

Библиографический список

1. Бочкарев В.Н. Лечение эндометрита у самок плотоядных аллопатическим и гомеопатическим методами / В.Н. Бочкарев, А.Г. Кухарская, Л.А. Рябуха, Л.А. Луткова // Ветеринарная патология, 2006. - № 3. - С. 74-76.
2. Дроздник В.А. Коррекция патологических процессов при экспериментальном эндометрите у собак гомеопатическим препаратом мастометрин / В.А. Дроздник, В.Н. Бочкарев // Ветеринарная патология, 2009. - № 4. - С. 60-65.
3. Комиссаренко А.А. Нанотехнологические аспекты гомеопатического лечения / А.А. Комиссаренко, Т.В. Новосадюк // Аграрный вестник Урала. - 2008. - № 5. - С. 67-69.
4. Кочуева Н.А. Гомеопатические методы коррекции репродуктивной функции самок песцов / Н.А. Кочуева, В.Н. Бочкарев, Н.В. Гарнцева // Ветеринарная патология, 2007. - № 3. - С. 204-207.
5. Славецкая М.Б. Ветеринарная гомеопатия. Лечение мелких домашних животных / М.Б. Славецкая, А.Г. Кухарская, О.В. Панферова. - М.: КолЕВ, 2006. - С. 58.
6. Славецкая М.Б. Сверхмалые дозы биологически активных веществ как основа лекарственных препаратов / М.Б. Славецкая, Н.А. Капай. - М., 2011. - 170с.
7. Сошенко Л.П. Современная ветеринарная гомеопатия / Л.П. Сошенко, Кухарская А.Г. - М., 2008. - 126с.
8. Абрамов В.Е. Критерии оценки безопасности гомеопатических лекарственных средств, предлагаемых для использования в ветеринарии / В.Е. Абрамов, В.П. Шуклин // Международный вестник ветеринарии, 2009. - № 2. - С. 54-57.
9. Государственная фармакопея СССР. X1 издание. вып. 2. - М., 1990. - 397с.
10. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве / под редакцией А.Д. Третьякова. - М.: Агропромиздат, 1988.

УДК 619:579.62:601

ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ПОЛИВАЛЕНТНОГО ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА

Мелехин Андрей Сергеевич, аспирант*

Пименов Николай Васильевич, доктор биологических наук, профессор **

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»*

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им.и П.А. Столыпина»

433407 г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел 8(8422)559535;

e-mail: fvm.zol@yandex.ru

**ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», кафедра биологии и патологии мелких домашних, лабораторных и экзотических животных

109472, г.Москва, ул. Скрябина, 23; тел.: 8(495)377-91-17;

e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

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

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.

Введение

Разнообразие форм и полиэтиологичность заболеваний поросят-сосунов, сопровождающихся поражением пищеварительного аппарата с диарейным синдромом, обосновывают поиск новых методов и средств для их лечения и профилактики. Безвредность и специфичность применения бактериофагов на фоне растущей циркуляции антибиоткорезистентных 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].

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

Объекты и методы исследований

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 P-261* УГСХА, *Phagum Enterobacter En-13* УГСХА.

Отобранные штаммы обладали свойствами, удовлетворяющими требованиям, предъявляемым к производственным фагам для лечебно-профилактических препаратов (см. таблицу 1).

Штаммы фагов получали, инкубируя их в питательной среде с гомологичными штаммами энтеробактерий: *Morganella morganii* (№36/82); *Citrobacter freundii* №9; *Escherichia coli K*; *Proteus vulgaris* №261; *Enterobacter cloacae* №1005.

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

Результаты исследований

Для накопления фаговых частиц производили высеv в разные емкости (колбы объемом 50 л) с предварительно нагретым до 37 °С разведенным 1:5 мясо-пептонным бульоном (МПБ) суспензий 7-10-часовых культур штаммов гомологичных бактерий: *Morganella morganii* (№36/82); *Citrobacter freundii* №9; *Escherichia coli K*; *Proteus vulgaris* №261; *Enterobacter cloacae* №1005 и фильтрата каждого из депонированных бактериофагов. Разведение 1:5 МПБ для высева определено предварительными опытами с высеванием для накопления фаговых частиц и полным лизисом бактериальных клеток. В более концентрированной среде матричные бактерии успевали накапливаться и заселять бульон быстрее, чем бактериофаг успевал размножиться и полностью лизировать клетки-мишени.

