

РЕЗУЛЬТАТЫ КОНТРОЛЯ ИЗГОТОВЛЕННОГО ПОЛИВАЛЕНТНОГО БАКТЕРИОФАГА

The control results of the produced polyvalent bacteriophage

Золотухин С.Н., доктор биол. наук, профессор, Мелехин А.С.,
Пименов Н.В. доктор биол. наук
Zolotukhin S.N., Melekhin A.S., Pimenov N.V.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия
имени П.А. Столыпина»

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии имени К.И. Скрябина»

Ulyanovsk state agricultural academy named after P.A. Stolypin
fvm.zol@yandex.ru

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named after Scriabina
pimenov-nikolai@yandex.ru

Аннотация. Из пяти штаммов фагов, активных в отношении патогенных энтеробактерий, вызывающих наиболее часто гастроэнтериты у новорожденных поросят, сконструирован «Поливалентный фаговый биопрепарат против смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов». Полученный бактериофаг проверяли на чистоту, стерильность, безвредность и активность. По всем показателям сконструированный бактериофаг показал себя как активный и безвредный биопрепарат.

Ключевые слова: энтеробактерии, бактериофаги, литическая активность, безвредность, стерильность.

Summary. The polyvalent phage biological product against the mixed intestinal infection of sucking pigs» was constructed from five strains of phages which are active to the pathogenic enterobacteria causing, most often, gastroenteritis of newborn pigs. The received bacteriophage was checked for purity, sterility, harmlessness and activity. By all indicators the constructed bacteriophage approved to be both active and harmless biological product.

Keywords: enterobacteria, bacteriophages, lytic activity, harmlessness, sterility.

Введение. Разнообразие форм и полиэтиологичность заболеваний поросят-сосунов, сопровождающихся поражением пищеварительного аппарата и диарейным синдромом, обосновывают поиск новых методов и средств лечения и профилактики. Безвредность и специфичность применения бактериофагов на фоне растущей циркуляции антибиотикорезистентных энтеробактерий стали основополагающими аргументами в пользу конструирования фагового препарата, направленного на борьбу с патогенными возбудителями кишечной патологии поросят, вызванными представителями семейства Enterobacteriaceae [1-8].

Исследованиями многих авторов, установлено, что наиболее распространенными возбудителями кишечной инфекции у поросят-сосунов являются энтеробактерии относящиеся к родам *Escherichia*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, и др. [8-11].

Цель работы. Целью настоящей работы явилось конструирование и производство экспериментальной серии препарата, основанного на активных бактериофагах против смешанной кишечной инфекции поросят.

Материалы и методы. Для изготовления и производства экспериментальной серии поливалентного бактериофага против смешанной кишечной инфекции поросят нами были использованы фаги с наибольшей активностью из коллекции кафедры микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии: штамм бактериофага Phagum *Morganella morganii* M-20 УГСХА, Phagum *Escherichia coli* E-70 УГСХА, Phagum *Citrobacter* C-61 УГСХА, Phagum *Proteus* П-261 УГСХА, Phagum *Enterobacter* En-13 УГСХА.

Препарат готовили, основываясь на общепринятых методах биотехнологии и опыте изготовления бивалентного бактериофага против сальмонеллеза птиц [12].

Собственные исследования. Препарату присвоили наименование «Поливалентный фаговый биопрепарат против смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов», его расфасовку осуществляли во флаконы объемом 200 мл. В соответствии с концентрированием и смешиванием компонентов в 1 см³ препарата получали 10² фаговых частиц каждого бактериофага. Исходя из того, что усредненная терапевтическая доза активного фага по Аппельману 10⁸-10⁹ на поросенка-сосунка массой 2-4 кг составляет 10³-10⁴ фаговых частиц, то нами определена лечебная доза препарата 3 см³, которая содержит соответствующий титр каждого фага-компонента препарата (10⁴). Учитывая особенности применения орального препарата для поросят и частичную потерю фагов по пути к кишечнику возможно, что доза должна быть больше, например, 5 см³ и менее концентрированная.

Итоговый контроль препарата проводили на стерильность, безвредность и активность.

Контроль на стерильность осуществляли последовательными высевами объединенной пробы готового препарата, полученной из 3 флаконов, по 0,2 см³ на мясо-пептонный агар (МПА), МПБ, среду Сабуро, среду Китта-Тароцци и по 2 см³ во флаконы с МПБ и со средой Китта-Тароцци. Пробирки со средой Сабуро инкубировали при температуре 20-22 °С, остальные посеы при температуре 37°С. Через 2 суток из жидких сред делали пересевы на МПА, МПБ и мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) по 0,2 см³. Первичные посеы инкубировали 10 суток, вторичные – 8 суток. В период наблюдения в пробирках и флаконах не отмечали признаков наличия роста бактериальной и грибной микрофлоры, что говорит о стерильности препарата и полной очистке от культур микроорганизмов, использованных в качестве матричных бактерий.

