

*МЕЖДУНАРОДНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ*
Выпускается с 2004 года

ISSN 2224-168X
ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС: 00802
008022

Журнал включен в список Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Беларуси по отраслям: ветеринарные науки, биологические науки, сельскохозяйственные науки, приказ ВАК № 101 от 04.07.2005 г.

Учредители: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАН»

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Борисовец Д.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Щемелева Н.Ю. – кандидат ветеринарных наук, доцент

СЕКРЕТАРЬ:

Стрельчя И.И. – кандидат ветеринарных наук, доцент

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Мяцкова Т.Я. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Каменская Т.Н. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Андрусевич А.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Николаевич Л.Н. – кандидат биологических наук, доцент

Новикова О.Н. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Зуйкевич Т.А. – кандидат сельскохозяйственных наук

Белькевич И.А. – кандидат ветеринарных наук

НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:

Ларькова А.Е.

Лукьянова И.А.

Пуцько С.Г.

При использовании авторами материалов журнала «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария» ссылка на журнал **обязательна**

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ

Насонов И.В. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Минск)

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

Василевич Ф.И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Москва)

Гулюкин А.М. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Москва)

Забережный А.Д. – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН (г. Москва)

Карпенко Л.Ю. – доктор биологических наук, профессор (г. Санкт-Петербург)

Красочко П.А. – доктор ветеринарных, доктор биологических наук, профессор (г. Витебск)

Красочко И.А. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Витебск)

Лысенко А.П. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Минск)

Малашко В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Гродно)

Паршин П.А. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Воронеж)

Стекольников А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН (г. Санкт-Петербург)

Шабунин С.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Воронеж)

Ятусевич А.И. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Витебск)

Соляник А.В. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор (г. Горки)

Тимошенко В.Н. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор (г. Жодино)

Все статьи рецензируются.

Редакция не несет ответственности за возможные неточности, допущенные авторами. Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов.

© «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария», 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

Зубовская И.В., Белуш М.В., Бережинская А.А. ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МАСТИТОВ В ХОЗЯЙСТВАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ 3

Борисовец Д.С., Каяк Ю.А., Толяронок Г.Е., Семизон П.А., Счеслёнок Е.П., Сухоцкая Е.А. РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИЗ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ НА КУЛЬТУРЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК 8

Борисовец Д.С., Каяк Ю.А., Толяронок Г.Е., Андруевич А.С. ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ ПАСТЕРЕЛЛ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НОРОК, ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СЕЛЕКЦИЯ 12

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Высоцкий А.Э., Лысенко А.П., Кучвальский М.В. СКОРОСТЬ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ К ПРЕПАРАТАМ АНТИБИОТИКОВ, ПРИМЕНЯЕМЫМ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ 17

Новикова О.Н., Ананчиков М.А., Гордиевская О.Н. ИЗУЧЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* 25

Тяпша Ю.И., Дубаневич О.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ERIC И RAPD ПЦР В ГЕНОТИПИРОВАНИИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 29

Климко Т.И., Зинина Н.В., Архипова Н.В. ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BIFIDOBACTERIUM* ИЗ КИШЕЧНИКА РАЙОНИРОВАННОЙ ПЧЕЛЫ 34

Лайцин Ли, Цуйцуй Чен, Хуанкунь Лян, Тяньцай Лю, Вэньци Дун РАЗРАБОТКА НАБОРА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ БЫСТРОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ 39

ФАРМАКОЛОГИЯ

Николаевич Л.Н., Згировская А.А., Борисовец Д.С., Осипенко А.Е. ФОРМИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ В КАЧЕСТВЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ПЛАТФОРМЫ (ОБЗОР) 45

Костюк Н.И., Василевич И.Б., Волотовский И.Д., Притыченко А.Н., Борисик Р.Н., Руколь В.М., Стрельчяня И.И. МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ТЕРАПИИ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН ПАЛЬЦЕВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 51

САНИТАРИЯ

Высоцкий А.Э., Лысенко, А.П., Кучвальский М.В., Красникова Е.Л., Притыченко А.Н., Якобсон Е.И. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ 57

Кривенок Л.Л. СОЗДАНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «КРИОКС», ЕГО БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 66

Кривенок Л.Л. ИЗУЧЕНИЕ КОРРОЗИЙНОЙ АКТИВНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «КРИОКС» 71

CONTENTS

EPIZOOTOLOGY

Zubovskaya I.V., Belush M.V., Berezhinskaya A.A. ETIOLOGICAL STRUCTURE OF MASTITIS PATHOGENS IN FARMS OF THE REPUBLIC OF BELARUS 3

Borisovets D.S., Kayak Yu.A., Tolyaronok G.E., Semizhon P.A., Scheslenok E.P., Sukhotskaya E.A. RESULTS OF ISOLATION OF VIRUS FROM SAMPLES OF BIOLOGICAL MATERIAL FROM ANIMALS ON SENSITIVE CELL CULTURE 8

Borisovets D.S., Kayak Yu.A., Tolyaronok G.E., Andrusevich A.S. ISOLATION OF PASTERELLA STRAINS FROM BIOLOGICAL MINK MATERIAL, THEIR IDENTIFICATION AND SELECTION 12

IMMUNOBIOLOGY

Vysotsky A.E., Lysenko A.P., Kuchvalsky M.V. THE RATE OF DEVELOPMENT OF BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS USED IN ANIMAL HUSBANDRY 17

Novikova O.N., Ananchikov M.A., Gordievskaya O.N. STUDY OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND PHAGOCYTIC ACTIVITY OF BLOOD LEUKOCYTES DURING EXPERIMENTAL INFECTION OF WHITE MICE WITH *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* 25

Tsiapsha Y.I., Dubanevich O.V. USING ERIC AND RAPD PCR METHODS IN GENOTYPING *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIA 29

Klimko T.I., Zinina N.V., Arkhipova N.V. ISOLATION OF BACTERIA OF THE GENUS *BIFIDOBACTERIUM* FROM THE INTESTINES OF A ZONED BEE 34

Laiqing Li, Cuicui Chen, Huankun Liang, Tiancai Liu, Wenqi Dong DEVELOPMENT OF FLUORESCENCE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY KIT FOR AFRICAN SWINE FEVER VIRUS FAST TESTING 39

FARMACOLOGY

Nikolaevich L.N., Zgirovskaya A.A., Borisovets D.S., Osipenko A.E. FORMATION AND USE OF MULTICELLULAR SPHEROIDS AS A UNIVERSAL RESEARCH PLATFORM (REVIEW) 45

Kostyuk N.I., Vasilevich I.B., Volotovskiy I.D., Pritychenko A.N., Borisik R.N., Rukol V.M., Strelchenya I.I. MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE THERAPY OF INFECTED WOUNDS OF CATTLE FINGERS 51

SANITATION

Vysotsky A.E., Lysenko, A.P., Kuchvalsky M.V., Krasnikova E.L., Pritychenko A.N., Yakobson E.I. VITALIZATION OF MYCOBACTERIA IN SOIL AFTER TREATMENT WITH GLUTARALDEHYDE 57

Krivenok L.L. CREATION OF DISINFECTANT «CRYOX», ITS BACTERICIDAL ACTIVITY AND TOXICOLOGIC PROPERTIES 66

Krivenok L.L. STUDY OF CORROSIVE ACTIVITY AND STABILITY OF DISINFECTANT «CRYOX» 71

Компьютерная верстка: ЛУКЪЯНОВА И.А.

Подписано в печать 03.06.2024 г.

Формат 60x84^{1/8} Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 8,84 Тираж 100 экз. Заказ №

220063, г. Минск, ул. Брикета, 28. E-mail: bievm@tut.by; office@bievm.by; knir@tut.by; knir@bievm.by

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-вычислительный центр

Министерства финансов Республики Беларусь».

Свидетельства о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014. Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

УДК 619:616-076:619:618.19-002(476)

Зубовская И.В., кандидат ветеринарных наук
Белуш М.В., микробиолог
Бережинская А.А., микробиолог

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», г. Минск, Республика Беларусь

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МАСТИТОВ В ХОЗЯЙСТВАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Резюме

В результате проведенных исследований установлено, что чаще всего из проб молока от больных маститом коров выделяются патогенные стрептококки (28,9 % случаев), на втором месте по выделяемости находится *Escherichia coli* – 28,55 % случаев, далее – патогенные стафилококки – 14,17 % случаев.

Ключевые слова: мастит, стрептококки, стафилококки, возбудители, лабораторная диагностика.

Summary

As a result of the studies, it was established that most often pathogenic streptococci are isolated from milk samples from cows with mastitis (28,9 % of cases), *Escherichia coli* is in second place in terms of isolation – 28,55 % of cases, followed by pathogenic staphylococci – 14,17 % of cases.

Keywords: mastitis, streptococci, staphylococci, pathogens, laboratory diagnostics.

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Маститы коров известны с давних времен и широко распространены во всех странах мира. Стрептококковый мастит коров был описан впервые во Франции в 1884 г. В молочном скотоводстве это массовая и одна из наиболее экономически значимых болезней, наносящая очень большой ущерб, обусловленный потерей продуктивности животных, ухудшением качества молока и расходами на лечебно-профилактические мероприятия. По расчетам, мастит обходится мировой молочной промышленности в 19,7–32 млрд долларов в год [1, 2].

Мастит представляет собой воспалительное заболевание, вызываемое патогенными микроорганизмами, при котором поражается от одной до нескольких четвертей вымени коровы.

Независимо от формы мастита употребление в пищу молока недопустимо из-за его качества.

Возбудителями мастита могут являться более 100 разных микроорганизмов: бактерии, грибы, водоросли. Основные бактерии, вызывающие мастит, можно разделить на две категории: контагиозные (инфекционные) и возбудители окружающей среды [3].

В случае контагиозных возбудителей резервуаром для бактерий является само животное. Бактерии часто передаются от инфицированной коровы к здоровой при доении через доильные аппараты, руки обслуживающего персонала или многократно используемое полотенце для вытирания вымени. Кроме того, бактерии могут передаваться от коровы к корове при подтекании молока из вымени и попадании его в стойло. Основными контагиозными возбудителями мастита являются *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки (КНС), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma spp.*, *Corynebacterium bovis*.

Возбудители мастита окружающей среды могут содержаться в подстилке, навозе, почве, пастбище, а также на любых поверхностях, с которыми контактирует корова. Контаминация окружающей среды микрофлорой сильно зависит от гигиены коровника и загонов, а также самой коровы и её вымени. Основные возбудители окружающей среды – это *Streptococcus uberis*, некоторые коагулазонегативные стафилококки, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.*, *Serratia marcescens*, дрожжеподобные грибы, *Prototheca spp.*, *Bacillus spp.* [3, 4].

Возбудители из окружающей среды классифицируются в основном как грамотрицательные возбудители мастита. У инфицированных коров часто развивается системное заболевание, а данная форма мастита считается более острой.

Диагноз на инфекционный мастит устанавливают на основании эпизоотологических, анамнестических данных, клинических и лабораторных исследований, а также специальных тестов для диагностики субклинических маститов.

В основе лечения при мастите лежат освобождение вымени от патологического секрета и применение антибактериальных препаратов. Для лучшего выведения содержимого пораженной доли целесообразно использовать окситоцин, антигистаминные препараты, растворы электролитов.

В целом при лечении больных маститом животных руководствуются экономической целесообразностью. Наиболее эффективно лечение субклинических маститов. Серозный и катаральный маститы обычно излечиваются достаточно успешно, фибринозный и геморрагический – менее эффективно, но продуктивность вымени полностью не восстанавливается [5, 6].

Целью данной статьи было выявить основных возбудителей и провести статистический анализ при проведении лабораторной диагностики маститов у коров в хозяйствах Республики Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе лаборатории диагностики отдела бактериальных

инфекций и ветеринарных технологий РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». В лаборатории регулярно проводится бактериологическое исследование молока от коров, больных клиническим и субклиническим маститом, при котором определяется вид патогенной микрофлоры, распространенной в данном хозяйстве, а также чувствительность выделенных культур к различным антимикробным препаратам.

Лабораторные исследования проб молока проводили согласно Методическим указаниям по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени сельскохозяйственных животных (МУ № 02-1-30/39, утв. директором БГВЦ от 19.12.2016 г.) и Методическим указаниям по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней (МУ № 10-2-5/1112, утв. ГУВ МСХиП РБ 17.12.2007 г.).

Видовую идентификацию выделенных возбудителей маститов проводили с помощью автоматического биохимического анализатора Vitek 2 Compact.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Все основные возбудители мастита хорошо растут на обычных питательных средах, легко выделяются из патологического материала и идентифицируются.

Статистические данные по количеству исследованных проб молока от больных маститом коров за последние 3 года исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количество проанализированных проб молока и выделенных патогенных изолятов за последние 3 года

Год	Количество проанализированных проб	Количество выделенных изолятов
2021	102	114
2022	83	125
2023	317	340

Всего за 3 года было проанализировано более 500 проб молока от больных маститом коров. Пробы доставляли из хозяйств всех областей республики, в основном из Минской, Брестской, Гродненской и Могилевской. При условии соблюдения правил отбора проб молока от больных ма-

ститом коров возбудители мастита выделялись более чем в 90 % случаев, причем часто в ассоциациях.

Анализируя данные по видовому составу различных возбудителей при маститах коров, мы получили следующие результаты (рисунок).

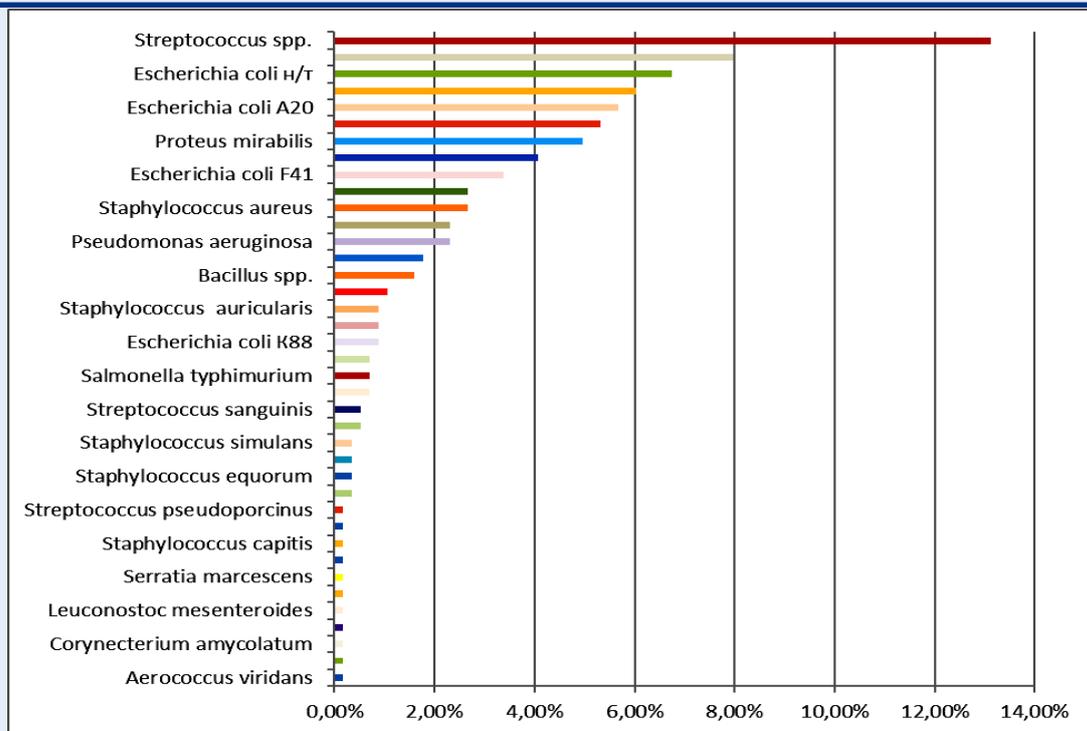


Рисунок – Видовая структура патогенной микрофлоры при маститах коров в хозяйствах Республики Беларусь (период с 2021 по 2023 гг.)

