

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина).

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор **Пименов Николай Васильевич**.

Официальные оппоненты:

Тикунова Нина Викторовна - доктор биологических наук, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии.

Мастиленко Андрей Владимирович - кандидат биологических наук, ООО «Медицинский центр «Академия», заместитель главного врача по научно-лабораторной работе.

Ведущая организация: ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1, тел.: +7 (495) 970-03-68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и на сайте <http://viev.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

И.Ю. Ездакова

Общая характеристика работы

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 (Войтенко Л.Г. 2012, Кузьмич Р.Г. 2010, Марцинковская И.В. 2008).

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 (Епанчинцева О.С. 2012, Забровская А.В. 2013, Терентьева Н.Ю. 2015, Юсупов С.Р. 2016, Bicalho M.L.S. 2017, Ghasemi F. 2011, Wang J. 2016, Knudsen L.R. 2014, Wagener K. 2014).

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 (Туркутюков В.Б. 2011, Батаева Д.С. 2016, Данилова Н.В. 2016, Ефимочкина Н.Р. 2017, Behr C. 2018, Ruobing W. 2018).

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 (Бондаревич Н.В. 2015, Пименов Н.В. 2008, Алешкин А.В. 2015, Зурабов А.Ю. 2012, Barr J.J. 2017, Brussow H.

2004, Górski A. 2017, Letarov A.V. 2012). 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 (Григорьева Г.И. 2006, Machado V.S. 2012).

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 направлени-

ями 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 приложений на 20 листах.

Основные положения, выносимые на защиту:

- видовой состав этиопатогенных бактерий при послеродовых эндометритах у коров;
- способ профилактики послеродового эндометрита у коров при помощи бактериофагов;
- биологические свойства бактериофагов-претендентов для конструирования средства профилактики и лечения эндометритов;
- методологические основы применения экспериментального средства для профилактики послеродового эндометрита у коров на основе коктейля бактериофагов.

Собственные исследования

Материалы и методы

Работа выполнена в период 2015-2018 гг. на базе ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина. Ряд исследований выполняли на базе лаборатории ООО НПЦ «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»», ООО «РусМолоко», СПА «Кузьминский» Сергиев-Посадского района, ООО «Лесные Поляны» Пушкинского района, ООО «Колхоз Гжельский» Раменского района, а также в ОАО «Нива» Нижегородской области Лысковского района.

При проведении бактериологических исследований 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.

Микроорганизмы идентифицировали на основании культуральных, морфологических, тинкториальных, биохимических свойств при помощи МИКРО-ЛА-ТЕСТ-ов, производства компании Erba Lachema, методов масс-спектрометрии на Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

Выделение бактериофагов из объектов окружающей среды и образцов клинического и патологического материала проводили классическими методами по М. Адамсу и Д.М. Гольдфарбу.

Электронно-микроскопические исследования осуществляли на электронном микроскопе JEOL JEM-1011 с цифровой фотокамерой Erlangshen ES500W (Gatan), с коллодиевыми пленками подложками и негативным контрастированием 1 % водным раствором уранилацетата. Биологические свойства бактериофагов-претендентов (скорость адсорбции, продолжительность латентного периода, «урожайность») изучали в системах «фаг-клетка».

Изучение эффективности сформированного коктейля бактериофагов *in vivo* проводили, моделируя экспериментальные инфекции заражением белых мышей массой 18-21 г гомологичными штаммами бактерий коллекции НПЦ «МикроМир».

Изучение стабильности препарата проводили методом «ускоренного старения» и по методу «долгосрочных испытаний» согласно «Общей фармакопейной статье 1.1.0009.15».

Проведение клинических исследований, нового коктейля бактериофагов проводили согласно «Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты)».

Для подсчёта количества соматических клеток в цельном молоке использовали вискоизометрический аппарат «Соматос-мини».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериологический мониторинг при эндометритах у коров и патогенность выделенных циркулирующих штаммов

При изучении 260 образцов маточного содержимого при эндометритах у коров, отобранных из 6 хозяйств, было получено 1085 изолятов культур, из них у 24 изолятов не удалось установить видовую принадлежность. Выделенная микрофлора была представлена

47 видами бактерий и 6 видами микроскопических грибов. Представители царства бактерий принадлежали к 22 семействам. Распространённость микроскопических грибов при клинических эндометритах в общем числе исследованных образцов варьировала от 1,92 до 4,23 %.