Культивирование проводили в течение 18 часов, после чего осуществляли очистку суспензии бактериофагов от биологической массы энтеробактерий – матричных культур, остатков клеток и компонентов питательной среды. Для этого после первичной очистки от крупнодисперстных примесей осуществляли центрифугирование среды при 6000

Таблица 1

Биологические свойства штаммов бактериофагов, использованных для изготовления поливалентного препарата

Наименование бактериофага	E-70	M-20	C-61	P-261	En-13
Семейство, морфотип фага	Myoviridae, V морф. тип	Myoviridae, V морф. тип	Myoviridae, V морф. тип	Pododoviridae, II морф. тип	Myoviridae, V морф. тип
Активность по методу Аппельмана	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
Активность по методу Грациа	$2,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$5,3 \times 10^9$	$7,9 \times 10^8$	$3,1 \times 10^9$
Специфичность	Видовая	Видовая	Родовая	Родовая	Родовая
Латентный период внутриклеточного развития (мин)	34	19	19	22	25
Урожайность 9корпускул фага на 1 бак. клетку)	160	222	146	142	101
Константа скорости адсорбции	$4,1 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$	$6,8 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$	$7,3 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$	$4,8 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$	$5,6 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$
Устойчивость к температуре 60°C	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив
Устойчивость к хлороформу	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Не устойчив	Устойчив

об./мин. в течение 30 минут. Следующим этапом осуществляли фильтрацию через системы мелкопористых бактериальных фильтров Шамберленда, приготовление концентрированной суспензии бактериофагов. Концентрацию фагов контролировали методом титрования по Аппельману. Контроль очистки от бактериальных клеток осуществляли путем посева суспензии фагов и гомологичных культур без фагов в МПБ. Положительный контроль считали по отсутствию мутности среды (роста культур) в пробирках с высевным фагом и по выраженной мутности питательной среды при росте бактерий.

При контроле суспензии бактериофагов их концентрацию доводили до уровня 10^8 фаговых частиц в 1 см^3 . В качестве консерванта приготовленной суспензии фагов применяли раствор хинозола до его конечной концентрации в фаголизате – 0,01 %. Готовый препарат формировали смешиванием консервированных суспензий бакте-

риофагов Phagum Morganella morganii M-20 УГСХА, Phagum Escherichia coli E-70 УГСХА, Phagum Citrobacter C-61 УГСХА, Phagum Proteus P-261 УГСХА, Phagum Enterobacter En-13 УГСХА в соотношении 1:1:1:1:1, после чего проводили расфасовку, упаковку, маркировку и контроль препарата.

Препарату присвоили наименование «Поливалентный фаговый биопрепарат против смешанной кишечной инфекции поросят-сосунков», его расфасовку осуществляли во флаконы объемом 200 мл. В соответствии с концентрированием и смешиванием компонентов в 1 см^3 препарата получали 10^2 фаговых частиц каждого бактериофага. Исходя из того, что усредненная терапевтическая доза активного фага по Аппельману 10^8 - 10^9 на поросенка-сосуна массой 2-4 кг составляет 10^3 - 10^4 фаговых частиц, то нами определена лечебная доза препарата 3 см^3 , которая содержала соответствующий титр каждого фага-компонента препарата (10^4). Учитывая особенности применения ораль-

ного 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 мясопептонный 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 посева при температуре 37°С. Через 2 суток из жидких сред делали пересевы на МПА, МПБ и мясопептонный печеночный бульон (МППБ) по 0,2 см³. Первичные посева 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 клинко-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.