Чаще всего из проб молока от больных маститом коров выделяли патогенные стрептококки (28,9 % случаев), из них в 7,98 % идентифицировали *Streptococcus uberis*, в 6,03 % – *Streptococcus agalactiae*, и другие. Некоторые стрептококки обладали гемолитическими свойствами, и практически все давали положительную реакцию плазмакоагуляции. При этом стрептококк вызывает, как правило, фиброз и атрофию вымени, уплотнение паренхимы (секрет водянистый, хлопьевидный).

На втором месте по выделяемости стоит *Escherichia coli* – 28,55 % случаев. Причем в 16,67 % типировали адгезивные антигены *Escherichia coli*: A20 (5,67 %), 987P (4,08 %), F41 (3,37 %), K99 (2,66 %) и K88 (0,89 %). Эти данные говорят о том, что большое значение при возникновении и развитии мастита имеют санитарно-гигиенические условия содержания, а также гигиена доения коров.

При колимастите у коров возбудитель, быстро размножаясь в пораженной четверти, вызывает воспалительную реакцию с последующим лизисом клеток микроорганизма и выходом эндотоксина. В результате токсемии наблюдаются местные и системные признаки острого или

подострого мастита. Выделения из пораженной доли обычно бурые и водянистые.

На третьем месте при бактериологическом исследовании проб молока от больных маститом коров находились патогенные стафилококки – 14,17 % случаев, причем в 5,32 % идентифицировали *Staphylococcus scuri*, в 2,66 % – *Staphylococcus aureus*, в 2,30 % – *Staphylococcus haemolyticus*. Кроме того, выделяли такие виды, как *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*.

В стадах со стафилококковым маститом у 50 % и более коров выявляют хроническую и субклиническую инфекцию. При этом отмечается сильнейшая интоксикация организма. Хроническая инфекция может длиться месяцами, результаты лечения часто неудовлетворительные, так как формируется пограничный тканевый барьер, препятствующий проникновению антибиотиков в пораженные зоны.

Кроме вышеназванных возбудителей, при исследовании проб молока от больных маститом коров выделяли такие патогены, как *Proteus mirabilis* (4,98 %),

Pseudomonas aeruginosa (2,3 %), *Candida spp.* (1,8 %), а также *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus spp.*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Corynebacterium amycolatum*, *Aerococcus viridans* и др., что снова свидетельствует о ведущей роли в развитии мастита таких предрасполагающих факторов, как несоблюдение условий содержания и санитарно-гигиенических норм доения коров.

После установления видового состава возбудителей второй основной задачей наших лабораторных исследований являлось установление чувствительности выделенных изолятов к антибиотикам.

В связи с возрастающей резистентностью возбудителей маститов, в частности стафилококков и эшерихий, к ряду антибиотиков лабораторные тесты определения чувствительности выделенных культур необходимо проводить в каждом стаде.

При грамположительных инфекциях антибиотикотерапия обычно оказывает хороший эффект. Однако стафилококковые маститы трудно поддаются лечению антибиотиками, так как рубцы препятствуют распределению антибиотика в пораженной части вымени. По этой причине антибиотики, применяемые интрацистернально, не имеют эффективности или их эффект наблюдается только во время лечения. Поэтому при выборе препаратов и лекарственных форм следует учитывать не только чувствительность выделенной микрофлоры, но также ее видовой состав и патогенез той или иной инфекции при маститах.

В таблице 2 приведены данные по определению чувствительности основных групп возбудителей маститов к антимикробным веществам. В процентах указано, какая доля выделенных изолятов устойчива (У) или чувствительна (Ч) к тому или иному антибактериальному веществу.

Таблица 2 – Результаты по определению чувствительности основных групп возбудителей к антимикробным веществам, %

Действующее антимикробное вещество	<i>Streptococcus</i>		<i>Staphylococcus</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	
	У	Ч	У	Ч	У	Ч
1	2	3	4	5	6	7
Азитромицин	47,83	34,78	51,16	32,56	58,00	10,00
Амикацин	22,73	59,09	27,08	58,33	21,15	55,77
Амоксициллин	28,57	42,86	55,00	25,00	64,29	25,00
Ампициллин	34,78	47,83	47,62	38,10	54,00	28,00
Амп.-н/сульбактам	12,50	81,25	29,73	51,35	43,59	28,21
Ванкомицин	39,13	43,48	58,14	20,93	72,92	18,75
Гентамицин	43,48	39,13	39,53	41,86	40,82	32,65
Доксициклин	21,74	56,52	51,16	32,56	59,26	18,52
Имипенем	8,70	86,96	11,63	86,05	28,26	63,04
Канамицин	36,36	36,36	38,10	30,95	44,44	38,89
Карбенициллин	43,75	56,25	51,43	42,86	65,52	31,03
Левифлоксацин	26,32	63,16	31,03	65,52	34,09	47,73
Левомецетин	28,57	64,29	35,00	57,50	47,06	44,12
Меропенем	18,18	81,82	16,28	76,74	14,29	81,63
Офлоксацин	12,50	68,75	20,00	68,57	27,78	66,67
Пиперациллин	25,00	56,25	17,14	45,71	48,65	35,14
Полимиксин 300 ед	28,57	57,14	33,33	58,33	36,36	22,73
Рифампицин 5мкг	17,39	60,87	44,19	41,86	60,00	28,00
Стрептомицин	43,48	43,48	69,05	21,43	70,83	6,25

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
Тетрациклин	66,67	28,57	62,79	23,26	63,27	22,45
Цефазолин	27,27	50,00	31,11	42,22	30,43	36,96
Цефепим	33,33	40,00	7,69	69,23	19,44	52,78
Цефиксим	12,50	75,00	21,43	57,14	30,77	53,85
Цефотаксим	25,00	75,00	16,67	59,52	24,44	53,33
Цефтазидим	40,91	45,45	33,33	42,86	32,65	48,98
Цефтриаксон	9,09	63,64	14,81	70,37	38,46	46,15
Ципрофлоксацин	25,00	56,25	27,78	50,00	27,78	58,33
Цефокситин	9,09	81,82	25,00	33,33	16,67	58,33
Амоксициллин, клавулан. к-та	31,25	62,50	42,86	35,71	58,82	17,65

Из данных таблицы видно, что около половины изолятов группы *Streptococcus* устойчивы к таким веществам, как азитромицин, гентамицин, карбенициллин, стрептомицин, цефтазидим. Стафилококки чаще всего были устойчивы к азитромицину, амоксициллину, ампициллину, ванкомицину, доксициклину, карбенициллину, рифампицину, стрептомицину, тетрациклину. Энтеробактерии, в т.ч. *Escherichia coli*, более чем в 50 % случаев были устойчивы к азитромицину, амоксициллину, ампициллину, ванкомицину, доксициклину, карбенициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте, стрептомицину, тетрациклину, рифампицину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Видовой спектр возбудителей при маститах коров очень разнообразен. Чаще

всего из проб молока от больных маститом коров выделяются патогенные стрептококки (28,9 % случаев), на втором месте по выделяемости стоит *Escherichia coli* – 28,55 % случаев, на третьем месте – патогенные стафилококки – 14,17 % случаев.

Частое выявление условно-патогенных возбудителей, в том числе энтеробактерий, говорит о том, что такие предрасполагающие факторы, как нарушение условий содержания, редкая некачественная уборка, нарушение гигиены доения играют ведущую роль при развитии маститов.

При выборе препаратов и лекарственных форм следует учитывать не только чувствительность выделенной микрофлоры, но также ее видовой состав и патогенез той или иной инфекции при маститах.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абаимова, Е. Б. Патогенная микрофлора в этиологии клинических маститов / Е. Б. Абаимова, И. А. Субботина // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2023. – № 1 (18). – С. 3–7.
2. Семина, Л. К. Коагулазоотрицательные стафилококки как возможные возбудители мастита у коров / Л. К. Семина, Т. Г. Ворошилова, Е. А. Рыжакина // Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел: материалы Междунар. науч-практ. конф., г. Москва, Российская академия сельскохозяйственных наук. – 2011. – С. 297–298.
3. Лемши, А. Возбудители мастита у коров в современных молочно-товарных комплексах и их устойчивость к антибиотикам / А. Лемши, Н. Лемши, М. Хурсин // Ветеринарное дело. – 2016. – № 5 (59). – С. 4–9.
4. Возбудители мастита у коров на крупных молочных комплексах и их резистентность к антибактериальным препаратам / Т. И. Глотова [и др.] // Ветеринария. – 2021. – № 7. – С. 9–13.
5. Корочкин, Р. Стрептококковый мастит и характеристика его возбудителей / Р. Корочкин // Ветеринарное дело. – 2022. – № 11. – С. 11–18.
6. Степанова, Е. А. Возбудители мастита у коров и эффективность антимикробной терапии / Е. А. Степанова, И. И. Кузьминский, А. В. Лиленко // Экология и животный. – 2019. – № 2. – С. 68–72.

УДК 619:578.834.1:636.934.57

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Каяк Ю.А.**, аспирант¹**Толяронок Г.Е.**, кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Семижон П.А.**, кандидат биологических наук²**Счеслёнок Е.П.**, кандидат биологических наук²**Сухоцкая Е.А.**, младший научный сотрудник²¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск, Республика Беларусь²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИЗ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ НА КУЛЬТУРЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Резюме

Проведены исследования по выделению изолята коронавируса SARS-CoV-2. В результате выделен изолят вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: норки, вирус, COVID-19, SARS-CoV-2, инфекция.

Summary

Research has been carried out to isolate an isolate of the coronavirus SARS-CoV-2. As a result, an isolate of the SARS-CoV-2 virus was isolated.

Keywords: minks, virus, COVID-19, SARS-CoV-2, infection.

Поступила в редакцию 02.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусы – семейство вирусов, содержащих в качестве генетического материала одноцепочечную (+) РНК со специфическими гликопротеидными шипами вокруг вирусного капсида, которые при электронном микроскопировании похожи на корону [1]. Семейство коронавирусов делится на несколько подсемейств, включающих четыре рода (от альфа- до дельта-), которые потенциально патогенны для различных видов млекопитающих, включая человека [2]. За последнее двадцатилетие, кроме ранее известных видов из семейства коронавирусов, патогенных для человека, входящих в структуру сезонных вирусных инфекций, были описаны новые патогенные виды: SARS-CoV, описанный в 2002 г., который в 2002–2003 гг. явился причиной вспышки атипичной пневмонии в Китае; MERS-CoV, который в 2012 г. вызвал вспышку ближневосточного респираторного синдрома в Саудовской Аравии и в 2015 г. – в Южной Корее (MERS) и новый коронавирус SARS-CoV-2, который вызвал вспышку болезни, названной COVID-19, в

китайской провинции Ухань, переросшей в глобальную пандемию [3]. Достаточно высокая степень передачи нового коронавируса (средний индекс репродукции 2.2) и потенциальная тяжесть последствий респираторного заболевания, вызываемого данным вирусом, превратили его в главнейшую медицинскую проблему 2020 г. [1, 4].

С первых случаев заражения человека SARS-CoV-2 до сегодняшнего времени в мире зафиксировано более 704 753 890 случаев, 7 010 681 человек погибло. Существуют сведения, как влияет вирус SARS-CoV-2 на домашних, сельскохозяйственных и диких животных. Анализ литературных источников показал, что домашние кошки и собаки инфицируются SARS-CoV-2, но остаются бессимптомными вирусносителями или же у них развиваются легкие клинические признаки заболевания. Норки и хорьки также восприимчивы к заболеванию, и у норки может развиваться смертельное заболевание, а вирус может передаваться от норки к человеку и наоборот [5].

Целью исследования является выделение изолятов вируса SARS-CoV-2 на перевиваемой культуре клеток из образцов биологического материала от норок, подтверждение методом ПЦР наличия антигена вируса SARS-CoV-2 от павших норок, адаптация к перевиваемым культурам клеток млекопитающих, закладка изолятов на хранение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являются изоляты вируса SARS-CoV-2, полученные из биологического материала норок (селезенка, легкое): проба № 1 – вх. 3947 и проба № 5 – вх. 3948, отобранного от павших животных в УП «Молодеченское зверохозяйство Белкоопсоюза», подтвержденные в ПЦР на наличие антигена вируса SARS-CoV-2.

Культура клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6 (ТУ ВУ 100558032.273-2014, изм. 1) была получена из коллекции культур клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» (г. Москва) и хранилась в криохранилище с жидким азотом.

Для выделения изолятов вируса SARS-CoV-2 использовали образцы биологического материала от животных, положительные на наличие РНК SARS-CoV-2. Образцы патологического материала (10–20%-ная суспензия легких и селезенки на фосфатно-буферном растворе pH 7.4) в объеме 1,0 мл предварительно пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, на адсорбцию брали 700,0 мкл суспензии из расчета площади культурального флакона 25,0 см². Адсорбцию проводили в течение 1 часа при температуре +37 °С. Далее вносили среду поддержки (DMEM +2%-ная сыворотка эмбрионов коров (СЭК). Флаконы инкубировали от 3 до 5 суток до появления цитопатического действия (ЦПД), после этого проводили два цикла замораживания-оттаивания, клеточную суспензию центрифугировали при 6 тыс. об/мин. при температуре +4 °С в течение 15 мин. Вирусосодержащую культуральную жидкость анализировали методом ОТ-ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2 и использовали в кратных разведениях для последующих пассажей.

Выделение вирусной РНК для исследования методом ОТ-ПЦР проводили с использованием коммерческого набора реагентов для одновременного выделения ДНК и РНК из биологического материала методом преципитации «НК ЭКСТРА» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Постановку обратной транскрипции на матрице РНК проводили с использованием набора реагентов для постановки реакции обратной транскрипции РНК «РЕВЕРТАЗА – М-MuLV-50» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Постановку ПЦР проводили с использованием набора реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «SARS-CoV-2/SARS-CoV» (ДНК-технология, Российская Федерация), тест-системы «АртТест COVID-19» (АртБиоТех, Беларусь), набора реагентов «COVID-19-скрин» для выявления генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

Определение инфекционной активности вируса проводили по TCID₅₀, расчет титров вируса осуществляли по методу, предложенному Spearman-Kerber [5].