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 % случаев при ярко выраженных клинических признаках эндометрита выделяли по одному виду микроорганизмов, что позволило нам судить об этиологической роли данных микроорганизмов.

Самыми распространёнными видами бактерий при клинических формах эндометрита были *Trueperella pyogenes* и *Escherichia coli*, которые встречались на 35-38 % чаще, чем следующий за ними по распространённости *Enterococcus faecalis*. Доминирующая ассоциация представлена *T. pyogenes* и *E. coli*, которая встречалась в 40-86 % случаев заболеваний. При изучении патогенности выделенных штаммов установлено, что большая часть штаммов *T. pyogenes* (115), *E. coli* (79), *En. faecalis* (21), *B. cereus* (19), *S. haemolyticus* (20) вызывают β -гемолиз на среде ВНИ-агар с добавлением дефибринированных эритроцитов барана, что свидетельствует об их патогенных свойствах. Большая часть идентифицированных штаммов *S. haemolyticus* (5), *S. aureus* (8) обладали коагулазной активностью, также штаммы *S. haemolyticus* (17) показали липазную активность, в частности, лецитиназную. Анализ данных изучения сахаролитических свойств не выявил строгой патогенной направленности среди идентифицированных штаммов, показав типичные видовые харак-

теристики. Постановка биопробы на самках белых мышей возрастом 3-4 недели массой 18-21 г. позволила определить наиболее вирулентные циркулирующие штаммы бактерий.

Комплексный анализ полученных результатов бактериологических исследований маточного содержимого коров, больных эндометритом, позволил определить бактерии-мишени, к которым необходим подбор бактериофагов. 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 aureginosa*, *Streptococcus agalactiae*.

Апробация готового средства

Путем анализа составов, имеющих на рынке препаратов нами было выбрано гелевое средство «Фагогин» производства ООО НПЦ «МикроМир» с бактериофагами, активными в отношении большинства видов бактерий, определенных нами, как этиопатогенные.

В процессе первичных апробаций мы установили наиболее оптимальную дозу и сроки введения средства «Фагогин». Первые эксперименты показали высокую профилактическую эффективность комплексной схемы с применением средства «Фагогин» на уровне 89,5%, что на 36,9 % выше, чем в группе сравнения с применением противовоспалительного («Кетоджект»), антибактериального («Цефтиосан») средств. В обеих группах применение средств комбинировали с β -адренолитиком («Утеротон»).

Терапевтическая эффективность средства «Фагогин» составила 50 %. Недостаточный уровень терапевтической эффективности, на наш взгляд, был обусловлен отсутствием в составе препарата гомологичных бактериофагов к одному из ключевых видов бактерий,

определенных нами как этиопатогенные при эндометритах у коров, в частности, к *T. pyogenes*.

Таким образом, перед нами стояла задача по поиску и селекции новых литически активных бактериофагов к этиопатогенным видам бактерий при послеродовых эндометритах.

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

Из источников окружающей среды было выделено 39 штаммов бактериофагов, из них 15 – с литической активностью не менее 10^{-7} по Аппельману. Выделенные бактериофаги активны в отношении этиопатогенных бактерий (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Бактериофаги-претенденты для внесения в состав коктейля

Штамм бактериофага	Литическая активность	Специфичность фага	Источник выделения
Ph. <i>T. pyogenes</i> 2	10^{-7}	<i>T. pyogenes</i>	сточные воды МТФ «Озерецкое»
vB-EcM-04	10^{-9}	<i>E. coli</i>	сточные воды г. Пущино, Московской области
vB-EfS-027	10^{-8}	<i>E. faecalis</i>	сточные воды фермы «Лесные Поляны»
vB-PvS-22	10^{-9}	<i>P. vulgaris</i>	сточные воды, Московская область
Ph. <i>B. cereus</i> F	10^{-7}	<i>B. cereus</i>	земля с пастбища ООО «Колхоз Гжельский»
Ph. <i>S. haemolyticus</i> 9	10^{-7}	<i>S. haemolyticus</i>	сточные воды, Московская область
vB-SaM-9,1	10^{-8}	<i>S. aureus</i>	гнойный экссудат из абсцесса МТФ «Озерецкое»
vB-PaP-20	10^{-9}	<i>P. aureginosa</i>	сточные воды, Московская область
vB-SpM-293	10^{-8}	<i>S. agalactiae</i>	гнойный экссудат от больной эндометритом коровы

Все выделенные бактериофаги к *P. levii*, *F. necrophorum*, *C.perfringers* не обладали достаточным уровнем литической активности для включения их в состав нового средства, поиски литически

активных и вирулентных бактериофагов к данным видам микроорганизмов продолжают.