Контроль на безвредность осуществляли введением препарата подкожно белым мышам в дозе 1 см³ и поросятам 2-7-суточного возраста в дозе 8 см³ (четырекратно) перорально. В месте введения у белых мышей отмечали незначительный отек, гиперемию и болезненность самопроизвольно купирующиеся в течение 4 часов. У поросят при введении препарата признаков изменения клинико-физиологического статуса не отмечали: температура, пульс, дыхание, активность, координация движений, аппетит, реакция на раздражители, рефлексы, физиологические отправления сохранялись в пределах нормы для данной возрастной группы (по В.А. Аликаеву).

Контроль на активность препарата «Поливалентный фаговый биопрепарат против смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов», проводили на белых мышах массой 14-16 г. Для этого формировали 6 опытных групп мышей по 10 голов и 6 контрольных групп по 10 голов.

Мышам первой опытной группы внутрибрюшинно вводили *Escherichia coli* K в дозе 1 млрд. мкр. кл., что соответствует 5 LD₅₀. Спустя 20 минут мышам вводили Поливалентный фаговый биопрепарат против кишечных инфекций поросят-сосунов внутрибрюшинно в дозе 1 см³, что соответствует 10² гомологичных фаговых частиц. Контрольной группе №1 – 10 голов белых мышей, вводили только культуру *E. coli* K в аналогичной дозе.

Мышей второй опытной группы внутрибрюшинно инфицировали штаммом *Morganella morganii* (№36/82) в дозе 750 тыс. мкр. кл., что соответствует 5 LD₅₀, после чего вводили поливалентный фаговый биопрепарат против кишечных инфекций поросят-сосунов способом, аналогичным первой группе. Во второй контрольной группе проводили заражение мышей в той же дозе без применения фагового препарата.

Мышам третьей опытной группы внутрибрюшинно вводили *Citrobacter freundii* №9 в дозе 1,5 млрд. мкр. кл., что соответствует 5 LD₅₀. Спустя 20 минут мышам внутрибрюшинно вводили фаговый биопрепарат аналогично первой и второй группе. Третьей контрольной вводили только культуру *Citrobacter freundii* №9 в аналогичной дозе.

Мышам четвертой опытной группы внутрибрюшинно вводили *Proteus vulgaris* №261 в дозе 1 млрд. мкр. кл. что соответствует 5 LD₅₀ *P. vulgaris* №261. Спустя 20 минут им аналогично вводили фаговый биопрепарат. Третьей контрольной вводили только культуру *Proteus vulgaris* №261 в той же дозе.

Мышам пятой опытной группы внутрибрюшинно вводили *Enterobacter cloacae* №1005 в дозе 1,5 млрд. мкр. кл. что соответствует 5 LD₅₀ *En. cloacae* №1005. Спустя 20 минут им аналогично вводили фаговый биопрепарат. Третьей контрольной вводили только культуру *En. cloacae* №1005 в той же дозе.

10 мышам шестой опытной группы подкожно вводили *все пять штаммов энтеробактерий в дозе LD₅₀*. Спустя 20 минут мышам подкожно вводили Поливалентный фаговый биопрепарат в дозе 2 см³. Контрольной группе №5 – 10 голов белых мышей, вводили только культуры в аналогичных дозах.

За лабораторными животными наблюдали 8-10 дней, павших мышей вскрывали и из их паренхиматозных органов, а также крови сердца и костного мозга (трубчатой кости) проводили высевы на МПА, в МПБ, агары Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфитный агар.

Культуры исследовали микроскопией мазков, окрашенных по Граму, идентификацию проводили при исследовании биохимических свойств на средах Гиса [13].

Учитывали сохранность мышей в группе по истечении периода наблюдения и наличие бактерионосительства при усыплении выживших мышей, вскрытии и бактериологическом исследовании. Контроль активности считали успешным при сохранности в опытной группе не менее 80 %, при этом сохранность в контрольной группе составляла не более 20 % мышей и из патологического материала от павших мышей контрольных групп выделены соответствующие возбудители, использованные для инфицирования.

Результаты исследований. Проведение контролей показало, что приготовленный препарат по описанной технологии стерилен от бактерий (в т.ч. анаэробных) и грибов, безвреден для лабораторных животных (белые мыши) и объекта применения (поросята-сосуны) и обладает лечебно-профилактической активностью.