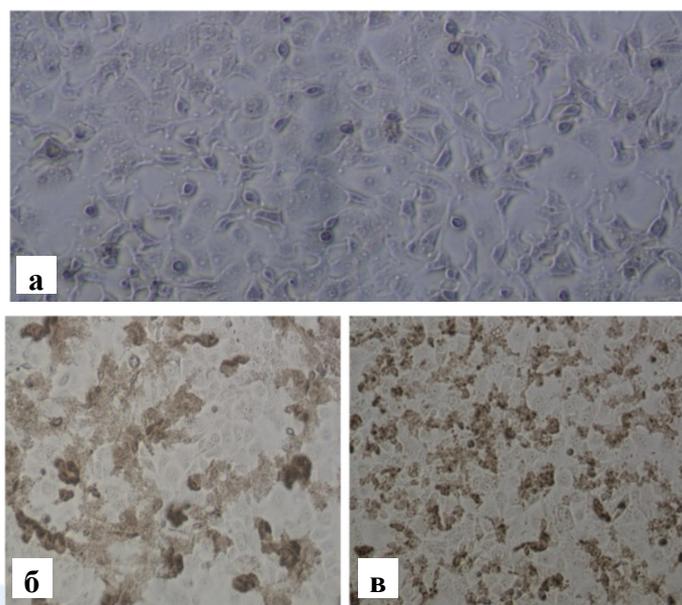
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По имеющимся литературным данным, для культивирования вируса SARS-CoV была эффективно использована клеточная линия Vero E6. Эта же клеточная линия эффективно использована и для выделения SARS-CoV-2. В связи с этим для выделения изолятов вируса SARS-CoV-2 нами была использована культура клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6. Для выделения вируса использовали культуральные флаконы площадью 25,0 см², содержащие суточную культуру клеток с 80–90%-ным монослоем клеток. После проведения адсорбции в течение часа вносили среду поддержки DMEM, содержащую гентамицин и 2%-ную СЭК. На 3-4-е сутки наблюдали эффект так называемого цитопатического действия, визуализируемого в виде потери клетками способности закрепляться к пластику

флакона, принятием ими шаровидной формы, отделением от пластика флакона и свободным плаванием в культуральной жидкости по сравнению с контролем. На рисунке 1 представлены результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом.

Из представленного рисунка видно, что для клеток, инокулированных образцами № 1/3947 (б) – патологический материал от павших норок (селезенка), третьи сутки инкубации, и № 5/3948 (в) – биологический материал от норок (легкое), четвертые сутки инкубации, наблюдается выраженный цитопатический эффект по сравнению с

контролем (а). По достижению ЦПД 70–80 % флаконы с клетками двукратно замораживали-оттаивали для увеличения выхода вирусных частиц в среду, затем клеточный дебрис удаляли центрифугированием, вирусодержащую культуральную жидкость использовали для последующих пассажей. Всего таким образом было выделено 2 изолята, и для каждого из них проведено по 10 последовательных пассажей, наличие РНК вируса SARS-CoV-2 для каждого пассажа подтверждалось приготовлением кратных разведений от 10^{-2} до 10^{-7} с последующим выделением РНК и постановкой ОТ-ПЦР.



а – контроль Vero E6; б – Vero E6 / образец 3947, в – Vero E6 / образец 3948

Рисунок 1 – Результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом

Определение инфекционной активности вируса по ЦПД проводили микрометодом на 96-луночных культуральных планшетах (Costar) с клетками Vero E6 (посевная доза 15000–18000 на лунку) для определения титра вируса нескольких образцов с использованием не менее четырех параллельных рядов.

Для титрования вируса на 96-луночных культуральных планшетах готовили 10-кратные его разведения (от 10^{-1} до 10^{-7}) на поддерживающей среде ДМЕМ, содержащей 2%-ную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) + 0,24 мг/мл гентамицина. Каждым разведением вируса заражали по четыре лунки. Из каждой лунки с культурой удаляли ростовую среду и

вносили по 0,2 мл соответствующего разведения вируса. В качестве контроля использовали четыре лунки со сформировавшимся клеточным монослоем. Подготовленный планшет помещали в CO_2 -инкубатор при температуре 37 °C и 5 % CO_2 . Результаты титрования учитывали в течение 4–7 суток инкубирования по проявлению цитопатического действия. Инфекционный титр вируса выражали в $TCID_{50}$ (50%-ная тканевая цитопатическая доза) и рассчитывали по методу Кербера.

На рисунке 2 представлены результаты изменения титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей.



Рисунок 2 – Изменение титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей

Как видно из рисунка 2, наибольшие титры вируса достигались к пятому-шестому пассажу и составляли 6,5–6,7 для изолята № 1/3947 и 5,7–5,8 – для изолята № 5/3948. Соответственно, для последующего накопления биомассы вируса с целью дальнейшего накопления вирусного антигена был использован изолят № 1/3947 (шестой пассаж) с максимальным титром вируса.

Изолят коронавируса SARS-CoV-2 № 1/3947 был выбран в качестве кандидата штамма для получения инактивированного вирусного антигена. Для данного изолята были выполнены работы по накоплению вируса (вирусодержащая культуральная жидкость) в культуре клеток Vero E6, проведена его инактивация, осуществлена проверка полноты инактивации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования по выделению изолятов вируса SARS-CoV-2 на пере-

виваемой культуре клеток Vero E6 из образцов биологического материала от животных, подтвержденные методом ПЦР на наличие антигена вируса SARS-CoV-2 от павших норок, выделены 2 пробы (проба № 1/3947 и № 5/3948).

Выделенные изоляты успешно адаптированы к перевиваемым культурам клеток млекопитающих. Определены оптимальные параметры культивирования вируса. Для каждого изолята выполнено по 10 последовательных пассажей и определена динамика изменения титров вируса в зависимости от пассажа. Титры вируса к пятому-шестому пассажу были достаточно высокими, а изоляты – пригодными для изготовления биопрепаратов. Лучшим для накопления вирусного антигена был изолят № 1/3947.

Осуществлена закладка изолятов № 1/3947 и № 5/3948 на криохрани-

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab / D. Paoli [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation [Internet]. Springer Science and Business Media LLC.* 2020 Apr 23. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01261-1>.
2. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks / H. M. Ashour [et al.] // *Pathogens [Internet]. MDPI AG; 2020;4: 9 (3):186.* <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>.
3. Center for Systems Science and Engineering (2020) Coronavirus COVID-19 global cases. Johns Hopkins University. Accessed 3 Apr 2020. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
4. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19) / M. Cascella [et al.] – StatPearls Publishing. Accessed 3 Apr 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.
5. Баден, Л. Р. COVID-19 – поиск эффективной терапии / Л. Р. Баден, Е. Ю. Рубин // *J. Medical technology.* – 2020.
6. Чепурнов, А. А. Антигенные свойства изолята коронавируса Sars-CoV-2, выделенного от пациента в Новосибирске / К. А. Шаршов, Е. И. Казачинская // *Журнал инфектологии.* – 2020. – Т. 12. – № 3. doi: 10.22625/2072-6732-2020-12-3-42-50.

УДК 619:579.843.95:636.934.57

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Каяк Ю.А., аспирант
Толяронок Г.Е., кандидат ветеринарных наук, доцент
Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ ПАСТЕРЕЛЛ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НОРОК, ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СЕЛЕКЦИЯ

Резюме

В статье приведены результаты анализа заболеваемости пастереллезом, выделения пастерелл из образцов биологического материала, селекции штаммов.

Ключевые слова: пастереллез, норки, бактерии, *Pasteurella multocida*, серовар, свойства, патогенность, стабильность, штаммы.

Summary

The article shows the results of the analysis of the incidence of pasteurellosis, the isolation of pasteurellas from samples of biological material, and the selection of strains.

Keywords: pasteurellosis, minks, bacteria, *Pasteurella multocida*, serovar, properties, pathogenicity, stability, strains.

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Пастереллез – контагиозная инфекционная болезнь многих видов домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом и отеками в различных областях тела, а при подостром и хроническом течении – гнойно-некротизирующей пневмонией, артритом, иногда маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом. Основной возбудитель пастереллеза – *Pasteurella multocida*.

К пастереллезу восприимчивы все виды животных и птиц в любом возрасте, однако молодняк более чувствителен. Эпизоотические вспышки с острым течением болезни регистрируется как у молодняка, так и у взрослых животных.

Источником инфекции являются больные животные и клинически здоровые бактерионосители. Бактерионосительство обуславливает стационарность инфекции.

У пушных зверей (чаще норок, песцов, лисиц) к пастереллезу более восприимчив молодняк 2–5-месячного возраста. Болезнь обычно протекает в виде энзоотий

со значительной смертностью. На зверофермы возбудитель заносится с зараженными мясом и субпродуктами. Возможно заражение аэрогенно и через воду, инфицированную пометом синантропных птиц.

У пушных зверей инфекция, обусловленная *P. multocida*, при первичном заносе протекает с коротким инкубационным периодом и высокой смертностью. Проявляется признаками септицемии, рвотой, поносом, судорогами, пенными выделениями из носа и ротовой полости.

При повторных вспышках пастереллеза показатели заболеваемости и смертности снижаются.

При ассоциативном течении пастереллеза с другими вирусными и бактериальными патогенами смертность может возрастать в 1,5–2 раза.

При селекции изолятов пастерелл чаще используют биологический метод отбора штаммов в качестве вакцинных.

Целью наших исследований было выделение от норок патогенных культур пастерелл, пригодных для конструирования биопрепаратов (вакцин).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в условиях отдела вирусных инфекций, опытно-технологического участка и вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, звероводческих хозяйствах Республики Беларусь, неблагополучных по пастереллезу норок.

Изучение эпизоотической ситуации по пастереллезу в хозяйствах проводили согласно методическим указаниям по эпизоотологическому исследованию (И.А. Бакулов с соавт., 1982 г.) на основании изучения клинических признаков, результатов вскрытия павших и вынужденно убитых норок с признаками этого заболевания [1]. Были обследованы звероводческие хозяйства. С этой целью нами было подобрано 5 звероводческих хозяйств, принадлежащих ПУП «Белкоопмех»: филиал «Гродненское зверохозяйство», Молодечненское зверохозяйство, Калинковичское зверохозяйство, Барановичское зверохозяйство, Пинское зверохозяйство.

Было отобрано 168 проб патологического материала для исследований из Молодечненского, Пинского и Барановичского зверохозяйств.

Бакиследования патологического материала от павших и вынужденно убитых животных с признаками этой инфекции проводили согласно Методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллеза животных и птиц. Патологический материал для бакисследований отбирали от павших (не позднее 3–5 часов после гибели) или вынужденно убитых животных, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами [2].

Объектами исследования был патологический материал от павших норок: селезенка, легкое, кровь сердца, трахея, регионарные лимфатические узлы. Для выявления пастерелл в организме живых животных проводили отбор проб смывов со слизистых оболочек носовой полости, полости рта и глотки.

Пробы кусочков легких предварительно проверялись в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения (присутствия) генома бактерии *Pasteurella multocida* и *Salmonella spp.* с целью установить выделяемость пастерелл и сальмонелл.

При положительных тестах в ПЦР на *P. multocida* материал подвергался бактериологическим исследованиям (34 образца патматериала).

Изучение культурально-морфологических свойств выделенных бактерий от норок проводилось на сывороточных жидких и твердых питательных средах.

Биохимические свойства чистых культур бактерий установили при идентификации пастерелл с помощью биохимического анализатора Vitek 2 COMPACT.

Серовариантную принадлежность изолятов *Pasteurella multocida* определяли с помощью ПЦР-анализа [3].

Патогенные свойства выделенных штаммов *Pasteurella multocida* определяли путем подкожного заражения белых мышей 18–20-часовой бульонной культурой в дозе 0,3 см³. За сохранностью мышей наблюдали в течение 5 суток [2, 3]. Гемолитические свойства пастерелл изучали путем посева на кровяной агар.

Отбор пастерелл для последующей селекции осуществляли только из патогенных культур. Основными критериями селекции были идентичность (соответствие свойствам пастерелл, в т.ч. серовариантная принадлежность), чистота, степень патогенности, отсутствие признаков диссоциации агаровых и бульонных культур.

Окончательное заключение о пригодности штаммов пастерелл для конструирования вакцины проводилось по отсутствию признаков диссоциации, по стабильности биологических свойств после пересевов на питательных средах (4–5 пассажей) и повторного инфицирования животных.

Патогенные штаммы *P. multocida* планировали использовать в качестве антигенного компонента для конструирования инактивированной вакцины, а также для проверки антигенной активности полученных образцов.

Для адаптации к жидкой питательной среде и отработки параметров культивирования штаммов *Pasteurella multocida* на ней использовали бульонную сердечно-мозговую среду производства Himedia, которая включала в себя 5–10 % стерильной сыворотки, 0,5 % дрожжевого экстракта. При отработке параметров культивирования применялся штамм серовара А *P. multocida*.

Для получения посевного материала бактерий расщепки 1-й генерации штамм *P. multocida* высевали на питательную среду во флакон объемом 400,0 см³. Штаммы бактерий термостатировали при температуре (+37,5±0,5) °С в течение 18 ч. По окончании культивирования проверяли чистоту расщепки.

При получении посевного материала пастерелл 2-й генерации культуру высевали в бутылки объемом 3 л с сердечно-мозговым бульоном и 5–10 % стерильной сыворотки крови и 0,5 % дрожжевого экстракта. Перед их постановкой в термостат содержимое бутылей перемешивали и выращивали при температуре (+37±0,5) °С в течение 16–18 ч. По окончании термостатирования проверяли чистоту культуры.

В реактор со стерильной подогретой жидкой сердечно-мозговой средой производства «Himedia» с добавлением 5%-ной стерильной сывороткой крови вносили посевной материал 2-й генерации (10 % по объему).

Подключали систему подачи источников питания и поддержания рН (6,8–7,4) среды, состоящую из двух емкостей с 40%-ным стерильным раствором глюкозы и 20%-ным раствором калия гидроксида.

Для обеспечения максимальной выхода биомассы пастерелл в реакторе Bioflo 5000 культуры выращивали в течение 10–12 ч при температуре (+37±1) °С при непрерывном перемешивании, начиная со 2 часа, и аэрации (подача стерильного воздуха). В процессе культивирования отбирали пробы бульонной суспензии через каждый 1 час для определения концентрации микробных клеток по оптической плотности.

Поддержание аэрации проводилось путем изменения подачи стерильного воздуха и скорости вращения мешалки в режиме удержания парциального содержания кислорода в среде в пределах 10–30 %. Для предотвращения избыточной аэрации и образования пены в значительном количестве на поверхности среды в первый час роста подачу воздуха не делали, работала только мешалка, иначе возможно было торможение роста бактерий. По показателю еН корректировки не проводилось.

По окончании процесса в выросших культурах определили концентрацию биомассы по оптической плотности с помо-

щью денситометра по МакФарланду (в перерасчете – млрд микробных клеток на 1 мл суспензии).

Проверяли чистоту выросшей культуры после окраски по Флуку (Граму) по однотипности морфологии бактерий в поле зрения микроскопа, а также на отсутствие конгломерации (комкования, слипания бактерий в поле зрения микроскопа).

Затем при постоянном перемешивании для инактивации бактериальной взвеси пастерелл добавляли формалин в конечной концентрации в среде 0,3 %.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

У норок в обследуемых звероводческих хозяйствах болезнь, обусловленная *P. multocida*, проявлялась признаками септицемии, рвоты, поноса, судорог, пенных выделений из носа и ротовой полости и протекала со значительной смертностью.

Клинические признаки отмечались в виде резкого угнетения животных, шаткости походки, лихорадки, отсутствия аппетита, иногда со рвотой и поносом с примесью крови, судорог, с пенным выделением из носа и ротовой полости. Обычно звери погибали во время припадка.

Болезнь у молодых животных длилась от 12 ч до 2–3 суток. Летальность достигала 6 %, а в случае жары – 10,8 %.

Выраженной сезонности легочных заболеваний у норок не отмечалось. Однако молодняк норок 3–4-недельного возраста был наиболее уязвимым к простудным заболеваниям весной, когда еще не сформировался теплый подшерсток, особенно если в пометах кормящие мамы были неспокойные (не согревали малышей, убежали от них).