Бактериофаги-претенденты исследовали на спектр литической активности. Для выполнения поставленной задачи были отобраны изоляты бактерий ранее выделенные при эндометритах у коров. Литический спектр бактериофагов-претендентов представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Литический спектр производственно-перспективных бактериофагов

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

Как видно из данных, представленных в таблице 2, выделенные бактериофаги обладали широким спектром литической активности, вызывали лизис бактериальных специфичных культур в диапазоне 80-95 %, что позволяет судить об их высокой вирулентности и широким спектре литического действия.

Проведенный комплекс исследований морфологической структуры и параметров инфекционного процесса в системах «фаг-клетка» позволил охарактеризовать выделенные бактериофаги для их паспортизации, за исключением бактериофага Ph. *T. pyogenes* 2. Полученные результаты изучения биологических свойств выделенных бактериофагов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристики выделенных бактериофагов

Фаг	Клетка-хозяин	Мф	Семейство фага	Параметры инфекционного процесса в системах фаг-клетка		
				Ка	Лп	Ур
Ph. Tr. pyogenes 2	<i>T. pyogenes</i>	A1	<i>Myoviridae</i>	$0,3 \times 10^{-11}$	35	40
vB-EcM-04	<i>E. coli</i>	A2	<i>Myoviridae</i>	$12,5 \times 10^{-11}$	30	280
vB-EfS-027	<i>E. faecalis</i>	B2	<i>Siphoviridae</i>	$3,2 \times 10^{-11}$	28	120
vB-PvS-22	<i>P. vulgaris</i>	B1	<i>Siphoviridae</i>	$1,3 \times 10^{-11}$	36	210
Ph. B. cereus F	<i>B. cereus</i>	-	<i>Myoviridae</i>	$1,9 \times 10^{-10}$	60	170
Ph. S haemolyticus 9	<i>S. haemolyticus</i>	A1	<i>Myoviridae</i>	$0,9 \times 10^{-11}$	45	90
vB-SaM-9,1	<i>S. aureus</i>	A1	<i>Myoviridae</i>	$0,5 \times 10^{-11}$	27	80
vB-PaP-20	<i>P. aurescens</i>	C1	<i>Podoviridae</i>	$7,1 \times 10^{-11}$	40	180
vB-StraM-264	<i>S. agalactiae</i>	B1	<i>Myoviridae</i>	$0,7 \times 10^{-11}$	34	100

Примечание: Мф – морфотип; Ка – константа скорости адсорбции мл/мин.; Лп – латентный период, мин.; Ур – урожайность, клеток.

Биологические свойства бактериофагов, представленные в таблице 3, соответствуют минимальным требованиям производственных штаммов и позволили приступить к подбору маточных культур и отработке методик получения высоких титров бактериофагов-претендентов. Для отбора маточных культур бактерий с целью получения высоких титров бактериофагов исследовали выделенные изоляты в процессе бактериологического мониторинга. Изучение на наличие профагов в бактериальных клетках проводили с использованием химического (митомицин С, $0,1-2,0$ мкг/см³) и физического (УФО длина волны 250 нм) факторов индукции профагов. По результатам исследований были отобраны маточные культуры для наработки экспериментальной серии нового средства на основе коктейля бактериофагов, не обладающие лизогенными свойствами.

Изучение биологических свойств бактериофагов сопровождалось подбором методики их культивирования на жидких и плотных

питательных средах. Для получения высоких титров с целью формирования экспериментальной серии нового средства была подобрана методика получения высоких титров выделенных фагов в жидкой питательной среде Хоттингера, основанная на следующих условиях (см. таблицу 4).

