

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к получению этиотропного биопрепарата для профилактики и лечения послеродовых эндометритов и других воспалительных акушерско-гинекологических заболеваний сельскохозяйственных животных.

Наиболее близок к предлагаемому "ветбактерин", оказывающий профилактический эффект у животных при гнойно-воспалительных процессах различной локализации, в том числе и при эндометритах [1].

"Ветбактерин" представляет собой лиофилизированную биомассу штамма *Bacillus pulvifaciens* №В-4348. Штамм продуцирует протеолитические ферменты и антибиотик, подавляющий рост ряда видов гноеродной микрофлоры. Препарат безвреден для животных. В 1мг сухого препарата содержится 400млн жизнеспособных клеток.

Для изготовления "ветбактерина" в микробиологические метрацы разливают по 250мл 3% - ного стерильного мясо-пептонного агара (МПА). Засевают культурой штамма *B. pulvifaciens* В-4348. Для этого в матрацы с МПА вносят по 10мл взвеси клеток штамма, содержащей 200млн клеток в 1мл 0,9% - ного раствора хлорида натрия. Культивируют при 36 - 37°С. Через 24ч культуру смывают стерильным 0,9% - ным раствором хлорида натрия, из расчета 100мл на матрац. Полученную взвесь разливают в стеклянные флаконы и лиофилизируют в течение 24ч. Этим способом достигается титр жизнеспособных клеток в 1г сухого препарата $4,0 \times 10^{11}$. Кроме лиофилизированных клеток культуры *B. pulvifaciens* других компонентов в препарате "ветбактерин" не содержится. Применяют "ветбактерин" для профилактики гнойно-воспалительных заболеваний животных различной локализации, в том числе и эндометритов. Вводят его с кормом по 10 - 50 или 50 - 100млрд клеток, 1 или 2 раза в сутки.

Недостатком "ветбактерина" является то, что его основу составляет один штамм бактерий, что не дает достаточно широкого спектра антагонистического действия. Мясо-пептонный агар, как питательная среда для выращивания штамма, составляющего основу препарата, является дорогостоящим и дефицитным. Вместе с трудоемким и малопродуктивным поверхностным способом выращивания культуры-продуцента это ведет к значительному удорожанию продукта, что имеет большое значение для широкого использования препарата в животноводстве и ветеринарии. Способ получения "ветбактерина" менее продуктивный. Для достижения в конечном итоге 400млрд клеток в 1г сухого препарата требуются многочисленные смывы культуры с поверхности плотной среды во многих матрацах. При данном способе выращивания в препарате могут содержаться только вегетативные клетки культуры, а без наличия спорных форм не будет достаточной стабильности и необходимого срока годности для выпускаемого продукта.

Получение препарата путем лиофилизации, а тем более методом распылительной сушки, взвеси вегетативных клеток в изотоническом растворе хлорида натрия без стабилизатора не дает высоких процентов сохранения в биопрепарате жизнеспособных клеток.

Потеря многих биологически активных веществ после смыва клеток с поверхности плотной питательной среды, в которую эти вещества продиффундировали и которая отбрасывается, снижает биологическую активность препарата.

В описании "ветбактерина" приведено только его профилактическое применение и действие.

В основу изобретения поставлена задача создания биопрепарата "эндоспорин" с высокой антагонистической и другой биологической активностью на основе бактерий *Bacillus subtilis*, в результате чего возможно его широкое применение для лечения и профилактики послеродовых эндометритов и других акушерско-гинекологических заболеваний сельскохозяйственных животных.

Поставленная задача решается тем, что в биопрепарате "эндоспорин", содержащем сухую биомассу клеток и спор *B. subtilis*, стабилизатор и сухой остаток среды роста с метаболитами бактерий, согласно изобретению бактерии вида *Bacillus subtilis* представлены штаммами *B. subtilis* 39 и *B. subtilis* 51 при следующем соотношении компонентов на 1г сухого вещества:

Штамм <i>Bacillus subtilis</i> 39, кл	$4 - 5 \times 10^{11}$
Штамм <i>Bacillus subtilis</i> 51, кл	$4 - 5 \times 10^{11}$
Стабилизатор:	
Сахароза, мг	40
Желатина, мг	10
Сухой остаток среды роста и метаболиты бактерий	Остальное

Штаммы *Bacillus subtilis* целенаправленно получены и селекционированы после исследования их большого количества на антагонистическую активность в отношении наиболее распространенных возбудителей послеродовых гнойных процессов гениталий маточного поголовья животных, чему предшествовали широкие исследования микрофлоры при данных патологиях.