Взрослые животные болели реже молодняка. Чаще отмечалось хроническое течение болезни.

Болезнь усугублялась летом, во время жары, и отход зверей был более массовым, при этом чаще в это время, как правило, погибали самые крупные зверьки.

При патологоанатомическом вскрытии во внутренних органах павших норок отмечали точечные кровоизлияния, отек и воспаление легких, увеличение и дряблость печени, набухание селезенки, иногда студенистую отечность подкожной клетчатки в области головы.

При бактериологическом исследовании в первичных посевах из числа выросших на агаре колоний отбирали отдельные, с морфологией, характерной для пастерелл, – круглые, блестящие, серо-белого цвета, без кишечного запаха.

Процент выделения пастерелл от пушных зверей в возрасте от 4 до 7 месяцев в пяти обследованных хозяйствах составлял от 14 до 26 % с учетом данных в ПЦР.

При бактериологическом исследовании патологического материала от 35 павших норок установлено, что из выделенных культур микроорганизмов к *P. multocida* было отнесено 37 % (13 изолятов). В 15 случаях в ПЦР установлен геном *Salmonella spp.* (43 %).

При этом в ряде случаев (в Барановичском, Пинском, Молодеченском, Бобруйском зверохозяйстве) одновременно изолировался возбудитель аэромоноза рыб как фактор бактерионосительства (не менее 50 % случаев). Выделение аэромоносов прекращалось после отмены в рационе зверей рыбных полуфабрикатов.

Выделенные чистые культуры бактерий по биохимическим свойствам идентифицированы с помощью анализатора Vittek 2 как *Pasteurella multocida*.

При обнаружении возбудителей других видов (типажей) их идентификацию не проводили из-за носительства, обусловленного особенностями кормовых рационов зверей.

Серовариантная принадлежность изолятов *Pasteurella multocida* подтверждалась с помощью ПЦР-анализа. Выделенные изоляты *Pasteurella multocida* идентифицированы в 9 случаях как серовариант А, в 3 случаях – как серовариант В. Одна культура *P. multocida* отнесена к сероварианту Д.

При подтверждении принадлежности в ПЦР обнаруживался геном *Pasteurella multocida*.

Изоляты *P. multocida* сероваров А, В и Д были патогенны (77 %) для лабораторных животных. Белые мыши погибали в течение 5 дней (срок наблюдения).

На агаровых питательных средах наблюдался рост только S-типов и M-типов колоний. R-форм колоний при этом не обнаруживалось, т.е. отсутствовали признаки диссоциации культур. У изолятов *Pasteurella multocida* сероваров В чаще регистрировались S-типы колоний.

После биопробы из внутренних органов норок (кровь сердца, легкие, печень) реизолировались исходные культуры.

У изолятов *Pasteurella multocida* сероваров А, В, Д гемолитическая активность отсутствовала (не было зон просветления на кровяном агаре).

Полученные культуры *Pasteurella multocida* после 4-5 пассажей и хранения в лабораторных условиях были стабильны и сохраняли свои первоначальные биологические свойства.

При изготовлении из них антигенов для реакции агглютинации в суспензиях агаровых культур отсутствовали признаки самоагглютинации.

Пастереллы успешно адаптировались к жидкой бульонной сердечно-мозговой среде с добавлением стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота и дрожжевого экстракта.

Выросшие при культивировании в жидкой питательной среде в реакторе в течение 10–12 ч бактерии давали выход биомассы с концентрацией от 3,0 до 4,0 млрд микробных клеток на 1,0 см³ суспензии.

После окраски по Граму была проверена чистота выросшей культуры. По отсутствию комкования реакторной культуры исключена конгломерация биомассы, нежелательная при реакторном культивировании, изготовлении вакцин из них и дальнейшем хранении биопрепаратов.

Морфологические и биологические свойства реакторных культур не изменились в процессе пересевов и не отличались от исходных культур выделенных пастерелл.

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных исследований установлено, что в обследованных хозяйствах возбудитель пастереллеза выявлен в 14–26 % случаев. Заболеваемость пастереллезом регистрировалась в пределах 5–11 % поголовья.

2. Патогенные изоляты *P. multocida* сероваров А и В являлись определяющими в эпизоотическом плане, так как они встречаются более часто. Подобранные и селекционированные штаммы *Pasteurella multocida* обладали стабильными биологическими и антигенными свойствами.

3. Основными критериями при селекции были идентичность (соответствие

свойствам пастерелл, в т.ч. серовариантная принадлежность), его чистота, степень патогенности, отсутствие признаков диссоциации, самоагглютинации и агрегации агаровых и бульонных культур.

4. Выход биомассы пастерелл в реакторной культуре являлся достаточным при изготовлении (конструировании) вакцины с участием пастереллезного компонента.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Методические указания по эпизоотологическому исследованию / М-во сел. хоз-ва СССР, ВНИИ вет. вирусологии и микробиологии, Всесоюз. ин-т эксперим. ветеринарии [сост. : И. А. Бакулов и др.]. – М. : Колос, 1982. – 17 с.
2. Методические указания по лабораторной диагностике пастереллеза животных и птиц / Г. Е. Толяронок [и др.]. – Минск, 2009. – 19 с.
3. Методические указания по диагностике и системе мер борьбы с пастереллезом свиней / А. Ю. Финогенов. – Минск, 2011. – 17 с.

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

ПОЛИКОКС

ДЛЯ КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА И ОВЕЦ

противококцидиозное
средство

содержит
диклазурил, фумаровую кислоту

не вызывает
осложнений
и побочных
явлений

применяют в целях лечения и
профилактики протозойных
болезней, вызванных эймериями
и криптоспоридиями



WWW.BIEVM.BY

УДК 619:615.33:636

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
Кучвальский М.В., научный сотрудник²

¹УП «Научно-исследовательский институт “БиоФарм”», г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск, Республика Беларусь

СКОРОСТЬ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ К ПРЕПАРАТАМ АНТИБИОТИКОВ, ПРИМЕНЯЕМЫМ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Резюме

Пассажи потенциально патогенных микроорганизмов в диффузионном тесте с разведениями антибиотиков позволяет определить количество контактов препарата с микроорганизмами, приводящее к возникновению резистентных штаммов, что дает возможность скорректировать схему их применения для снижения риска развития резистентности микрофлоры и обеспечения эффективности лечения.

Антимикробные препараты с одинаковыми активно действующими веществами, но разных производителей могут отличаться по спектру действия и скорости развития резистентности к ним микрофлоры, что вызывает необходимость определения этих показателей при регистрационных испытаниях и корректировки инструкции по применению.

Ключевые слова: микробная антибиотикорезистентность, диффузионный тест, состав антимикробных препаратов.

Summary

The passage of potentially pathogenic microorganisms in a diffusion test with dilutions of antibiotics makes it possible to determine the number of contacts of the drug with microorganisms, leading to the emergence of resistant strains, which makes it possible to adjust the scheme of their use to reduce the risk of developing microflora resistance and ensure the effectiveness of treatment. Antimicrobials with the same active substances, but from different manufacturers, may differ in the spectrum of action and the rate of development of microflora resistance to them, which makes it necessary to determine these indicators during registration tests and adjust the instructions for use.

Keywords: microbial antibiotic resistance, diffusion test, composition of antimicrobial drugs.

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Основная масса продуктов питания животного происхождения производится в животноводческих комплексах с высокой концентрацией поголовья животных и птиц. В течение производственного цикла в животноводческих помещениях лавинообразно возрастает численность микрофлоры и усиливается ее патогенность из-за пассажа в условиях тесного контакта животных [1]. Организм животных и иммунная система оказываются под нарастающим давлением микробного стресса, что снижает продуктивность и приводит к развитию заболеваний. В связи с этим применение антибактериальных средств и антибиотиков в промышленном животноводстве стало рутинной практикой [2]. Мировой объем производства антибиотиков для животноводства превышает 160 000 т, что

почти в 4 раза больше, чем производится для нужд медицины [2].

Золотой век антибиотиков продолжался до начала 60-х годов XX века, когда заметили появление резистентных штаммов микроорганизмов и снижение эффективности ряда препаратов. В настоящее время «срок жизни подавляющего большинства новых антибиотиков колеблется в пределах 1–3 лет» [2].

Распространено мнение, что применение антибиотиков для сельскохозяйственных животных создает проблему антибиотикорезистентности при лечении инфекций у людей [3, 4], но, видимо, это не так однозначно. Для человека ВОЗ выделяет критически опасные виды бактерий:

- карбопенемрезистентные: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*;

- с высоким приоритетом: *Enterococcus faecium* (ванкомицинрезистентный), *Staphylococcus aureus* (метициллин-, ванкомицинрезистентный), *Helicobacter pylori* (кларитромицинрезистентный) *Campylobacter spp.* и *Salmonellae spp.* (резистентные к фторхинолонам), *Neisseria gonorrhoeae* (цефалоспоринонрезистентные).

В Республике Беларусь зарегистрирован высокий уровень резистентности у *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* к цефтазидиму, ципрофлоксацину, амикацину, имипенему, меропенему, ампициллину, ципрофлоксацину, гентамицину и хлорамфениколу [5]. Однако основная часть указанных проблемных антибиотиков не используется в ветеринарии, а перечисленные виды бактерий в основном актуальны только для людей. Тем не менее ВОЗ считает необходимым регулировать применение антимикробных препаратов и обеспечить их надлежащее использование в животноводстве.

Одной из мер рационального использования антимикробных препаратов в Республике Беларусь стало включение в законодательство [6] требования изучения антибактериальных ветеринарных препаратов в отношении «возможности возникновения устойчивых штаммов микроорганизмов, ... скорости возникновения устойчивых штаммов микроорганизмов». Получение таких данных и соответствующая коррекция инструкций по применению исследованных антимикробных препаратов должны повысить эффективность лечения, снизить риск появления резистентных микроорганизмов и их миграции для человека. С этой целью было начато исследование антимикробных препаратов, которые предполагалось применять в животноводстве республики, изучение скорости развития резистентности к ним у распространенных потенциально патогенных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали действие 150 антимикробных препаратов разных производителей на *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Pasteurella multocida*, *Bacillus megaterium* из

коллекций микроорганизмов «КМИЭВ» и ОКК ОАО «БелВитунифарм». Указанные культуры ранее не использовались в опытах, в которых могли бы контактировать с антибиотиками. Для исследования лиофилизированные микроорганизмы растворяли в стерильном изотоническом растворе и высевали на питательную среду, после получения роста они периодически пересеивались. Пересевы хранились при температуре +2...+8 °С, перед опытом проводился пересев и инкубация посевов в течение 1-2 суток при температуре 37 °С.

В исследованиях использовали принцип диффузионного теста по Kirby–Bauer, но с применением стандартных лунок и объема растворов антибиотиков. Для обеспечения ровного слоя среды в чашки Петри диаметром 90,0 мм, установленные на строго горизонтальной поверхности, вносили 20,0 мл, а в чашки диаметром 100,0 мм – 25,0 мл расплавленного сердечно-мозгового агара (Brain Heart Infusion Agar). Чашки с готовой средой засеивали суспензиями культур, вырезали по 2 лунки, вмещающие по 85,0 мкл разведений исследуемого антимикробного препарата. Для первого разведения подбирали такую концентрацию препарата, чтобы зона задержки роста, в частности *Staphylococcus aureus*, была в пределах 35–45 мм. Для второго разведения концентрацию уменьшали в 5 раз.

При изучении разных препаратов с одинаковыми активно действующими веществами (АДВ) использовали разведения с примерно одинаковыми их концентрациями. Разведения препаратов готовили на воде для инъекций или на диметилсульфоксиде при необходимости растворения препаратов на масляной основе и стерилизовали фильтрацией через фильтр Millex® 0.22 мкм.

Через 20–22 ч инкубирования посевов при температуре 37 °С проводили учет роста культур и определение размеров зон его задержки. Последующий пассаж проводили на следующий день после учета зон задержки роста. Для последующего пассажа брали бактериальную массу с границы двух зон задержки роста.

Уменьшение зон задержки роста в каждом пассаже свидетельствовало о росте резистентности микроорганизмов к препарату. Считали, что выраженная резистент-

ность отмечается, если в очередном пассаже в первом разведении препарата формируется зона диаметром 14,0 мм и меньше. При этом, как правило, второе разведение препарата вообще не задерживало роста, или зона задержки не превышала 10,0–11,0 мм.

Результаты теста оценивали по шкале:

«+» – резистентность не развилась при проведении пассажей по числу, равному количеству введений препарата, рекомендованному в инструкции по его применению;

«±» – не обеспечивается заявленный спектр активности или быстро появляется резистентность у какого-либо рода микроорганизмов;

«-» – резистентность развивается к 2 и более родам микроорганизмов за меньшее количество пассажей, чем количество введений, предусмотренное в инструкции препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что препараты с одинаковыми АДВ, но разных производителей могли отличаться по активности и скорости развития резистентности микрофлоры. Так, считается, что доксициклин активен в отношении аэробных грамотрицательных бактерий, в частности *Escherichia coli*. В таблице 1 и на рисунке 1 представлены результаты сравнения действия на *E. coli* препаратов с одинаковым содержанием доксициклина, но разных производителей. Как видно, препарат «Д-д» оказывал выраженное действие на этот вид бактерий до VII пассажа. Активность препарата «Д-о»

была как минимум в 2 раза ниже, чем у препарата «Д-д», причем полная резистентность к нему появилась у *E. coli* уже в III пассаже после 2 контактов. Препарат «Д-п» вообще не действовал на *E. coli*.

В основном большинство изученных препаратов с доксициклином при первом применении эффективно действовали на стафилококки, стрептококки, кишечную палочку, бордетеллы, сальмонеллы, но их чувствительность уже после первого контакта с препаратами, как правило, снижалась, хотя они еще оказывали достаточно эффективное действие. Чувствительность сальмонелл после первого контакта с препаратами почти не уменьшилась (таблица 2).

Вместе с тем важно то, что в III пассаже после двух контактов у стафилококков, кишечной палочки, бордетелл, сальмонелл развивалась выраженная резистентность к препаратам доксициклина, проявлявшаяся отсутствием зон задержки роста или их значительным уменьшением (таблица 2).

При исследовании 20 препаратов группы пенициллина и полусинтетических препаратов широкого спектра группы пенициллинов (таблица 3) установлено, что ко всем препаратам феноксиметилпенициллина резистентность могла развиваться при проведении курсов лечения, рекомендованных инструкциями по их применению (таблица 3). Комбинация бензилпенициллина со стрептомицином не решала проблему развития резистентности микроорганизмов. При исследовании 3 таких препаратов во всех случаях резистентность развивалась к обоим компонентам.