Результаты острых лабораторных экспериментов по инфицированию белых мышей показало, что в опытных группах, где, вслед за летальной дозой культуры возбудителя вводили биопрепарат, сохранность составила 90-100 %. При этом, по окончании периода наблюдения – 14 дней и бакте-

риологическом исследовании всех мышей опытных групп, инфицирующих бактерий не выделяли. В контрольных группах, инфицированных как монокультурами, так и (в пятой группе) смесью пяти возбудителей, гибель была максимальной, составила 90-100 % при выделении энтеробактерий из патологического материала от лабораторных животных во всех случаях.

Исследования повторили трижды, получили симметричные результаты. В дальнейшем контроль осуществляли для каждой экспериментальной серии приготовленного препарата.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о высокой активности сконструированного нами препарата «Поливалентный фаговый биопрепарат против смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов» в лабораторных условиях *in vivo* на белых мышах.

Библиографический список:

1. Золотухин, С.Н. Бактериофаги *Morganella morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят /С.Н.Золотухин// Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук - Московская ветеринарная академия им. К.И. Скрябина. – М.– 1994. – 16 с.
2. Мелехин, А.С. Фагопрофилактика смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов, вызываемой патогенными энтеробактериями / А.С. Мелехин, С.Н. Золотухин., Д.А. Васильев., Д.С. Золотухин., Г.А.Шевалаев. // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. – Материалы международной научной конференции. – Ульяновск – 2012. Т. 1. С. 262-267.
3. Пименов, Н.В. Перспективы применения бактериофагов в ветеринарии. / Н.В. Пименов // Ветеринария и кормление. – 2009. – №5. – С. 34-35
4. Пименов, Н.В. Совершенствование средств и методов борьбы с сальмонеллезом птиц / Н.В. Пименов // Ветеринария и кормление. – 2012. – №4. – С. 32-33
5. Пименов, Н.В. Бактериофаги в борьбе с сальмонеллезом птиц / Н.В. Пименов //Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы междунар. науч.-практ. конф.: Ульяновск, 23-25 апреля 2013 г./ УГСХА им. П.А. Столыпина. – Ульяновск. – 2013. – Т. II. – С. 51-55
6. Пименов, Н.В. Бивалентный бактериофаг против сальмонеллеза птиц / Н.В. Пименов // Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии: Сб. науч. тр. мол.ученых. – ФГОУ ВПО МГАВМиБ. – М. – 2011. – вып. 7. – С. 168-174.
7. Ленёв, С.В. Бактериофаги для лечения и профилактики сальмонеллеза птиц / С.В. Ленёв, Н.А. Дрогалина, С.А. Бугаев // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для человека и животных: Мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., 21-23 июня 2006 года. – Ульяновск. – 2006. – С. 417.
8. Золотухин, С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев. – Ульяновск. – 2005. - С. 5-8.
9. Золотухин, С.Н. Неспецифическая профилактика смешанной кишечной инфекции телят и поросят / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Л.С. Каврук // Практик. – СПб. – 2006. – № 6. – С. 72.
10. Мелехин А.С. Этиология смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов / А.С.Мелехин, Д.С. Золотухин, С.Н. Золотухин // Вестник ветеринарии. –Ставрополь. – 2011. – Т. 59. – № 4. – С. 75-77.
11. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин // Монография. – Ульяновск. – 2004. – С. 64 – 75.
12. Пименов, Н.В. Совершенствование системы противозпизоотической борьбы с сальмонеллезом птиц / Н.В. Пименов // Ветеринарная медицина. – М., 2012. - №3-4. – С. 101-103.
13. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии /Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М. // Учебно-методическое пособие. – Ульяновск. – 1998. – 150 с.

УДК 616:615.1- 636.92

ФАРМАКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ НАНОРАЗМЕРНОГО ФОСФОРИТА

Pharmaco-toxicological assessment and biosafety nanoscalephosphorite

А.П. Герасимов, аспирант, А.М. Ежкова*, доктор биол. наук, Д.В. Ежков, студент
AP Gerasimov, A.M. Ezhkova, D.V.Ezhkov*

Kazan State Technological University
*Tatar Research Institute of Agricultural Chemistry and Soil
andris.gera@mail.ru

Аннотация. В статье представлены данные изучению параметров безопасности наноразмерного фосфорита на лабораторных животных. Показано, что безопасной дозой при однократном введении белым мышам является доза менее 0,04 г/кг живой массы. Клинические признаки интоксикации животных проявлялись при многократном введении на 11 сутки, при суточной дозе введения 0,022 г/кг и суммарной дозе – 0,188 г/кг. Гибель 10% мышей (ЛД₁₀) регистрировали на 23 сутки при суточной дозе введения 0,076 г/кг и суммарной дозе – 0,832 г/кг. Установлено, что наноразмерный