Таблица 4 – Параметры получения высоких титров бактериофагов-претендентов в бульоне Хоттингера

Штамм бактериофага	КК, кл./см ³	Вп, час.	Время сокультивирования 18-24 часа	Кг, БОЕ/см ³	Ла
Ph. T. pyogenes 2	1,0x10 ⁷	4		1,0x10 ⁶	10 ⁻⁷
vB-EcM-04	1,7x10 ⁷	2,5		1,5x10 ⁹	10 ⁻⁹
vB-EfS-027	1,2x10 ⁸	2,5-3,0		1,0x10 ⁸	10 ⁻⁸
vB-PvS-22	1,0x10 ⁷	2,5		2,5x10 ⁹	10 ⁻⁸
Ph. B. cereus F	2,4x10 ⁷	2,5		3,6x10 ⁸	10 ⁻⁸
Ph. S haemolyticus 9	1,7x10 ⁸	2,5		1,1x10 ⁹	10 ⁻⁸
vB-SaM-9,1	1,0x10 ⁹	3,0-3,5		0,5x10 ⁹	10 ⁻⁸
vB-PaP-20	1,0x10 ⁷	2,5		1,5x10 ⁹	10 ⁻⁷
vB-StraM-264	8,0x10 ⁹	2,5		1,4x10 ⁹	10 ⁻⁷

Примечание: КК – концентрация специфичной культуры; Вп – время подраживания клеток; КГ – концентрация по Грациа (титр фага); Ла – литическая активность фага по Аппельману

Выбранные методы очистки фаголизатов (низкоскоростное и высокоскоростное центрифугирование), а также центрифугирование с использованием буферных систем (CsCl) позволили достичь высокой степени очистки по количеству остаточных липополисахаридов (10±2 мкг/мл) и общего белка (5±1 мкг/мл). Степень очистки по белку составила 93,5±2,1% от изначального содержания после культивирования бактериофагов.

Инновационное разработанное средство, включающее отобранные бактериофаги, получило временное наименование – «Ветагин». Экспериментальная серия средства «Ветагин» была произведена в лабораторных условиях НПЦ «МикроМир», две ОПС (опытно-промышленные серии 010317, 021017) были произведены на «АВЗ С-П» по временному техническому регламенту.

Изучение эффективности средства *in vivo*

Изучение протективных свойств средства «Ветагин» провели моделированием инфекционного процесса на лабораторных животных – белых мышах. В качестве инфицирующих культур отобрали паспортизированные штаммы с известными показателями LD₅₀ из частной коллекции НПЦ «МикроМир». Для постановки острого опыта использовали дозы 5LD₅₀, *T. pyogenes* 101/R, *E. coli* ATCC 1271, *E. faecalis* 41, *S. aureus* VRA 85, *B. cereus* 354, *S. haemolyticus* ATCC 327, *P. aureginosa* ATCC 678. Разработанное средство вводили лабораторным объектам в дозе 0,1 мл (что соответствует 10⁵-10⁶ БОЕ/см³ каждого из фагов), способом идентичным инфицированию. Установлено, что профилактическая эффективность разработанного средства в остром опыте составила 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 методик введения за 1 и 48 до заражения (p<0,05). Терапевтическая эффективность составила 82,9±5 %, 72,9±5 %, 67,1±8 % при введении средства через 1, 24 и 48 ч после заражения соответственно. Высеваемость изолятов бактерий из внутренних органов мышей составила 2,8±0,2 %, 3,2±0,1 %, 3,5±0,3 % при введении препарата через 1, 24 и 48 ч после

заражения соответственно. При этом падеж в контрольных группах составлял 90-100%, а высеваемость – 100 %.

Безопасность средства «Ветагин»

Препарат-коктейль бактериофагов «Ветагин» по степени воздействия на организм относится к хорошо переносимым и безвредным препаратам (заключения ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).

Исследования на возможность взаимодействия бактериофагов из состава препарата «Ветагин» с бактериальными культурами нормофлоры влагалища при помощи методов флуоресцентной микроскопии, показали, что адсорбции бактериофагов на культурах *Lactobacillus species* (12 изолятов), *Bifidobacterium pseudolongum* (12 изолятов), *Bacillus licheniformis* (36 изолятов) нет. При проведении спот-теста пятен негативного роста на представленных культурах не обнаружено.

Стабильность нового средства «Ветагин»

Срок экспериментального хранения, установленный нами по методу «ускоренного старения», составил 376 суток, что позволило на момент апробации не вносить консерванты в состав средства.

Изучение стабильности по методу «долгосрочных испытаний» показало, что бактериофаги в составе средства «Ветагин» сохраняют свою активность и их титр не меняется на протяжении 12 месяцев: уровень кислотности pH (7,0-7,39) и уровень общего белка (5 ± 1 мкг/мл) находились в рамках статистической погрешности измерения относительно первоначальных показателей конечной формы препарата после его очистки.