Таблица 1 – Результаты пассажа в диффузионном тесте *E. coli* с разведениями препаратов доксициклина (34 и 6,8 мкг/85 мкл) разных производителей (диаметры зон задержки роста в мм)

Пассаж	«Д-д»		«Д-о»		«Д-п»	
	34 мкг/ 85 мкл	6,8мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл
I	28	22	14	9	0	0
II	21	18	12	8	-	-
III	21	17	0	0	-	-
IV	21	17	-	-	-	-
V	23	20	-	-	-	-
VI	25	13	-	-	-	-
VII	0	0	-	-	-	-

Примечание – красным цветом обозначены размеры зон задержки роста, указывающие на резистентность микроорганизма к данному разведению препарата

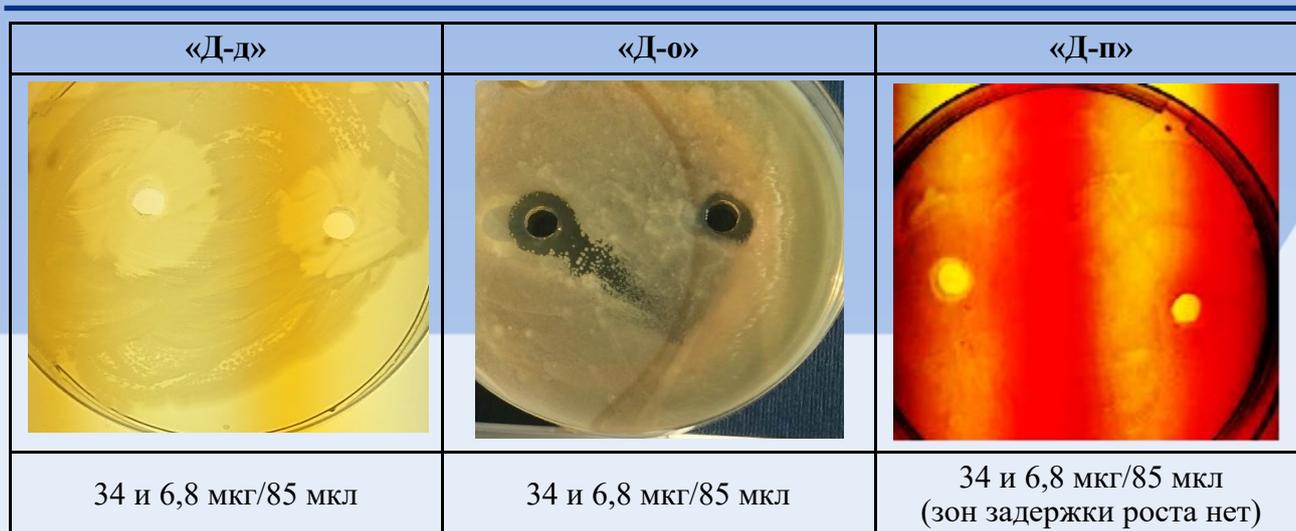


Рисунок 1 – Сравнение результатов I пассажа *E. coli* с разведениями препаратов доксициклина разных производителей (уменьшение зон задержки роста разных препаратов с одинаковой концентрацией АДВ)

Из 9 исследованных препаратов амоксициллина только к 2 (22,2 %) резистентность не развивалась при числе пассажей, равном рекомендуемому количеству введений препарата (таблица 3). В из-

вестной степени проблему решало добавление к амоксициллину клавулановой кислоты. Из 4 таких препаратов только в 1 случае (25 %) отмечено быстрое появление резистентных микроорганизмов (таблица 3).

Таблица 2 – Диаметры зон задержки роста культур микроорганизмов в диффузионном тесте с разведениями препаратов на основе доксициклина (в мм)

Вид бактерий	Пассажи/разведения препаратов					
	I		II		III	
	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл
<i>Staphylococcus aureus</i>	43	35	26	24	17	0
<i>Streptococcus epidermidis</i>	29	24	22	18	15	10
<i>Escherichia coli</i>	34	23	18	11	0	0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	29	23	21	16	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	21	18	21	15	15	11

Примечание – красным цветом обозначены размеры зон задержки роста, указывающие на резистентность микроорганизма к данному разведению препарата

Таблица 3 – Результаты исследования препаратов различных классов антибиотиков

Действующие вещества или их комбинации	Количество наименований препаратов	+	±	-
1	2	3	4	5
Пенициллины				
Феноксиметилпенициллин	2	-	-	2
Амоксициллин	9	2	5	2
Амоксициллин, клавулановая кислота	4	3	-	1
Бензилпенициллин+стрептомицин	3	-	-	3
Амоксициллин+колистин	2	1	-	1

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
Макролиды				
Азитромицин	5	2	3	-
Азитромицин+левофлоксацин	2	2	-	-
Тилдипирозин	1	1	-	-
Тилмикозин	4	1	2	1
Тулатромицин	5	4	1	-
Тилозин	6	1	3	2
Тилмикозин+энрофлоксацин+триметоприм	1	1	-	-
Гамитромицин	1	1	-	-
Тетрациклины				
Окситетрациклин	5	5	-	-
Доксициллин	10	1	6	3
Доксициклин+тилозин	1	-	1	-
Хлортетрациклин+тиамулин	1	-	-	1
Доксициклин+колистин	2	-	1	1
Доксициклин+гентамицин	1	-	1	-
Хлортетрациклин	1	1	-	-
Окситетрациклин+эритромицин+стрептомицин+ колистин	1	-	1	-
Линкозамиды				
Линкомицин	3	-	1	2
Линкомицин+спектиномицин	3	1	-	2
Флорфеникол+линкомицин	1	1	-	-
Клиндамицин+спектиномицин	1	-	-	1
Фторхинолоны				
Марбофлоксацин	4	2	-	2
Норфлоксацин+колистин	1	-	-	1
Энрофлоксацин	10	5	-	5
Энрофлоксацин+колистин	2	2	-	-
Энрофлоксацин+триметоприм	1	1	-	-
Энрофлоксацин+колистин+триметоприм	3	2	-	1
Энрофлоксацин+амоксициллин	1	1	-	-
Левифлоксацин	2	-	-	2
Ципрофлоксацин	1	1	-	-
Офлоксацин	2	-	-	2
Сульфаниламиды				
Фосфомицин+триметоприм	2	-	-	2
Сульфадиазин+триметоприм	3	-	-	3
Сульфадиметоксин+триметоприм	1	-	1	-
Сульфаметоксазол	1	-	-	1
Линкозамиды				
Линкомицин	3	-	1	2
Линкомицин+спектиномицин	3	1	-	2
Флорфеникол+линкомицин	1	1	-	-
Клиндамицин+спектиномицин	1	-	-	1

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
Иные группы антибиотиков				
Меквиндокс (хиноксолины)	1	-	-	1
Цефтиофур (цефалоспорины)	10	2	4	4
Вирджиниамицин (стрептограминовые антибиотики)	1	-	-	1
Флорфеникол (фторированный синтетический аналог тиамфеникола)	11	3	-	8
Фосфомицин+тилозин (производные фосфоновой кислоты)	1	-	1	-
Тиамулин (полусинтетические дериваты дитерпенового антибиотика плевромутилина)	7	1	3	3
Тиамулин+тилозин	1	-	1	-
Колистин (циклические полипептидные антибиотики)	6	-	4	2

При исследовании 25 препаратов макролидов и подкласса азалидов (таблица 3) установлено, что только к 13 (52 %) не развивалась резистентность при соответствии количества пассажей и рекомендуемых введений препаратов.

Из 22 препаратов тетрациклина, полусинтетических антибиотиков группы тетрациклинов широкого спектра, только к

7 (31,8 %) не развивалась резистентность микроорганизмов при соответствии количестве пассажей рекомендуемому числу введений препаратов (таблица 3). При этом комбинация, в частности, доксициклина с колистином, гентамицином и тилозином не решала проблемы спектра активности и скорости развития резистентности.

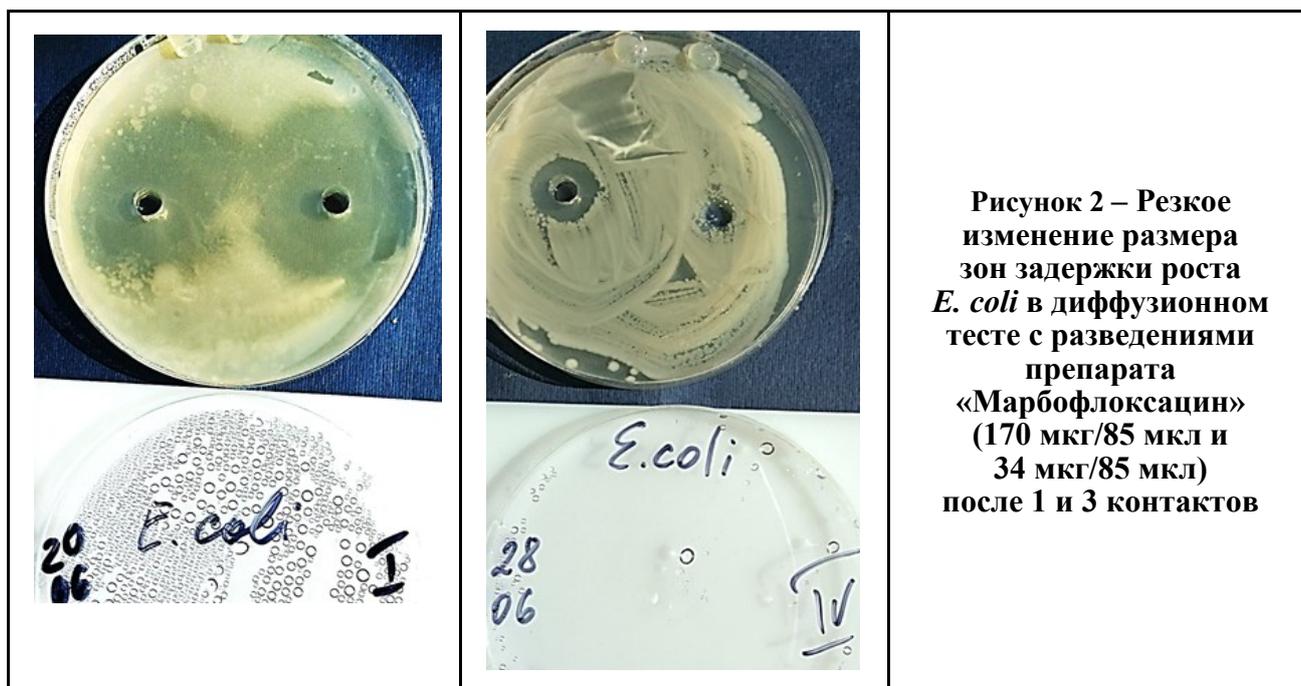


Рисунок 2 – Резкое изменение размера зон задержки роста *E. coli* в диффузионном тесте с разведениями препарата «Марбофлоксацин» (170 мкг/85 мкл и 34 мкг/85 мкл) после 1 и 3 контактов

Из 27 препаратов фторхинолонов только 14 (51,9 %) не создавали риска появления резистентных штаммов в процессе применения (таблица 3). Тем не менее даже повторяющийся контакт микроорганизмов с одним из наиболее эффективных

АДВ – марбофлоксацином – мог быстро способствовать развитию резистентности (рисунок 2). Ко всем 7 исследованным препаратам сульфаниламидов резистентность микроорганизмов развивалась после 1-2 контактов (таблица 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что анти-микробные препараты с одинаковыми активно действующими веществами, но разных производителей могут существенно отличаться друг от друга по спектру действия и скорости развития резистентности к ним микрофлоры. Это подтверждает необходимость определения этих показателей при регистрационных испытаниях и проведения дополнительных исследований, если при производстве зарегистрированного препарата начинают использовать активно действующее вещество иного происхождения.

Необходимо отметить, что в большинстве случаев, независимо от природы и качества антибиотика, каждый его контакт с микроорганизмами вызывает рост их устойчивости. В связи с этим, особенно при групповом применении антибиотиков путем выпойки или в смеси с кормом, для предупреждения миграции микрофлоры с возрастающей резистентностью целесообразно проводить профилактическую дезинфекцию.

Результаты диффузионного теста, возможно, в полной мере не отражают сложных процессов воздействия антибиотиков на бактерии *in vivo* и развития у них резистентности, но формально показывают количество контактов препарата с микроорганизмом, приводящее к возникновению резистентности. Это позволяет оценить качество препарата, скорректировать схему его применения для снижения риска развития резистентности микрофлоры и обеспечения эффективности лечения. Только 32 % исследованных препаратов антибиотиков при заявленном числе введений не вызывали выраженной резистентности. К 42 % препаратов резистентность микрофлоры развивалась уже после 1–3 контактов при рекомендованном курсе 4–7-кратного применения, а 26 % препаратов не обеспечивали заявленный спектр активности или вызывали быстрое развитие резистентности у микроорганизмов 1–2 родов. То есть применение таких препаратов согласно инструкции обязательно приводило бы к появлению резистентных штаммов. Но, исходя из этих результатов, были даны рекомендации по сокращению продолжительности лечения и количеству введений препаратов.

Исходя из полученных результатов, нужно отметить, что пенициллины можно применять только однократно, причем их сочетание со стрептомицином не решает проблем эффективности и быстрого появления резистентных микроорганизмов. Альтернативой может быть применение амоксициллина, особенно с клавулановой кислотой.

Проблематично использование для лечения бактериальных инфекций сульфаниламидов, в том числе в сочетании с препаратами других групп.

В целом из «проблемных» антибиотиков необходимо выделить тилозин, тилмикозин, доксициклин, флорфеникол, линкомицин, тиамулин, цефтиофур, колистин, эффективность которых очень зависела от производителя.

Можно согласиться с необходимостью государственного регулирования использования в животноводстве критически важных для медицины антибиотиков (фторхинолоны и цефалоспорины третьего и четвертого поколений) и их применения у животных только в случаях крайней необходимости [7]. В известной степени появлению резистентных микроорганизмов может способствовать использование субстанций низкого качества. В частности, только 51,9 % исследованных препаратов фторхинолонов не создавали риска появления резистентных штаммов в процессе применения.

В целом необходимо:

- отказаться от нерегулируемого применения антибиотиков;
- продолжать осуществлять контроль качества антимикробных препаратов, применяемых в животноводстве;
- постоянно проводить контроль чувствительности потенциально патогенной микрофлоры и использовать антибиотики согласно полученным данным;
- сокращать продолжительность применения препаратов и проводить их ротацию;
- исключить применение критически важных для медицины антибиотиков;
- снижать объемы применения антибиотиков за счет регулярного проведения дезинфекции и улучшения условий содержания животных.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Высоцкий, А. Э. Изменение видового состава микрофлоры воздуха свиноводческих помещений за технологический цикл / А. Э. Высоцкий // *Ветеринарная наука – производству* : сб. науч. тр. / РУП «ИЭВ». – Минск, 2007. – Вып. 39. – С. 71–79.
2. Маляня, Э. С. Проблема использования антибиотиков в животноводстве и пути контроля микробной антибиотикорезистентности (МАР) [Электронный ресурс] / Э. С. Маляня // *НПК «Фарминдустрия»*. – 2020. – Режим доступа: <https://pharmindustria.com/projects/poleznye-stati-po-veterinariii/problema-ispolzovaniya-antibiotikov-v-zhivotnovodstve-puti-kontrolya-mikrobnoj-antibiotikorezistentnosti/>. – Дата доступа: 02.05.2024.
3. Руководящие принципы ВОЗ по применению важных в медицинском отношении противомикробных препаратов в продовольственном животноводстве: исполнительное резюме [Электронный ресурс] // ВОЗ, Институциональное хранилище для обмена информацией. – 2017. – Режим доступа: <https://iris.who.int/handle/10665/259245>. – Дата доступа: 02.05.2024.
4. Прунтова, О. В. Современное представление о механизмах антимикробной резистентности бактерий (аналитический обзор) / О. В. Прунтова, В. С. Русалеев, Н. Б. Шадрова // *Ветеринария сегодня*. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 7–13.
5. Антибиотикорезистентность, новые возможности антибактериального воздействия / А. Н. Косинец [и др.] // *Вестник ВГМУ*. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 70–76.
6. Положение о порядке государственной регистрации ветеринарных препаратов, ведения Государственного реестра ветеринарных препаратов, порядке и условиях выдачи регистрационного свидетельства ветеринарного препарата [Электронный ресурс]: утв. постановлением Совета Министров Респ. Беларусь 29.04.2017 г. № 317 // *КонсультантПлюс. Беларусь* / ООО «ЮрСпектр», Нац. центр правовой информ. Респ. Беларусь. – Минск, 2024.
7. Забровская, А. В. Чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства / А. В. Забровская // *VetPharma*. – 2012. – № 5. – С. 20–24.

