую и терапевтическую эффективность препарата Ветагин на расширенных группах, к каждой группе ставили группы сравнений: Профилактика: группа с применением препарата Ветагин (общее кол-во коров 234) эффективность составила 93,4 %, в группе сравнения с применением препарата Гипролам (общее кол-во коров 250) эффективность составила 92,2 %. Лечение: группа с применением препарата Ветагин (общее кол-во коров 395) эффективность варьировала 88-95 %, в зависимости от формы эндометрита, в группе сравнения с применением препарата Прималакт (общее кол-во коров 356) эффективность составила 87-92 %, также в зависимости от формы и течения эндометритов.

Полученные результаты фиксировали в журнале исследований, случаи исключения животных из групп отмечали в брошюре главного исследователя. Ответственный за кодирование опытных групп – главный исследователь. Потребности в раскрытии кода рандомизации опытных групп за время исследований не потребовалось. Все животные содержались в одинаковых условиях по принципу рандомизации, для набора необходимого числа животных и расширения исследований привлекались молочно-товарные фермы МТФ «Алферьево», МТФ «Ярыгино» расположенные вблизи

основной базы МТФ «Озерецкое», принадлежащие ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское», где главный исследователь – Иван Владимирович Гаврюшенко, также является главным ветеринарным врачом.

За время проведения экспериментов вспышек инфекционных, инвазивных и других заболеваний отмечено не было. Выбраковки животных по неустановленным причинам не было. Исследователи проводившие клинические испытания, неблагополучные хозяйства по инфекционным заболеваниям не посещали.

Результаты исследований переданы представителю спонсора исследований ветеринарному врачу Глазунову Е.А. в полном объеме.

7. Выводы:

Применение препарата Ветагин для профилактики и лечения послеродовых эндометритов у коров показало высокую профилактическую и терапевтическую эффективность и полную безопасность препарата. В период проведения клинических исследований на производственных площадках не использовались антибактериальных препараты для профилактики и лечения эндометритов на основе антибиотиков (за исключением необходимых опытных групп сравнения, которые формировали согласно протоколу клинических исследований 2501/18).

Во всех случаях применения препарата Ветагин не отмечали нежелательных лекарственных реакций, проявлений местно-раздражающего действия, признаков алергизирующего и/или сенсибилизирующего воздействия препарата.

8. Практические предложения:

1. Для профилактики послеродового эндометрита у коров в качестве антибактериального средства использовать препарат Ветагин, который следует вводить внутриматочно в дозе 100 мл на животное 1-2 раза согласно инструкции по применению.

2. Для лечения эндометрита (гнойного, гнойно-катарального, катарального, серозного, фибринозного) у коров в качестве антибактериального средства использовать препарат Ветагин, который следует вводить внутриматочно в дозе 100 мл на животное 3-4кратно с интервалом 24 часа согласно инструкции по применению.

3. Рекомендуем Ветагин к регистрации как лекарственный препарат для ветеринарного применения в соответствии с требованиями действующего законодательства Российской Федерации.

Главный ветеринарный врач
ЗАО «ПР «Васильевское»


(подпись); / Говрюшенко И.В./
ФИО.

Представитель компании
ООО НПЦ «МикроМир»


(подпись); / Глазунов Е.А. /
ФИО.



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2662328

СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ЭНДОМЕТРИТОВ У КОРОВ

Патентообладатели: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина" (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина) (RU), Общество с ограниченной ответственностью научно-производственный центр "МикроМир" (ООО НПЦ "МикроМир") (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2016122507

Приоритет изобретения 07 июня 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 25 июля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 07 июня 2036 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивашин



(51) МПК
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 15/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(52) СПК
A61K 35/66 (2006.01); *A61K 35/76* (2006.01); *A61K 2121/00* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016122507, 07.06.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 07.06.2016

Дата регистрации:
 25.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.06.2016

(43) Дата публикации заявки: 12.12.2017 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 25.07.2018 Бюл. № 21

Адрес для переписки:

109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
 ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени
 К.И.Скрябина, НИО, Литвинова Ольга
 Александровна

(72) Автор(ы):

Пименов Николай Васильевич (RU),
 Сотникова Лариса Федоровна (RU),
 Глазунов Егор Андреевич (RU),
 Попова Валентина Михайловна (RU),
 Жиленьков Евгений Леонидович (RU),
 Зурабов Александр Юрьевич (RU),
 Воронцов Алексей Васильевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Московская государственная
 академия ветеринарной медицины и
 биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина"
 (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И.
 Скрябина) (RU),
 Общество с ограниченной ответственностью
 научно-производственный центр
 "МикроМир" (ООО НПЦ "МикроМир") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 96120483 A, 10.11.1998. RU
 2129000 C1, 20.04.1999. WO 2010124085 A2,
 28.10.2010. БАГМАНОВ М.А. Применение
 экстракта "Хорио-фаг" при эндометритах
 полимикробной этиологии у коров//
 Диагностика, лечение и профилактика
 заболеваний животных. Ульяновск, 1999, ч.
 2, с. 41-44. ПИМЕНОВ Н.В. и др. Изучение
 возможности применения препарата
 Фагогина для (см. прод.)

(54) **СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ЭНДОМЕТРИТОВ У КОРОВ**

(57) Формула изобретения

Способ профилактики послеродового эндометрита у коров, включающий
 интравагинальное введение бактериофагового препарата «Фагогин» после отделения
 последа однократно в дозе 30 мл внутриматочно через стеклянный или пластиковый
 одноразовый катетер.

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЭНДОМЕТРИТОВ У КОРОВ



Москва, 2017

Глазунов Егор Андреевич, аспирант МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина,
glazuinov.sledit@yandex.ru

Рекомендации разработаны:

Доктор биологических наук, профессор РАН, заслуженный деятель Агропромышленного комплекса Н.В. Гименов, аспирант ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина Е.А. Глазунов.

Рецензенты:

Директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» доктор ветеринарных наук, профессор, академик Российской академии наук, заслуженный деятель науки Российской Федерации М.И. Гুলюкин

Профессор кафедры диагностики болезней, терапии, акушерства и биотехники разведения животных ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, доктор биологических наук, профессор С.Н. Федулов

Методические рекомендации предназначены для специалистов ветеринарной службы и Россельхознадзора, а также сотрудников лечебно-профилактических организаций независимо от их организационно-правовой формы и формы собственности. Материал может быть использован в качестве учебного пособия для обучающихся в высших и средних специальных образовательных учреждений по ветеринарным направлениям подготовки.

Рассмотрены и одобрены на заседании научно-методического совета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (протокол №3 от 15.02.2017).

СОДЕРЖАНИЕ

1. Эндометриты у коров: общие положения, классификация, этиопатогенез.....	4
2. Принципы лечения и профилактики эндометритов у коров.....	12
3. Традиционные препараты и средства для лечения и профилактики послеродовых эндометритов.....	14
4. Антибиотикорезистентность, пути решения. Преимущества применения бактериофагов.....	25
Приложение: инструкция по применению препарата «ВЕТАГИН».....	33