Штаммы депонированы в коллекции живых культур микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии АН Украины под номерами *Bacillus subtilis* 39 и *Bacillus subtilis* 51.

Способ получения "эндоспорина" включает раздельное культивирование штаммов *B. subtilis* 39 и *B. subtilis* 51 на дешевой жидкой питательной среде следующего состава, %: зеленая патока 3,0; кукурузный экстракт 5,0; магний сернокислый 0,08; калия фосфат однозамещенный 0,9; кальция ацетат 0,5; аммония сульфат 0,094; пропиол Б-400 0,06; вода водопроводная остальное. рН питательной среды 7,0 - 7,4. Для достижения максимальной продуктивности биотехнологического процесса получения эндоспорина все его составляющие условия отработаны в многочисленных разносторонних экспериментальных вариантах.

Состав среды и соотношение компонентов получены после ее оптимизации методами математического планирования эксперимента и исследований физиологии штаммов. Оптимальные для максимальной продуктивности штаммов количества и соотношения основных источников питания иллюстрируются табл.1. Культивирование обоих штаммов проводится при +37°, аэрации - 1л воздуха на 1л среды и 1000 оборотов мешалки в минуту в течение 18 - 24ч.

Таким способом культивирования достигается высокая продуктивность для обоих штаммов, которая выражается титром жизнеспособных бактериальных тел в среде роста от 10^{10} до 10^{11} в 1мл и образованием спор

от 30 до 50% общего количества клеток. Лучшее соотношение штаммов для проявления наиболее широкой антимикробной активности иллюстрируется табл.2.

Полученные культуральные жидкости с высоким титром биомассы смешивают в равном соотношении и добавляют к общему их объему 10% стерильного водного раствора стабилизатора, содержащего 10% желатины и 40% сахарозы.

Полученная смесь после тщательного перемешивания высушивается методом распылительной сушки и расфасовывается в условиях исключающих кантаминацию в стерильные стеклянные пенициллиновые флакончики по 0,5г сухой биомассы с содержанием не менее 400 - 500млрд микробных тел.

Процесс высушивания может осуществляться также и методом лиофильной сушки при первоначальном разливке смеси культуральных жидкостей обоих штаммов и стабилизатора во флакончики или ампулы в объемах, пригодных для лиофилизации и содержащих не менее 400 - 500млрд жизнеспособных клеток. После сушки и расфасовки (расфасовки и сушки) флакончики или ампулы закрываются или запаиваются в стерильных условиях.

Препарат "эндоспорин" содержит значительно большее количество жизнеспособных клеток (в 0,5г сухого препарата не менее 400 - 500млрд клеток) и весь комплекс биологически активных веществ, продуцируемых штаммами в среде роста и внутриклеточных. "Эндоспорин" представляет собой помещенные в закрытые стерильные стеклянные флакончики или ампулы высушенные лиофильно или методом распылительной сушки живые вегетативные клетки и споры бактерий, стабилизатор - желатину и сахарозу, сухие компоненты питательной среды и биологически активные вещества, поступившие в среду роста бактерий: протеолитические ферменты, аминокислоты, лизоцим, антибиотики, экзополисахариды.

В 1г сухого препарата "эндоспорин" содержится не менее $1,0 \cdot 10^{12}$ жизнеспособных клеток бактерий, 40мг сахарозы, 10 мг желатины, биологически активные вещества в сухом остатке среды роста - остальное. Препарат расфасован в ампулы или флаконы по 0,5г, где будет не менее $4,0 - 5,0 \cdot 10^{11}$ клеток, что составляет рекомендуемую разовую дозу для крупного рогатого скота. Обоснованность дозы иллюстрируется табл.3.

"Эндоспорин" сохраняет весь комплекс биологической активности штаммов, составляющих его основу. Безвреден для теплокровных животных в дозах, в 200 раз превышающих рекомендуемые для лечения.