Клинические испытания средства «Ветагин»

Успешное проведение доклинических исследований позволили нам провести I фазу клинических испытаний (КИ) препарата «Ветагин». 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 создания первичной инструкции по применению (II фаза КИ). В результате проведенных испытаний средства в разных дозах, формах и схемах применения, дозу в 100 мл определили как наиболее оптимальную и перспективную.

Скорость взаимодействия бактериофагов с клетками бактерий, как мы установили, в среднем составляла 27-60 мин. (см. таблицу 3). Таким образом, препарат должен был находиться внутри матки не менее 60 мин. после введения. Стоит отметить, что дозы и кратность применения при разных формах и течениях заболевания могут корректироваться в процессе широкомасштабного проведения клинических испытаний. Апробация средства «Ветагин» на базе различных ферм показала следующие результаты (см. таблицу 5).

Таблица 5 – Клиническая эффективность средства «Ветагин»

МТФ/МФ	Уз, %	Профилактика		Терапия	
		Кол-во коров в группе	Эффективность, %	Кол-во коров в группе	Эффективность, %
«Озерцкое»	50	20	85	20	85
«Закубежье»	75	10	80	5	100
«Кузьмино»	70	20	50	-	-
«Колхоз Гжельский»	70	20	80	10	70
«Лесные Поляны»	75	20	75	10	60
«НИВА»	70	20	50	-	-

Примечание: Уз – уровень заболеваемости.

Отмечено, что с применением антибиотиков в разных производственных условиях предложенная схема биопротекции не уступала в эффективности в хозяйствах «Озерцкое», «Колхоз Гжельский», «Лесные Поляны». Изучение терапевтической эффективности проводили в хозяйствах, где профилактическая эффективность была достигнута на уровне более 70 %. Комплексная схема лечения в основе с фаготерапией показало эффективность на уровне 60-100 %.

Высокая профилактическая эффективность нового средства, установленная в МТФ «Озерцкое» ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»», позволила провести расширенные КИ (III фаза) на базе этой фермы по направлению фагопротекции в сравнении с предыдущим периодом (использования комплексных схем). Установлено, что различия по сервис-периодам статистически не значимы – $118,63 \pm 32,6$ (схема с антибиотиком) к $108,25 \pm 27,3$ (схема с бактериофагами). Анализ данных заболеваемости выявил различия между первой и второй группами наблюдений: $12,23 \pm 0,31$ и $10,9 \pm 0,35$. Результаты исследований показывают, что длительное внутриматочное применение бактериофагов не оказывает негативного влияния на плодотворное осеменение коров, что подтверждается отсутствием различий с периодом применения антибиотиков и имеет высокую профилактическую эффективность.

Безопасность продукции

При внутриматочном введении разовой дозы (100 мл) средства «Ветагин» бактериофагов, входящих в состав средства, в образцах крови и молока коров, отобранных через 10 мин, 1, 8, 24 часа не обнаружено. Количество соматических клеток во всех пробах молока оставалось в пределах статистических погрешностей относительно исходных показателей.

Заключение

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 perfringens*, *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 perfringens* – 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 perfringens*, *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 частиц 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.

Практические предложения по использованию результатов исследований

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.

Список работ, в которых опубликованы основные положения диссертации

1. **Глазунов, Е.А.** Выведение бактериофагов с молоком при внутриматочном введении коктейля бактериофагов / Е.А. Глазунов, Е.Е. Новикова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. – № 7. – С. 66-69.
2. **Глазунов, Е.А.** Микробиологический мониторинг при послеродовых эндометритах у коров, профилактика при помощи бактериофагов / Е.А. Глазунов, Н.В. Пименов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2017. – № 7. – С. 13-18.
3. Пименов, Н.В. Изучение возможности применения препарата Фагогин для профилактики эндометритов у крупного рогатого скота / Н.В. Пименов, Л.Ф. Сотникова, **Е.А. Глазунов** // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2015. – № 11. – С 6-12.
4. Пименов Н.В., **Глазунов Е.А.** Рекомендации по применению препаратов на основе бактериофагов для профилактики и лечения эндометритов у коров // Методические указания. – 2017. – 22 С.
5. **Glazunov, E.A.** Studying of preventive effectiveness of bacteriophages' preparation at endometritis of cows in the conditions of lactic and commodity farm / E.A. Glazunov, N.V. Pimenov, L.F. Sotnikova // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2016. – V. 53. – № 5. – P. 90-96.