БЕЛРАБОРАЛ

приманка антирабическая для
пероральной иммунизации
плотоядных животных
против бешенства

- ▶ содержит вакцину из штамма вируса бешенства «КМИЭВ-94»;
- ▶ применяется в осенне-зимний и зимне-весенний периоды и раскладывается в местах обитания животных, поедаемость 100%-ная;
- ▶ иммунологическая эффективность – 93 %; иммунитет к бешенству вырабатывается в течение 21–30 суток и сохраняется до 1 года и более;
- ▶ для обеспечения стойкого благополучия местности по бешенству оральную вакцинацию необходимо проводить ежегодно двукратно в течение 3 лет после последнего случая заболевания;
- ▶ биоразлагаемая



НОВИНКА!

WWW.BIEVM.BY

УДК 619:616-07:616.15:(619:579.852.13)

Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент
Ананчиков М.А., кандидат ветеринарных наук, доцент
Гордиевская О.Н., младший научный сотрудник

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

ИЗУЧЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Резюме

В статье представлены результаты изучения изменений гематологических показателей и фагоцитарной активности лейкоцитов крови у белых мышей при их экспериментальном заражении *Clostridium perfringens*.

Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии инфекционной нагрузки клостридий на изменения в составе крови мышей, особенно на ранних сроках наблюдения. Так, заражение мышей дозой $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь вызывает снижение практически всех изучаемых гематологических показателей. Заражение мышей дозой $5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь, напротив, сопровождается лейкоцитозом на ранних сроках наблюдения и эритроцитозом – на позднем сроке наблюдения. Независимо от дозы инфекционной нагрузки *Clostridium perfringens* снижалась фагоцитарная активность лейкоцитов – фагоцитарный показатель и степень завершённого фагоцитоза.

Ключевые слова: белые мыши, *Clostridium perfringens*, гематологические показатели, фагоцитарная активность лейкоцитов крови.

Summary

The article presents the results of the study of changes in hematological parameters and phagocytic activity of white mice blood leukocytes during experimental infection with *Clostridium perfringens*.

The obtained experimental results testify to the multidirectional influence of clostridium infectious load on changes in the blood composition of mice, especially in the early periods of observation; so infection of mice with a dose of $5,0 \times 10^7$ microbial cells/mouse causes a decrease in almost all studied hematological parameters. On the contrary, infection of mice with a dose of $5,0 \times 10^5$ microbial cells/mouse is accompanied by leukocytosis in the early period of observation and erythrocytosis in the late period of observation. The phagocytic activity of leukocytes, i.e. phagocytic index and the degree of completed phagocytosis in blood leukocytes, decreased regardless of the dose of *Clostridium perfringens* infectious load.

Keywords: white mice, *Clostridium perfringens*, hematological parameters, phagocytic activity of blood leukocytes.

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Clostridium perfringens являются анаэробами, грампозитивными спорообразующими бактериями, имеют широкое распространение в окружающей среде и способны вызывать тяжелые заболевания у людей и животных. Вирулентные свойства различных штаммов *Clostridium perfringens* зависят от их способности продуцировать в организме хозяина токсины и ферменты, которые обладают литической активностью, вызывают разрушение целостности структуры тканей различной локализации и вызывают множество гистотоксических и энтеротоксических заболеваний [1, 2].

Штаммы *Clostridium perfringens* относят к семи основным токсинотипам: тип А (альфа-токсин), тип В (альфа-, бета- и эpsilon-токсины), тип С (альфа- и бета-токсины), тип D (альфа- и эpsilon-токсины), тип Е (альфа- и йота-токсины), тип F (альфа- и энтеротоксин) и тип G (альфа- и NetB-токсины) [3].

Целью исследований являлось изучение гематологических показателей и фагоцитарной активности лейкоцитов крови белых мышей при их экспериментальном заражении штаммом *Clostridium perfringens* тип А (КМИЭВ-В153).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модель острой и подострой формы клостридиоза воспроизводили путем внутривентриального введения мышам штамма *Clostridium perfringens* (КМИЭВ-В153). Опыт проводили на белых мышах массой 16–18 г.

Штамм *Clostridium perfringens* тип А (КМИЭВ-В153) получен из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского». Штамм *Clostridium perfringens* пересекали со среды Китт-Тароцци на 5%-ный кровяной агар и через 24 часа культивирования в анаэробных условиях при температуре 37 °С смывали бактерии с поверхности агара стерильным физиологическим раствором, доводили на денситометре концентрацию микробных клеток до $1,0 \times 10^9$ микробных клеток/1 мл и путем разведения получали концентрации: $1,0 \times 10^8$ микробных клеток/1 мл и $1,0 \times 10^6$ микробных клеток/1 мл.

Для воспроизведения клостридиоза мышей опытных групп внутривентриально заражали *Clostridium perfringens* в объеме 0,5 мл: в 1-й группе инфекционная нагрузка составила $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь, во 2-й – $5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь, 3-я группа – контроль (0,5 мл стерильного физиологического раствора/мышь). В каждой группе было 12 животных.

Для изучения гематологических показателей и фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови в качестве стабилизатора крови использовали 2,5%-ный стерильный раствор цитрата натрия.

Определение гематологических показателей проводили с использованием гематологического анализатора Mythic 18 (Швейцария). Кровь отбирали через 24, 48 часов и 10 суток после заражения мышей *Clostridium perfringens*.

Изучение фагоцитарной активности лейкоцитов проводили через 24 часа и 10 суток после заражения. Тест-микробом служила суточная культура условно-патогенного штамма *Staphylococcus epidermidis* (КМИЭВ-В149). Определяли фагоцитарный показатель – % лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе, фагоцитарное число – среднее арифметическое количество микробных клеток в одном лейкоци-

те. Для определения способности лейкоцитов крови дезинтегрировать микробные клетки изучали степень завершенности фагоцитарного процесса внутри лейкоцитов [8]. Кровь инкубировали с микробной взвесью в соотношении 4:1 в течение 45 минут при температуре 37 °С. По истечении этого срока лейкоцитарно-микробную взвесь распределяли в виде двух мазков на поверхности 1,8%-ного сердечно-мозгового агара в чашке Петри. Затем готовили препарат-отпечаток, а чашку с оставшимся мазком для подрашивания микробных клеток помещали в термостат при температуре 37 °С на 3 часа. По истечении указанного интервала времени готовили второй препарат-отпечаток. Мазки фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимза. Жизнеспособные микробные клетки окрашивались в сине-фиолетовый цвет, а погибшие – розово-синий.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью критерия t-Стьюдента для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внутривентриальное введение мышам *Clostridium perfringens* в дозе $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь сопровождалось гибелью 25 % животных в группе в течение 48 часов после заражения, что свидетельствовало об остром течении инфекционного процесса, индуцированного клостридиями. Во 2-й группе ($5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь) гибели животных не наблюдали. Во 2-й и 3-й группах сохранность мышей на протяжении всего опыта составила 100 %.

Результаты изучения гематологических показателей представлены в таблице 1. Через 48 часов после заражения *Clostridium perfringens* в 1-й группе (острое течение клостридиоза) отмечали снижение в крови лейкоцитов, моноцитов, гранулоцитов, тромбоцитов ($p < 0,01$); во 2-й группе (подострое течение клостридиоза), напротив, количество лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов и гемоглобина ($p < 0,01$) увеличивалось. Спустя 10 суток после заражения в 1-й группе увеличивалось по сравнению с контролем количество моноцитов и гранулоцитов ($p < 0,01$), количество лейкоцитов, лимфо-

цитов и эритроцитов восстанавливалось до уровня значений контрольных величин. Во 2-й группе повышенное количество эритроцитов регистрировали через 48 часов и 10 суток после заражения ($p < 0,01$), остальные показатели спустя 10 суток после заражения были на уровне значений контрольных величин.

Результаты изучения фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови мышей представлены в таблице 2. На всех сроках наблюдения в группах № 1 и № 2 отмечали достоверно значимое из-

менение активности лейкоцитов крови. Особенно выраженные изменения наблюдали у мышей группы № 1 через 10 суток после заражения: на фоне течения острого клостридиоза отмечали снижение фагоцитарной активности лейкоцитов (фагоцитарный показатель), показатель завершенность фагоцитоза составил 2 %. В контрольной группе значение этого показателя составило 55,8 %. При этом в обеих опытных группах отмечали разрастание тест-культуры *St. epidermidis* вне лейкоцитов.

Таблица 1 – Изучение гематологических показателей у мышей на разных сроках после заражения *Clostridium perfringens*

Группа	Гематологические показатели (M±m)						
	лейкоциты, $10^9/л$	лимфоциты, $10^9/л$	моноциты, $10^9/л$	гранулоциты, $10^9/л$	эритроциты, $10^{12}/л$	гемоглобин, г/л	тромбоциты, $10^9/л$
через 24 часа после заражения							
№ 1	4,5±0,16*	4,0±0,8	0,5±0,1*	0,4±0,1*	4,5±0,05*	70,4±16,8*	82,6±21,1*
№ 2	8,1±0,9	6,43±0,2*	0,9±0,04	1,2±0,2*	5,8±0,04	121,6±3,0	502±81,9
Контроль	7,2±0,9	5,7±0,7	0,8±0,08	0,75±0,1	5,8±0,08	123,5±4,7	492±53,1
через 48 часов после заражения							
№ 1	5,3±0,3	3,75±0,1*	0,5±0,08*	0,55±0,1	6,8±0,8	133,5±9,9	120±18,9*
№ 2	9,95±0,7*	7,2±1,3	1,1±0,08*	1,6±0,1**	7,85±0,4*	160,5±4,7*	329±17,2
Контроль	6,9±0,9	5,8±0,9	0,8±0,08	0,35±0,04	5,8±0,4	114,5±9,9	320±40,5
через 10 суток после заражения							
№ 1	7,5±1,6	4,95±0,9	1,23±0,4*	1,3±0,4*	7,2±0,2	137,3±6,4	306±83,1
№ 2	6,7±1,9	5,4±1,6	0,95±0,2	0,45±0,17	8,1±0,7*	152,8±14,6	280,3±82
Контроль	7,7±0,3	4,7±0,9	0,8±0,07	0,55±0,03	6,36±0,2	132±10,3	336±48,7

Примечание – *достоверное различие по сравнению с контролем при $p < 0,01$, **достоверное различие по сравнению с контролем при $p < 0,05$

Таблица 2 – Изучение фагоцитарной активности лейкоцитов крови и показателя завершенности фагоцитоза на разных сроках после заражения *Clostridium perfringens*

Группа	Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов крови мышей по отношению к <i>Staphylococcus epidermidis</i> (M±m)		
	фагоцитарный показатель, %	фагоцитарное число, у.е.	показатель завершенного фагоцитоза, %
через 24 часа после заражения			
№ 1	25,6±3,2*	1,6±0,1	27,7±2,8*
№ 2	44,4±0,9*	1,9±0,5	30,4±1,6*
Контроль	70,9±1,8	2,1±0,1	52,0±2,4
через 10 суток после заражения			
№ 1	32,3±2,3*	1,5±0,1	2,0±0,1*
№ 2	48,5±2,7*	1,8±0,4	13,8±0,4*
Контроль	72,4±0,9	2,4±0,3	55,8±2,4

Примечание – *достоверное различие по сравнению с контролем при $p < 0,01$

ВЫВОДЫ

1. При остром течении клостридиоза, сопровождающегося гибелью 25 % животных в группе, на ранних сроках наблюдения (через 24 и 48 часов) отмечали эритроцитопению, лейкопению, тромбоцитопению. Спустя 10 суток после заражения наблюдали нормализацию всех измененных показателей до уровня значений контрольных величин. Однако на этом сроке наблюдения отмечали увеличение количества моноцитов и гранулоцитов в крови мышей.

2. При подостром течении клостридиоза на всех сроках наблюдения сохранность мышей составила 100 %. В крови животных на ранних сроках наблюдения (через 24 и 48 часов) отмечали лейкоцитоз и эритроцитоз, количество тромбоцитов оставалось на уровне контрольных величин. Спустя 10 суток после заражения в крови мышей сохранялся эритроцитоз, остальные изучаемые показатели были на уровне контрольных значений.

3. При изучении фагоцитарной активности лейкоцитов, независимо от инфекционной нагрузки *Clostridium perfringens*, на всех сроках наблюдения отмечали снижение фагоцитарного показателя и завершенности фагоцитоза в лейкоцитах. Показатель завершенного фагоцитоза в группах № 1 и № 2 составил, соответственно, 2 % и 13,8 % против 55,8 % в контроле.

4. Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии инфекционной нагрузки *Clostridium perfringens* на изменения в составе крови мышей, особенно на ранних сроках наблюдения. Так, заражение мышей дозой $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь вызывает снижение практически всех изучаемых гематологических показателей. Заражение мышей дозой $5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь, наоборот, сопровождается эритроцитозом и лейкоцитозом. При этом в обеих опытных группах на всех сроках наблюдения резко снижалась фагоцитарная активность лейкоцитов крови по отношению к *Staphylococcus epidermidis*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Lethal effects and cardiovascular effects of purified alpha- and theta-toxins from Clostridium perfringens* / D. L. Stevens [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1988. – Vol. 157. – P. 272–279.
2. Kiu, R. *An update on the human and animal enteric pathogen Clostridium perfringens* / R. Kiu, L. J. Hall // *Emerg. Microbes Infect.* – 2018. – № 7. – P. 141.
3. Rood, J. I. *Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme* / J. I. Rood [et al.] // *Anaerobe.* – 2018. – № 53. – P. 5–10.
4. Titball, R. W. *The Clostridium perfringens alpha-toxin* / R. W. Titball, C. E. Naylor, A. K. Basak // *Anaerobe.* – 1999. – № 5. – P. 51–64.
5. *Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease* / F. A. Uzal [et al.] // *Future Microbiol.* – 2014. – № 9. – P. 361–377.
6. Nauseef, W. M. *Neutrophils at work* / W. M. Nauseef, N. Borregaard // *Nat Immunol.* – 2014. – № 15. – P. 602–611.
7. *A study of Clostridium perfringens fulminant infection complicated by severe intravascular hemolysis* / Y. Doteuchi [et al.] // *Hosp. J. Med.* – 2012. – № 37 (1). – P. 61–66.
8. Берман, В. М. *Завершенный фагоцитоз. Сообщение 1. Новый методический принцип изучения завершенной фагоцитарной реакции* / В. М. Берман, Е. М. Славская // *Журнал микробиологии.* – 1958. – № 3. – С. 8–13.

УДК 619:579.843

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент
Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ERIC И RAPD ПЦР В ГЕНОТИПИРОВАНИИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Резюме

В статье приведены данные по использованию методов ERIC и RAPD ПЦР в генотипировании эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, штаммы, ERIC, RAPD, полимеразная цепная реакция.

Summary

The article provides data on the use of ERIC and RAPD PCR methods in the genotyping of epizootic strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, strains, ERIC, RAPD, polymerase chain reaction.