Таблица 2

Активность Поливалентного фагового биопрепарата против смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов в острых лабораторных опытах на белых мышах

Группа, штамм инфицирования	Доза инфицирования	Мышей в группе, гол.	Пали, гол.	Сохранность, %	Выделена инфицирующая культура (из материала трупов и оставшихся в живых мышей в группе)	
					гол.	%
1 опытная, <i>E. coli K</i> + бактериофаг	1 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	0	100	0	0
1 контрольная, <i>E. coli K</i>	1 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	10	0	10	100
2 опытная, <i>M.morganii</i> №36/82+ бактериофаг	750 тыс. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	1	90	1	10
2 контрольная, <i>M.morganii</i> №36/82	750 тыс. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	9	10	10	100
3 опытная, <i>C.freundii</i> №9+ бактериофаг	1,5 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	0	100	1	10
3 контрольная, <i>C. freundii</i> №9	1,5 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	9	10	10	100
4 опытная, <i>P. vulgaris</i> №261+ бактериофаг	1 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	0	100	0	0
4 контрольная, <i>P. vulgaris</i> №261	1 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	8	20	10	100
5 опытная, <i>E.cloaceae</i> №1005 + бактериофаг	1,5 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	1	90	1	10
5 контрольная, <i>E.cloaceae</i> №1005	1,5 млрд. мкр. кл., 5LD ₅₀	10	9	10	10	100
6 опытная, <i>E. coli K</i> + <i>M.morganii</i> №36/82+ <i>C.freundii</i> №9+ <i>P. vulgaris</i> №261+ <i>E.cloaceae</i> №1005+ бактериофаг	250 тыс.м.к. +150 тыс. м.к. +300 тыс. м.к. + 250 тыс.м.к. + 300 тыс. м.к., LD ₅₀	10	1	90	0	0
6 контрольная, <i>E. coli K</i> + <i>M.morganii</i> №36/82+ <i>C.freundii</i> №9+ <i>P. vulgaris</i> №261+ <i>E.cloaceae</i> №1005	250 тыс.м.к. +150 тыс. м.к. +300 тыс. м.к. + 250 тыс.м.к. + 300 тыс. м.к., LD ₅₀	10	9	10	10	100

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.

Таким образом, 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. Как видно из результатов острых лабораторных экспериментов по инфицированию белых мышей, представленных в таблице 2, 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 бактериологическом исследовании всех мышей опытных групп инфицирующих бактерий не выделяли. В контрольных группах, инфицированных как монокультурами, так и (в шестой 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.

Выводы

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 : монография / С.Н. Золотухин. – Ульяновск. – 2004. – С. 64 – 75.

12. Пименов, Н.В. Совершенствование системы противозооотической борьбы с сальмонеллезом птиц / Н.В. Пименов // Ветеринарная медицина. – М., 2012. - №3-4. – С. 101-103.

13. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии : Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. – Ульяновск. – 1998. – 150 с.

УДК 619:615.33:612.336.3:636.934.57

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА МОЛОДНЯКА НОРОК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКОВ

Суетнова Наталья Викторовна*, аспирантка

Ноздрин Григорий Антонович*, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Фармакология и общая патология»

Лемяк Анастасия Александровна**, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологического контроля

¹ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет» г. Новосибирск, ул. Добролюбова 160; тел:8-913-707-4883, nozdrin.grigory@yandex.ru.*

ООО НПФ «Исследовательский центр», Новосибирская область, р.п. Кольцово, пром-зона, корпус 200, офис 426, Россия. 8-961-875-6175, leliak2@yandex.ru**

Ключевые слова: пробиотики, норка, микробиоценоз, кишечная микрофлора, штамм, условно патогенная микрофлора, нормофлора, бактерии.

Определено влияние пробиотических препаратов Ветом 1.1 и Ветом 1.23 на микробиоценоз кишечника норок. Установлено увеличение количества нормальной микрофлоры и снижение содержания условно патогенной микрофлоры.

Введение

В процессе эволюционного развития у животных и птицы формируется определенный микробиоценоз кишечника, обуслов-

ленный присутствием нормальной или резидентной микрофлоры [1-7]. Однако в процессе жизни кишечник животных заселяется антигенно чужеродной микрофлорой, что