Препарат подавляет рост патогенной и условно патогенной гноеродной микрофлоры, стимулирует индукцию эндогенного сывороточного интерферона. В высокой степени повышает бактерицидную активность макрофагов перитонеального экссудата. Стимулирует разные стадии фагоцитоза. "Эндоспорин", помещенный в стерильные закрытые флакончики или ампулы, сохраняют при температуре не выше 20°C. Срок годности - 3 года со дня изготовления. Преимуществами "эндоспорина" является то, что его основу составляют 2 штамма бактерий, полученных целенаправленно в отношении возбудителей эндометритов взаимно дополняющих друг друга по биологическим активностям, чем расширяется спектр антимикробного действия и повышается его эффективность. Способ получения "эндоспорина" заключается в использовании не содержащей пищевых компонентов дешевой питательной среды, разработке более прогрессивной и более высокопродуктивной безотходной технологии глубинного культивирования, что обуславливает высокую производительность и рентабельность, и низкую себестоимость препарата. Получение таким способом культур бактерий - основы биопрепарата в споровой форме за 18 - 24ч роста в смеси со стабилизатором делает "эндоспорин" стабильнее и увеличивает срок годности.

Полученный препарат "эндоспорин" применяют для профилактики и лечения послеродовых гнойно-воспалительных акушерско-гинекологических заболеваний животных следующим образом.

Содержимое флакона или ампулы (не менее 400 - 500млрд микробных клеток) разбавляют в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия (воде, 0,5% - ном растворе новокаина) в объеме, пригодном для внутриматочного введения (с лечебной целью) или для внутривагинального введения (с профилактической целью).

Препарат вводят с соблюдением правил асептики и антисептики.

Рекомендуемая разовая доза для крупного рогатого скота составляет 400 - 500млрд клеток (1 флакон или ампула) (табл.3).

Профилактический эффект с целью предупреждения послеродовых гнойно-воспалительных процессов и задержки последа оказывает даже однократное введение "эндоспорина" стельным коровам внутривагинально или на шейку матки за 10 - 15дней до планового отела.

Лечебный эффект, в зависимости от тяжести гнойного патологического процесса, достигается при двух-трехкратном внутриматочном введении "эндоспорина" с двух-трехдневными интервалами между введениями или до клинического выздоровления в тяжелых случаях.

Применение "эндоспорина" в хозяйствах показало его выраженную эффективность в терапии и профилактике послеродовых гнойно-воспалительных процессов гениталий маточного поголовья животных.

Источники информации

1. Авторское свидетельство СССР №1723117, кл. А61К35/74, опублик. 30.08.1992.

Т а б л и ц а 1

Зависимость продуктивности штаммов от количества и соотношения
основных источников питания

Вариант	Источники азота и углерода	К-во и соотношения, %	Титр жизнеспособных клеток штаммов			
			39		51	
			Общий	% спор	Общий	% спор
1	Кукурузный экстракт Зеленая патока	4,0-4,5 2,0-2,5	$8,0 \cdot 10^8$ - $2,0 \cdot 10^9$	20-30	$1,0 \cdot 10^9$ - $5,0 \cdot 10^9$	20-35
2	Кукурузный экстракт Зеленая патока	5,0-5,5 3,0-3,5	$1,0 \cdot 10^{10}$ - $1,0 \cdot 10^{11}$	30-50	$1,0 \cdot 10^{10}$ - $1,0 \cdot 10^{11}$	30-50
3	Кукурузный экстракт Зеленая патока	6,0-6,5 4,0-4,5	$6,0 \cdot 10^9$ - $2,0 \cdot 10^{10}$	20-40	$4,0 \cdot 10^9$ - $7,0 \cdot 10^9$	15-35

Т а б л и ц а 2

Зависимость антимикробной активности эндоспорина
от соотношения монокультур, входящих в его состав

Соотношение штаммов 39 и 51	Антимикробная активность в мм зон задержки роста						
	S. aureus	E. coli	P. vulgaris	S. typhi	C. michiganense	C. albicans	P. aeruginosa
2:1	25	20	28	20	0	30	0
1:2	10	10	15	10	18	10	20
1:1	22	18	25	18	15	28	18

Т а б л и ц а 3

Лечебная эффективность разных доз "эндоспорина" при эндометритах
крупного рогатого скота

Группа живот- ных	К-во живот- ных	Диагноз	Разовая доза "эндо- спори- на", млрд. клет.	Крат- ность введе- ния	К-во здоро- вых	Сроки выздо- ровле- ния, дни	Сервис период, дни (средн.)	% стель- ности
Контроль	15	Клинически здоровые	-	-	15	-	45	100
Опыт	20	Эндометрит	100	3-4	15	25-30	88	75
Опыт	20	То же	250	3-4	18	23-27	68	80
Опыт	22	"-"	400	2-3	22	14-21	50	100
Опыт	22	"-"	500	2-3	22	12-20	48	100