Поступила в редакцию 10.03.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство *Pseudomonadaceae* представляет 5 родов: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*. Род *Pseudomonas* включает 7 основных видов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Изучаемый нами вид *Pseudomonas aeruginosa* по структуре О-антигена включает более чем 20 серогрупп, при этом высокая антигенная вариабельность *Pseudomonas aeruginosa* обуславливает постоянное увеличение их количества [1].

Псевдомоназ норок вызывает *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) – грамотрицательная аэробная палочковидная бактерия. Синегнойная палочка широко распространена во внешней среде, а также на коже, слизистых оболочках, в кале человека и животных, хорошо сохраняется во влажной среде (воде, моче, кале) и поддается воздействию обычных дезинфектантов (0,25%-ный раствор формалина, 0,5%-ный раствор фенола и гидроксида натрия). Возбудитель псевдомоназы обладает высокой устойчивостью ко многим антибиотикам [2, 3, 4].

В естественных условиях к псевдомоназу восприимчивы щенки норок, осо-

бенно самцы. Основной источник возбудителя – больные норки, которые при кашле, фырканье, с мочой и калом выделяют возбудитель во внешнюю среду. Передача его от больных животных к здоровым происходит аэрогенным путем, с пухом (во время линьки), через инвентарь, корм, подстилку и воду. Первым источником заражения норок служат мясные корма, полученные от больных псевдомоназом животных. Заболевание чаще регистрируют осенью. Заболеваемость при острых вспышках может достигать 45–50 % и сопровождаться высокой (до 70 %) летальностью [3, 4, 5, 6].

Предполагаем, что различные нуклеотидные профили геномов этих групп, полученные при ERIC и RAPD ПЦР, соответствуют различным генотипам *Pseudomonas aeruginosa* и, соответственно, различие в антигенном отношении проявляется фенотипически.

Цель работы – изучение генетических профилей эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с использованием методов ERIC и RAPD ПЦР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в рамках гранта БРФФИ Б22-055 от 4 мая 2022 г. При исследовании использовали суточные культуры эпизоотических штаммов *Pseudo-*

nas aeruginosa РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», выделенные из биологического материала от крупного рогатого скота и свиней из различных сельскохозяйственных предприятий республики. В работе использовали 12 чистых культур *P. aeruginosa* (референтные штаммы и полевые изоляты, выделенные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»). Бактериальную ДНК выделяли по методике, описанной Stone G.G. (1994) [7]. Миллиардную взвесь каждого штамма ресуспендировали в 0,5 мл дистиллированной воды в пробирках типа эппендорф, инкубировали в твердотельном термостате «Biosan» (Латвия) в течение 10 мин при температуре 98 °С, охлаждали и центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость применяли для амплификации и использовали следующие реактивы: буфер 10x PCR для Taq ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»), 10x ТВЕ-буфер pH 8,0, маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bpLadder» (Fermentas, Литва), Taq-полимераза (5 ед./мкл), раствор MgCl₂ (50 мМ), смесь дезоксинуклеозид-

трифосфатов (25 мМ, Fermentas), агароза (Helicon, Россия). ПЦР-продукт визуализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. RAPD ПЦР осуществляли в реакционной смеси с праймерами Rapd1 – AGCGGGCCAA [8], Rapd2 – ACGGCCGACC [9]. Праймеры синтезировали в ОДО «Праймтех» (Минск). Режим амплификации для RAPD ПЦР включал начальный цикл денатурации – 1 мин при температуре 95 °С; 35 циклов по схеме: денатурация 95 °С – 30 с, отжиг 45 °С – 50 с, синтез 60 °С – 120 с, завершающий цикл – 5 мин при 60 °С. ERIC ПЦР осуществляли в реакционной смеси с праймерами ERIC1 – ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC, ERIC2 – AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG [10]. Режим амплификации для ERIC ПЦР проводили в 3 вариантах (таблица), постановку реакции – на термоциклере Thermal Cycler C1000 (BioRad, США). Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 2%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 12 В/см при комнатной температуре. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR (BioRad, США).

Таблица – Режим амплификации для ERIC ПЦР

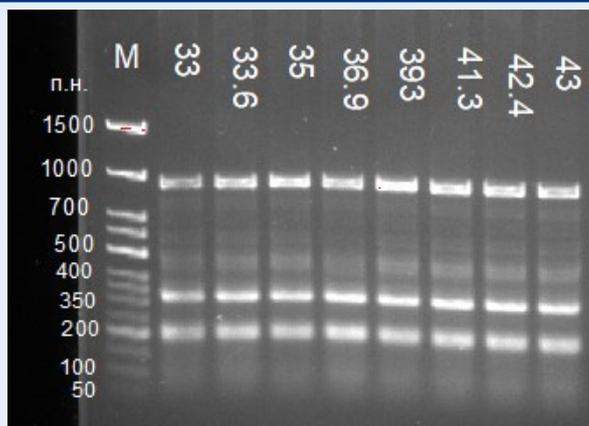
Этапы	Режим 1	Режим 2	Режим 3
Начальный цикл денатурации	95 °С – 7 мин	95 °С – 7 мин	95 °С – 5 мин
30 циклов (денатурация, отжиг, элонгация)	94 °С – 1 мин	94 °С – 1 мин	94 °С – 1 мин
	51 °С – 1 мин	42 °С – 1,5 мин	45 °С – 1 мин
	60 °С – 8 мин	60 °С – 1 мин	60 °С – 2 мин
Завершающий цикл элонгации	60 °С – 16 мин	60 °С – 10 мин	60 °С – 5 мин

Для изучения внутривидового различия между штаммами *Pseudomonas aeruginosa* использовали молекулярно-генетические методы – ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus – энтеробактериальная повторяющаяся интрагенная последовательность) и RAPD ПЦР (Random Amplified Polymorphic DNA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При постановке RAPD ПЦР использовали наиболее оптимальные концентрации реакционных смесей: количество Taq-

полимеразы в реакционной смеси – 1,25 ед./мкл, концентрация праймера – 0,5 мкмоль, магния – 3 ммоль, dNTPs – 0,2 ммоль, матрицы – 2 мкл (в 25 мкл). Установили, что температура отжига существенно не влияет на результаты исследования (рисунок 1), при этом количество матрицы имеет значение. Поэтому важно в постановке RAPD ПЦР использовать исходную культуру с одинаковой концентрацией ДНК и, по возможности, сравнительный анализ проводить одновременно со всеми исследуемыми штаммами.

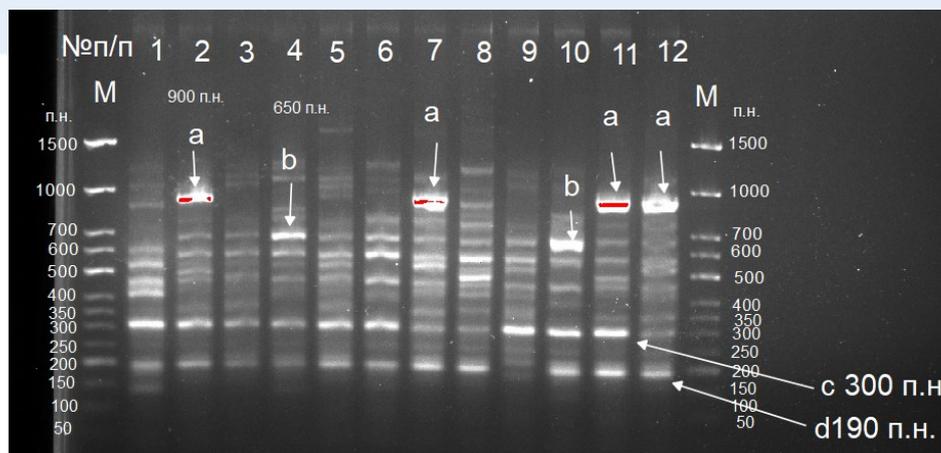


М – маркер молекулярных масс 50–1500 п.н.;
33–43 – температура отжига

Рисунок 1 – Электрофореграммы продуктов амплификации штамма 2a *P. aeruginosa* при разной температуре отжига

В результате RAPD ПЦР установили идентичность 12 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* по продуктам RAPD ПЦР на уровне 190 и 300 п.н. и четкое различие у группы штаммов *Pseudomonas aeruginosa* № 2a, 7a, 11a, 12a и группы штаммов 4b и

10b. Штаммы № 1, 3, 5, 6, 8, 9 представляют собой группу, частично схожую по нуклеотидному профилю, и требуют более детального изучения другими методами, в частности методом ERIC ПЦР (рисунок 2).



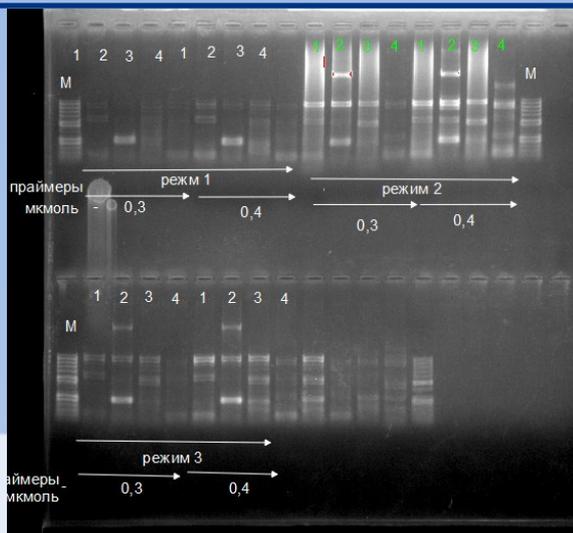
М – маркер молекулярных масс 50–1500 п.н.; № 1–12 – исследуемые штаммы *P. aeruginosa*, a, b – схожие геномные профили

Рисунок 2 – RAPD ПЦР. Электрофореграмма продуктов амплификации штаммов *P. aeruginosa*

В результате RAPD ПЦР получилось добиться отличающихся картин ПЦР для последовательностей внутри вида, при этом некоторые штаммы были между собой идентичны, другие имели индивидуальные генотипы.

ERIC ПЦР осуществляли в реакционной смеси с праймерами ERIC1 – ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC, ERIC2 –

AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG. Праймеры синтезировали в ОДО «Праймтех» (Минск). Постановку реакции проводили на термоциклере Thermal Cycler C1000 (BioRad, США). Режим амплификации для ERIC ПЦР проводили в трех вариантах (рисунок 3). Наиболее четкое разделение продуктов реакции проходило при режиме 3.



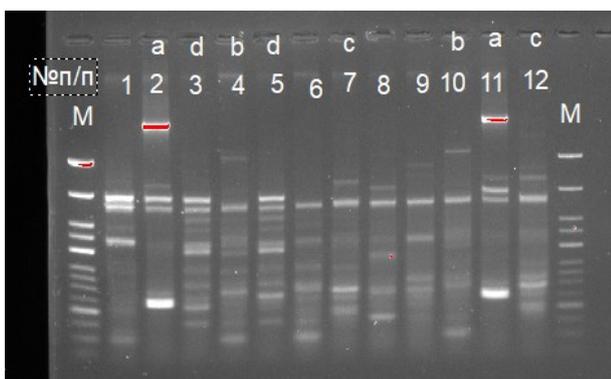
М – маркер молекулярных масс;
1–4 – исследуемые штаммы

Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации штаммов *P. aeruginosa* при разных режимах амплификации и концентрации праймеров

При постановке ERIC ПЦР с 12 культурами *P. aeruginosa* использовали наиболее оптимальные концентрации реакционных смесей: количество Taq-полимеразы в реакционной смеси – 1,25 ед./мкл, концентрация праймера – 0,5 мкмоль, магния – 3 ммоль, dNTPs – 0,2 ммоль, матрицы – 2 мкл (в 25 мкл). Установили, что температура отжига существенно не влияет на результаты исследования (рисунок 3),

при этом количество матрицы имеет значение. Поэтому в постановке ERIC ПЦР важно использовать исходную культуру с одинаковой концентрацией ДНК и, по возможности, сравнительный анализ проводить одновременно со всеми исследуемыми штаммами.

В результате ERIC ПЦР установили четкое различие у некоторых штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 4).



М – маркер молекулярных масс 50–1500 п.н.; № 1–12 – исследуемые штаммы *P. aeruginosa*.

a, b, c, d – схожие геномные профили. Концентрация праймеров – 0,5 мкмоль

Рисунок 4 – ERIC ПЦР. Электрофореграмма продуктов амплификации штаммов *P. aeruginosa*

Получилось добиться отличающихся картин ПЦР для последовательностей внутри вида, при этом некоторые штаммы были между собой идентичны, другие имели индивидуальные генотипы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод RAPD ПЦР подтвердил свою диагностическую значимость при генотипировании бактерий *Pseudomonas aeruginosa* внутри вида. Наибольшее количество эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных на территории Республики Беларусь, относятся к 2 геномогруппам: 2a, 7a, 11a, 12a и 4b, 10b. Шесть

изолятов имели индивидуальные генотипы.

ERIC ПЦР позволяет выявлять индивидуальные особенности штаммов. Большая часть эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных на территории Республики Беларусь, относятся к 4 геномогруппам: 2a и 11a, 3d и 5d, 4b и 10b, 7c и 12c. Четыре изолята имели индивидуальные генотипы.

Вакцина против псевдомоноза норок не обеспечивает стерильный иммунитет к гетерологичным штаммам *Pseudomonas aeruginosa*, и для создания высокоэффективной вакцины необходимо выя-

вить генетические группы псевдомон, нуклеотидные профили геномов которых соответствуют различным генотипам *Pseudomonas aeruginosa* и, соответственно, различаются в антигенном отношении, что проявляется фенотипически, белковый состав антигенов имеет различие.

Методы ERIC и RAPD ПЦР подтвердили свою диагностическую значимость при генотипировании бактерий *Pseudomonas aeruginosa* внутри вида. С помощью RAPD и ERIC ПЦР можно выявлять доминирующие группы и генотипы *Pseudomonas aeruginosa*, встречающиеся на территории Республики Беларусь, и наиболее

этиологически значимые штаммы использовать при разработке вакцин против псевдомоноза сельскохозяйственных животных и планировании профилактических мероприятий. Все выявленные или доминирующие группы целесообразно включать в состав вакцины против псевдомоноза норок.

Принципиально новые данные, полученные в ходе выполнения работы, позволят использовать их для разработки эффективной схемы профилактики *Pseudomonas aeruginosa* в звероводческих хозяйствах Республики Беларусь.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции: федеральные клинические рекомендации, ноябрь 2014 / О. Н. Егорова [и др.]. – М., 2014. – 82 с.
2. Алтон, Л. В. Выживаемость и адаптация некоторых штаммов рода *Pseudomonas* в морской и речной воде / Л. В. Алтон // Микробиология. – 1983. – Т. 45. – № 6. – С. 16–20.
3. Баженова, Е. А. Чувствительность *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от сельскохозяйственных животных, пушных зверей и птиц, к антибиотикам / Е. А. Баженова // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 6. – С. 8–10.
4. Беляков, В. Д. Псевдомонады и псевдомонозы / В. Д. Беляков, Л. А. Ряпис, В. И. Илюхин. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
5. Больных, В. Т. Псевдомонозы животных и их профилактика / В. Т. Больных, Е. А. Кирьянов, Н. В. Больных. – Владивосток: Дальневосточное кн. изд-во, 1987. – С. 37–43.
6. Гвоздяк, Р. И. Об особенностях патогенности *Pseudomonas aeruginosa* / Р. И. Гвоздяк, Л. М. Яковлева // Журнал микробиологии. – 1987. – № 3. – С. 3–6.
7. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure / G. G. Stone [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1994. – 32: 1742–1749.
8. Identification of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier / O. Zaborina [et al.] // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2006. – 5, 14. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-14>.
9. Barrow, K. Alterations in Two-Component Regulatory Systems of *phoPQ* and *pmrAB* Are Associated with Polymyxin B Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / K. Barrow, D. H. Kwon // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2009. – 53(12), 5150–5154. doi:10.1128/aac.00893-09.
10. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods of cattle origin, diarrheic cattle, and diarrheic humans in Egypt / W. Elmonir [et al.] // Gut Pathogens. – 2021. – 13(1). doi:10.1186/s13099-021-00402-y.

