

УДК 619:618.14-002:636.22/.28:615.37

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭНДОМЕТРИТОВ КОРОВ

Д. С. Борисовец¹, И. И. Кузьминский², Г. Е. Толяронок³, Е. А. Степанова⁴,
Е. С. Журавлева⁵, А. М. Морозов⁶, А. В. Лиленко⁷, Т. А. Зуйкевич⁸,
П. А. Красочко⁹, Я. П. Яромчик¹⁰

¹ Заведующий отделом, доцент, кандидат ветеринарных наук, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь, e-mail: borisovets_bievm@mail.ru

² Заведующий отделом, доцент, кандидат ветеринарных наук, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

³ Ведущий научный сотрудник, доцент, кандидат ветеринарных наук, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

⁴ Ведущий научный сотрудник, доцент, кандидат ветеринарных наук, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

⁵ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

⁶ Младший научный сотрудник, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

⁷ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

⁸ Старший научный сотрудник, кандидат сельскохозяйственных наук, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

⁹ Заведующий кафедрой, профессор, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь, e-mail: vsavm@vsavm.by

¹⁰ Доцент, кандидат ветеринарных наук, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь, e-mail: vsavm@vsavm.by

РЕЗЮМЕ

Важным условием развития молочного скотоводства являются воспроизводство поголовья крупного рогатого скота и полное сохранение молодняка. Одной из причин, вызывающих бесплодие и снижающих темпы воспроизводства стада, являются послеродовые воспалительные процессы эндометрия. Вопросы профилактики и лечения послеродового эндометрита, несмотря на большое количество антимикробных препаратов, в настоящее время остаются актуальными, что связано с проблемой роста антибиотикорезистентности патогенов. Статья посвящена разработке комплексного препарата на основе бактериофагов для лечения коров с воспалительными заболеваниями репродуктивных органов. При изучении структуры микроорганизмов, вызывающих осложнение послеродовых эндометритов у коров, установлено, что наиболее часто выделяются: *Staphylococcus epidermidis* (50%), *Klebsiella pneumoniae* (32%), *Proteus vulgaris* (20%), *Escherichia coli* (20%), *Staphylococcus aureus* (12%), *Staphylococcus pyogenes* (8%), *Pseudomonas aeruginosa* (4%). Также при бактериологическом исследовании отмечено наличие грибов – *Mucor* (20%), *Aspergillus flavus* (8%), *Penicillium* (4%). Проведен подбор штаммов бактериофагов, лизирующих выделяемые микроорганизмы, и бактерий-симбионтов, угнетающих рост возбудителей эндометрита у коров. Проведенные в лабораторных условиях испытания показали, что разработанный комплексный препарат стерилен, безвреден, реактогенен и нетоксичен. По результатам клинических испытаний изготовленного экспериментального образца установлено, что эффективность препарата достигает 40% при лечении коров, больных острым послеродовым эндометритом, по схеме: внутриматочно в дозе 100 мл с интервалом 24 ч в течение 9–15 дней до клинического выздоровления.

Ключевые слова: эндометриты, крупный рогатый скот, воспалительные заболевания репродуктивных органов, бактериофаг, бактерии-симбионты.

UDC 619:618.14-002:636.22/.28:615.37

DEVELOPMENT OF COMPLEX BIOLOGICAL FOR CATTLE ENDOMETRITIS

**D. S. Borisovets¹, I. I. Kuzminskiy², G. Ye. Tolyaronok³, Ye. A. Stepanova⁴,
Ye. S. Zhuravleva⁵, A. M. Morozov⁶, A. V. Lilenko⁷, T. A. Zuykevich⁸,
P. A. Krasochko⁹, Ya. P. Yaromchik¹⁰**

¹ Head of Division, Associate Professor, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk,
Republic of Belarus, *e-mail: borisovets_bievm@mail.ru*

² Head of Division, Associate Professor, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

³ Leading Researcher, Associate Professor, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

⁴ Leading Researcher, Associate Professor, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

⁵ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

⁶ Junior Researcher, RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk,
Republic of Belarus

⁷ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

⁸ Senior Researcher, Candidate of Science (Agriculture),
RUP S. N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

⁹ Head of Department, Professor, Doctor of Science (Veterinary Medicine),
Doctor of Science (Biology), UO Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic
of Belarus, *e-mail: vsavm@vsavm.by*

¹⁰ Associate Professor, Candidate of Science (Veterinary Medicine), UO Vitebsk State Academy of
Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus, *e-mail: vsavm@vsavm.by*

SUMMARY

Cattle reproduction and total viability of young stock are important factors for development of dairy farming. One of the causes of infertility and lower reproduction rate is postpartum inflammation of endometrium. Despite numerous antimicrobials, prevention and treatment of postpartum endometritis remain a relevant issue due to growing antimicrobial resistance (AMR) of pathogens. The article focuses on development of a complex bacteriophage-based product for treatment of cows having inflammatory diseases of reproductive organs. Study of the structure of microorganisms causing complications of postpartum endometritis in cows revealed that the most commonly detected are the following: *Staphylococcus epidermidis* (50%), *Klebsiella pneumoniae* (32%), *Proteus vulgaris* (20%), *Escherichia coli* (20%), *Staphylococcus aureus* (12%), *Staphylococcus pyogenes* (8%), *Pseudomonas aeruginosa* (4%). Bacteriological analysis also showed the presence of fungi – *Mucor* (20%), *Aspergillus flavus* (8%), *Penicillium* (4%). We selected strains of bacteriophages that lyse the excreted microorganisms and those of symbiotic bacteria that inhibit growth of cattle endometritis agents. Laboratory tests showed that the developed complex product was sterile, innocuous, reactogenic and non-toxic. The results of clinical trials of the manufactured experimental sample indicated that the efficiency of the product attained 40% during treatment of cows hit by acute postpartum endometritis according to the following scheme: by intrauterine administration route in the dose of 100 ml at the interval of 24 h during 9–15 days till clinical convalescence.

Key words: endometritis, cattle, inflammatory diseases of reproductive organs, bacteriophage, symbiotic bacteria.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем воспроизводства молочного стада являются послеродовые воспалительные процессы эндометрия. По данным Р. Г. Кузьмича, послеродовой эндометрит наблюдается у 18,5–38,1% отелившихся коров [3].

При несвоевременном или недостаточно эффективном лечении острый эндометрит в большинстве случаев переходит в хронический с развитием необратимых изменений в матке, что приводит к постоянному бесплодию. Выбраковка коров из стада по причинам гинекологических заболеваний и яловости составляет 8,8–13,9%, а иногда до 30% [1].

Видовой состав микрофлоры, вызывающей неспецифическое воспаление гениталий у коров, довольно разнообразен, но преобладают в основном стрептококки, диплококки, стафилококки, протей и кишечная палочка.

Для лечения коров, больных эндометритом, в настоящее время все большую популярность приобретают биологические препараты на основе бактериофагов, отличающиеся высокой чувствительностью к ним патогенной микрофлоры, сочетаемостью со всеми видами традиционной антибактериальной терапии, отсутствием противопоказаний к применению [2, 5, 6].

Цель работы – разработка технологии изготовления комплексного биопрепарата на основе бактериофагов для лечения коров с воспалительными заболеваниями репродуктивных органов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе отдела вирусных инфекций, отдела патологии размножения и ветеринарной санитарии и в виварии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

На первой стадии исследований была изучена структура микроорганизмов, вызывающих осложнение послеродовых эндометритов у коров при различных технологиях содержания. Проведен подбор штаммов бактериофагов, лизирующих микроорганизмы, выделяемые при послеродовых эндометритах, и штаммов бактерий-симбионтов, угнетающих рост возбудителей эндометрита у коров.

При этом осуществляли отбор биологического материала – содержимое пораженных репродуктивных органов от больных коров (25–30 проб) из 5 животноводческих хозяйств Республики Беларусь. В материале определяли наличие эшерихий, бацилл, псевдомонад, кокков, клебсиелл, сальмонелл, протей с использованием дифференциально-диагностических сред для первичного скрининга бактерий (до рода). Наиболее часто выделяемые бактерии дифференцировали до вида. Изучение патогенности выделенных культур проводили по общепринятым методикам.

Подбор и оценку антагонистической активности штаммов бактерий-симбионтов в отношении выделенных при эндометритах коров микроорганизмов провели методом диффузии с использованием мясо-пептонного агара. Продукты метаболизма бацилл получали после культивирования их в мясо-пептонном бульоне в течение 4 сут с использованием шуттель-аппарата, после чего провели удаление бактериальных клеток центрифугированием.

Антагонистическую активность метаболитов бацилл учитывали по диаметру зоны задержки роста тест-культур вокруг лунок.

В работе использовали 10 штаммов бацилл, выделенных из объектов сельскохозяйственного значения. Тест-объектами для определения антимикробной активности культуры служили патогенные и условно-патогенные бактерии, выделяемые при генитальных заболеваниях крупного рогатого скота: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* spp.

После проведения оценки токсикологических свойств подобранных штаммов бактериофагов и бактерий-симбионтов был изготовлен лабораторный образец препарата на основе бактериофагов и проведены его испытания в лабораторных условиях.

Для работы с фагами использовали 20–24-часовые агаровые культуры или 2–6-часовые бульонные культуры. Фаги выделяли как на плотных, так и в жидких средах.

Для выявления фага на плотных средах готовили взвесь тест-культур и засеивали ее «газоном» в чашку Петри на поверхность агара. Посев подсушивали в термостате 30–40 мин и наносили на чашку каплю изучаемого материала. Чашки инкубировали при 37 °C 18–20 ч. При наличии фага в изучаемом материале происходил лизис тест-культуры.

Для выявления фага в жидкой среде в две пробирки с мясо-пептонным бульоном вносили по капле культуры микроба, в отношении которого выделяли фаг. В одну пробирку добавляли фильтрат материала, в котором определяли наличие фага, а вторая пробирка служила контролем роста культуры. Посевы термостатировали 12–20 ч при 37 °C. Результаты учитывали только при наличии роста культуры в контрольной пробирке (помутнение среды). Отсутствие видимого роста или просветление среды в пробирке с изучаемым материалом свидетельствовало о наличии фага в ней.

С целью отработки процентного соотношения компонентов препарата при подборе оптимального состава накопленные штаммы бактериофагов смешивали с защитной средой (сахароза 20%, желатин 8%) в соотношениях 1:1, 1:2, 2:1, 1:4. Полученные образцы разливали во флаконы по 2 мл. Штаммы высушивали в течение 12 ч при давлении 0,03 гПа.

После высушивания в каждом из полученных образцов определяли титр бактериофагов методом Аппельмана.

Далее изучали острую и хроническую токсичность лабораторного образца препарата, а также эмбриотоксическое и тератогенное действие на лабораторных животных согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» [4]. Затем был изготовлен экспериментальный образец препарата и проведены его клинические испытания, согласно разработанному лабораторному регламенту по изготовлению и контролю комплексного биопрепарата на основе бактериофагов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований при изучении структуры микроорганизмов, вызывающих осложнение послеродовых эндометритов у коров, установлено, что наиболее часто выделяются: *S. epidermidis* (50%), *Kl. pneumoniae* (32%), *Proteus vulgaris* (20%), *E. coli* (20%), *S. aureus* (12%), *S. pyogenes* (8%), *Ps. aeruginosa* (4%). Также при бактериологическом исследовании отмечено наличие грибов – *Mucor* (20%), *Aspergillus flavus* (8%), *Penicillium* (4%).

На основании полученных данных проведен подбор штаммов бактериофагов, лизирующих микроорганизмы, выделяемые при послеродовых эндометритах у коров.

В процессе оценивали литическое действие фагов в отношении выделенных изолятов микроорганизмов на плотной питательной среде по методу Отто.

В результате проведенных исследований установлен полный лизис бактериальной культуры *Kl. pneumoniae*, что явилось основанием для отбора изолята бактериофага в отношении вышеуказанного возбудителя.

При определении антагонистической активности бацилл в отношении условно-патогенных микроорганизмов было установлено, что наиболее активными оказались выделенные нами штаммы бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* № 33 и № 141 (табл.).

Выделенные изоляты бактерий-симбионтов и бактериофагов невирулентны для лабораторных животных, не обладают токсичностью, токсигенностью и не вызывают у животных клинических симптомов интоксикации и гибели.

Далее в процессе лабораторных испытаний изготовленного образца препарата были получены следующие результаты: наиболее высокие титры (10^{-7}) наблюдались при соотношении бактериофаг / защитная питательная среда – 1:1. За титр бактериофага принимали то его наибольшее разведение, которое вызывает полное растворение соответствующих тест-культур микроорганизмов.

Таблица

Диаметр зоны подавления роста (мм) условно-патогенных микроорганизмов бактериями рода *Bacillus*

Бациллы	Условно-патогенные микроорганизмы				
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>B. subtilis</i> № 17	2	2	4	4	4
<i>B. subtilis</i> № 28	4	2	2	4	3
<i>B. subtilis</i> № 33	4	4	6	4	4
<i>B. subtilis</i> № 42	4	4	4	4	4
<i>B. subtilis</i> № 85	2	4	4	6	2
<i>B. subtilis</i> № 101	4	0	4	2	2
<i>B. subtilis</i> № 111	0	0	4	0	0
<i>B. subtilis</i> № 133	2	4	4	2	2
<i>B. subtilis</i> № 135	6	0	6	2	4
<i>B. subtilis</i> № 141	6	4	4	6	2

При определении стерильности лабораторного образца комплексного препарата отмечено, что в течение 10 сут (время наблюдения) в пробирках с посевами на бактериологических питательных средах (мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, среда Китта-Тароцци и среда Сабура) рост бактерий и грибов отсутствовал, изменений (цвет, наличие осадка и т. д.) не выявлено, что свидетельствует о его стерильности.

Безвредность и реактогенность оценивали в опыте на белых мышах ($n = 10$) массой 18–20 г путем подкожного введения образцов препарата в объеме 0,2 см³.

В качестве контроля использовали 10 мышей, которым вводили стерильный физиологический раствор хлорида натрия в объеме 0,2 см³. Наблюдение за животными проводили в течение 10 сут после введения лабораторного образца препарата, при этом учитывали их поведение (возбуждение или угнетение), внешний вид, аппетит, жажду, степень проявления реакции на внешние раздражители.

В результате проведенного контроля установили, что подкожное введение образцов комплексного препарата 10 клинически здоровым белым мышам не вызывало у них изменений клинического состояния, гибели и патологических изменений на месте введения в течение всего срока наблюдения, что свидетельствует о безвредности и реактогенности исследуемого препарата.

Оценку литического действия изготовленного лабораторного образца препарата проводили на плотной питательной среде по методу Отто с использованием тест-культуры микроорганизмов *Kl. pneumoniae*. Для проведения исследований использован штамм *Kl. pneumoniae*, депонированный в коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

В результате проведенных исследований установлено, что на месте закапывания препарата в разведениях 10^{-6} и 10^{-7} наблюдался полный лизис тест-культуры *Kl. pneumoniae*, рост бактерии не выявлен.

Изучено влияние лабораторного образца препарата в разведениях 10^{-6} и 10^{-7} на рост производственных штаммов *Bacillus licheniformis* КМИЭВ В-176 и *Bacillus subtilis* КМИЭВ В-172, депонированных в коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

Установлено, что через 18–24 ч после постановки реакции отмечается сплошной рост тест-микроорганизмов *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*, ни одного стерильного пятна не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о наличии специфической литической активности лабораторного образца препарата на основе бактериофагов на штамм микроорганизмов *Kl. pneumoniae*.

По параметрам острой токсичности, согласно классификации ГОСТа 12.1.007-76, препарат на основе бактериофагов относится к IV классу опасности (вещества малоопасные) с LD₅₀ более 5000 мг/кг, в хроническом опыте на белых мышах токсическое действие препарата на организм животных не установлено. Препарат не оказывает местного раздражающего действия на кожные покровы, раздражающего действия на слизистые оболочки лабораторных животных и не обладает аллергенными свойствами. Установлено, что препарат, применяемый в токсической дозе (150 мг/кг массы тела) крысам в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза), не вызывает патологических изменений у животных, а также отклонений в развитии потомства, уродств, что свидетельствует об отсутствии у него эмбриотоксических и тератогенных свойств.

Полученные результаты позволили изготовить экспериментальный образец препарата, который был подвергнут клиническим испытаниям в производственных условиях.

Клинические исследования животных проводили по общепринятой методике акушерско-гинекологического исследования коров и телок. Во всех случаях перед началом и по окончании лечения животные подвергались клиническому обследованию с учетом общего состояния, температуры тела, наличия и характера выделений из половых путей.

По результатам испытаний установлено, что эффективность препарата достигает 40% при лечении коров, больных острым послеродовым эндометритом, по схеме: внутриматочно в дозе 100 мл с интервалом 24 ч в течение 9–15 дней до клинического выздоровления.

Объем исследований составил: 270 доз экспериментального образца препарата, использовано 30 коров, проведено 260 клинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в ходе исследования результаты позволяют утверждать, что разработанный на основе бактериофагов комплексный биопрепарат для лечения коров с воспалительными заболеваниями репродуктивных органов способствует сокращению срока лечения, сервис-периода и индекса осеменения, повышению их воспроизводительной способности в условиях интенсивного ведения молочного скотоводства, а также может рассматриваться как эффективное, экологически безопасное и не оказывающее отрицательного влияния на качество животноводческой продукции средство лечения эндометритов у коров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева А. В. Некоторые показатели естественной резистентности организма коров, больных эндометритами // Вестник ветеринарии: научные труды Академии ветеринарной медицины. – Оренбург, 2002. – Вып. 5. – С. 13–17.
2. Громыко Е. В. Этио-патогенетическая терапия эндометритов у коров: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Саратов, 2010. – 21 с.
3. Кузьмич Р. Г. Послеродовые эндометриты у коров: автореф. дис. ... докт. вет. наук. – Витебск, 2000. – 38 с.
4. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / сост.: А. Э. Высоцкий [и др.]; НАН Беларуси, Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского. – Минск, 2007. – 156 с.
5. Пименов Н. В. Перспективы применения бактериофагов в ветеринарии // Ветеринария и кормление. – 2009. – № 5. – С. 34–35.
6. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. Jr. Bacteriophage therapy (minireview) // Antimicrob. Agents Chemother. – 2001. – Vol. 45 (3). – P. 649–659; DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.