наша продукция



УДК 638.154.3:579.873.13

Климко Т.И., магистр сельскохозяйственных наук
Зинина Н.В., кандидат биологических наук
Архипова Н.В., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск, Республика Беларусь

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BIFIDOBACTERIUM* ИЗ КИШЕЧНИКА РАЙОНИРОВАННОЙ ПЧЕЛЫ

Резюме

В статье приведены данные о выделении бактерий *Bifidobacterium asteroides* из кишечника районированной пчелы и изучении их антагонистической активности. В результате исследований были выделены и идентифицированы три штамма *Bifidobacterium asteroides*: BG9, BG21 и BG24. Идентифицированные штаммы продемонстрировали значительную антагонистическую активность по отношению к возбудителям таких заболеваний пчел, как гафниоз (*Hafnia alvei* 9760 B-57), европейский гнилец (*Streptococcus pluton*, *Melissococcus pluton* B-11115) и американский гнилец (*Penibacillus alvei* B-5247).

Ключевые слова: кишечник медоносной пчелы, *Bifidobacterium*, гнилец американский, гнилец европейский, гафниоз.

Summary

The article presents data on the isolation of the bacteria *Bifidobacterium asteroides* from the intestines of a zoned bee and the study of their antagonistic activity. As a result of the research, three strains of *Bifidobacterium asteroides* were isolated and identified: BG9, BG21 and BG24. The identified strains demonstrated significant antagonistic activity against pathogens of bee diseases, such as hafniosis (*Hafnia alvei* 9760 B-57), European foulbrood (*Streptococcus pluton*, *Melissococcus pluton* B-11115) and American foulbrood (*Penibacillus alvei* B-5247).

Keywords: honey bee intestines, bifidobacteria, American foulbrood, European foulbrood, hafniosis.

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Как свидетельствуют археологические данные, человек занимается пчеловодством на протяжении уже 6000 лет. Принципиально за это время ничего не изменилось: пчел содержат для получения продуктов пчеловодства. Но проблема в том, что процессы интенсификации повлияли на качество этих продуктов. В качественных продуктах пчеловодства не должны содержаться вещества, не свойственные их природному составу (токсичные и радиоактивные элементы, остатки лекарственных препаратов). При этом у пчел регистрируется более 20 инфекционных заболеваний, и пусковым механизмом большинства из них являются стресс-факторы, причем избежать абсолютно всех неблагоприятных условий на практике невозможно. Самые распространенные причины ослабления семей – заклещеванность, резкая смена температуры, влажность, перенаселение, голод, плохой корм, недостаток кислорода, гормональный дисбаланс, химические препараты,

лекарства, а также ультрафиолетовый свет, X-лучи, манипуляции с семьей пчел, беспокойство во время зимовки. С учетом вышесказанного абсолютно логичным желанием пчеловодов является использование поддерживающих пчелосемьи лекарственных средств для получения стабильно высокого количества пчелопродукции. Самым простым решением проблемы инфекционных заболеваний являются антибиотики и антибиотикоподобные вещества, которые, к огромному сожалению конечного потребителя, накапливаются в продуктах пчеловодства [3].

Во всех отраслях сельского хозяйства специалисты заняты поиском безопасной замены антибиотикам. Одним из перспективных методов достижения этой цели является использование пробиотиков. Они представляют собой живые микроорганизмы, которые, поступая в организм пчел, способны оказывать благоприятное воздействие на иммунную и репродуктивную системы.

Нормальная микрофлора кишечника обеспечивает широкий спектр метаболических, трофических и защитных функций медоносной пчелы, которые играют важную роль в защите от патогенных микроорганизмов. В последнее время в пчеловодстве актуальным является использование полезной микробиоты в составе пробиотических препаратов [2].

В период весеннего развития при недостаточном поддерживающем медосборе пчеловоды применяют побудительные подкормки, основу которых составляет сахарный сироп, обогащенный препаратами аминокислот, витаминов, микроэлементов [1].

Считается, что пробиотические препараты, добавляемые в стимулирующие подкормки для пчел, могут значительно улучшить микробиоценоз их кишечника за счет подавления роста патогенных бактерий и стимуляции размножения симбиотических микроорганизмов. В результате этого улучшается пищеварение, повышается иммунитет и снижается вероятность заболеваний [3]. Пробиотические препараты могут положительно влиять на продуктивность пчелиных семей, репродуктивные показатели маток. Улучшенное пищеварение и повышенная иммунная функция могут привести к увеличению количества собираемого меда, а также к повышению качества других продуктов пчеловодства. Пробиотические микроорганизмы могут отличаться по механизму действия на организм животного. Исследованиями установлено, что бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* оказывают антибактериальное действие посредством продуцирования органических кислот (молочной и уксусной), перекиси водорода, диацетила (продукт ферментации углеводов с антибактериальной активностью) и бактериоцинов (пептиды, обладающие антимикробной активностью).

Рядом исследований показано, что состав микробиоты кишечника медоносных пчел может изменяться в зависимости от времени года и доступности корма. Сезонные изменения в растительности и погодных условиях могут влиять на видовой состав микроорганизмов, которые пчелы получают с нектаром и пыльцой.

Установлено, что нектар, собранный пчелами, может содержать не только пита-

тельные вещества, но и различные микроорганизмы, как полезные, так и патогенные [4]. Но в то же время в мировом научном сообществе доказано относительное постоянство состава кишечной микробиоты взрослой пчелы. В кишечнике рабочих пчел *Apis mellifera* преобладают бактерии 8 видов, составляющие более 95 % от общего количества бактерий у большинства особей [5]. Эти виды одинаковы для пчел во всем мире, но варьируют в количественном соотношении штаммов в зависимости от территории, где обитает данное насекомое. Отсюда следует вывод, что нужно учитывать территориальный аспект при выборе штамма для пробиотика, и самым логичным объектом для выделения штамма является местная пчела.

Также имеются данные, что кишечник взрослой пчелы колонизируется типичными видами кишечных бактерий в течение первых нескольких дней после выхода из стадии куколки. Колонизация кишечника происходит в результате контакта молодых пчел с пчелами-кормилицами и с окружающей средой улья. Личинка же не имеет этих микроорганизмов, и у них выделяют микроорганизмы, которые попали в кишечник с кормом. Этим же путем попадает и патогенная микробиота. Логичным является заселение кишечника личинки и пространства улья пробиотическим местным штаммом.

Выделение и включение новых пробиотических культур в практику пчеловодства может привести к улучшению здоровья пчел и стабильности пчелиных колоний, что, в свою очередь, способствует сохранению биоразнообразия и устойчивости экосистем. Данное направление открывает новые перспективы для улучшения здоровья пчел и устойчивости пчеловодства, что требует углубленных исследований и внедрения полученных знаний в практику.

Разработка новых пробиотических продуктов для пчеловодства, которые могут улучшить здоровье пчел, повысить их устойчивость к болезням и, следовательно, увеличить продуктивность пчелиных семей, является актуальным направлением пчеловодства.

Целью исследования было выделение бактерий рода *Bifidobacterium* из ки-

пчелника медоносной пчелы с последующей оценкой их антагонистической активности к возбудителям болезней пчел (гафниоз, американский и европейский гнильцы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа по выделению и идентификации бактерий рода *Bifidobacterium* проводилась совместно РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси».

Отбор материала для выделения бифидобактерий проводили на экспериментальной пасеке и в лаборатории болезней пчел РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Культуры бактерий рода *Bifidobacterium* выделяли из средней и задней кишки местных здоровых рабочих пчел *A. mellifera carnica*. Для проведения исследования живых пчел усыпляли в морозильной камере. Отбирали по 10 пчел каждой исследуемой семьи и в стерильных условиях препарировали кишечник, состояние которого сразу же оценивали по бальному методу, предложенному Шагун Л.А. (1983).

Затем кишечник с содержимым тщательно гомогенизировали и готовили 3-кратное разведение в изотоническом растворе хлорида натрия. Каждое полученное разведение (по 100,0 мкл) высевали с помощью шпателя Дригальского на поверхность селективных питательных сред: бифидум-среды (Оболенск) и среды MRS (Codalab). Через 72–96 ч инкубации в анаэробных условиях при температуре 37 °С осуществляли учет выросших колоний.

Идентификацию выделенных культур бактерий осуществляли по морфологическим, культуральным, биохимическим и тинкториальным признакам, а также на основании данных анализа белковых профилей с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (МАЛДИ-ВПМС). Подготовку культур для МАЛДИ-ВПМС осуществляли по стандартной методике. Снятие спектров проводили в автоматическом режиме на масс-спектрометре MALDI Biotyper MicroFlex (Bruker Daltonics, Германия). Полученные спектры анализировали с использованием системы управления базами данных MALDI BioTyper для идентификации микроорганизмов.

Антагонистическую активность выделенных культур бифидобактерий оценивали методом лунок, используя в качестве тест-культур штаммы *Hafnia alvei* 9760 B-57 (возбудитель гафниоза), *Melissococcus plutonius* (*Streptococcus pluton*, *Melissococcus pluton*) B-11115 (возбудитель европейского гнильца) и *Penibacillus alvei* B-5247 (возбудитель американского гнильца). Для этого на «газоне» патогенных микроорганизмов прокалывали лунки диаметром 9 мм и вносили в них культуральную жидкость объемом 0,1 мл.

Уровень антагонизма бактерий рода *Bifidobacterium* определяли по зоне задержки роста (ЗЗР) при культивировании патогенов. Если ЗЗР составляла 5–10 мм, то уровень антагонистической активности считался слабым, 10–20 – средним, больше 20 – высоким. Учет результатов проводили через 24 ч культивирования при оптимальной температуре в термостате 37 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделенные из кишечника медоносных здоровых рабочих пчел чистые культуры бактерий по морфологическим, тинкториальным и биохимическим признакам схожи с представителями рода *Bifidobacterium*. Как видно из данных таблицы 1, исследуемые культуры с наибольшей вероятностью относятся к виду *Bifidobacterium asteroides*. Параметр достоверности идентификации для штаммов BG9 и BG21 составил 2,082 и 2,072, соответственно, что указывает на точную идентификацию до рода, вероятную идентификацию до вида. Для штамма BG24 параметр достоверности равнялся 1,97, что указывает на вероятную идентификацию до рода (таблица 1).

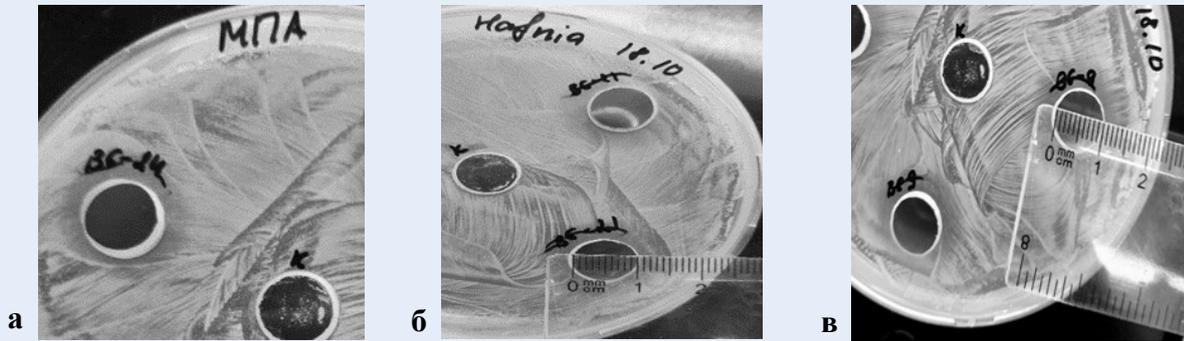
Результаты исследования антагонистической активности штаммов *B. asteroides* BG24, BG21 и BG9 в отношении чистой культуры патогена *H. alvei* 9760 приведены на рисунке 1. Можно увидеть, что штамм BG9 при культивировании *H. alvei* 9760 дал ЗЗР 14 мм, а штаммы BG 24 и BG 21 – по 12 мм. Эти показатели ЗЗР соответствуют среднему уровню антагонистической активности.

Результаты исследования антагонистической активности штаммов *B. asteroides* BG9, BG21 в отношении чистой культуры патогена *M. plutonius* B-11115 представлены на рисунке 2.

Таблица 1 – Результаты видовой идентификации культур бактерий, выделенных из кишечника пчел

Штамм	Видовая принадлежность	Параметр достоверности
BG9	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	2,082
BG21	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	2,072
BG24	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	1,97

Примечание – 2,300...3,000 – точная идентификация до вида; 2,000...2,299 – точная идентификация до рода, вероятная идентификация до вида; 1,700...1,999 – вероятная идентификация до рода; 0,000...1,699 – ненадежная идентификация

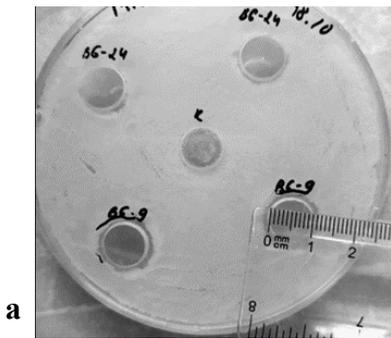


а – штамм BG24; б – штамм BG21; в – штамм BG9

Рисунок 1 – Антагонистическая активность штаммов *B. asteroides* в отношении *H. alvei* 9760

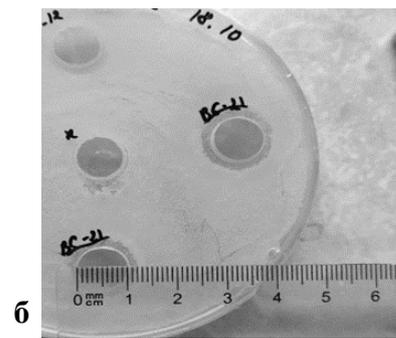
При изучении антагонистической активности выделенных штаммов *B. asteroides* против возбудителя европейского гнильца *M. plutonius B-11115* (рисунок 2) нами были установлены ЗЗР для двух изо-

лятов: BG9 и BG21 – соответственно, 11 и 12 мм. Данные величины зоны задержки роста *M. plutonius B-11115* характеризуют антагонистическую активность штаммов как среднюю.



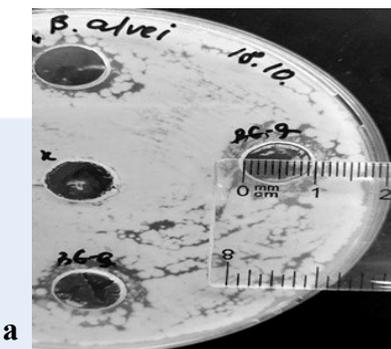
а – штамм BG9; б – штамм BG21

Рисунок 2 – Антагонистическая активность штаммов *B. asteroides* в отношении патогена *M. plutonius B-11115*



Полученные нами результаты исследования антагонистической активности штаммов *B. asteroides* BG9, BG21 в отноше-

нии чистой культуры патогена *P. alvei B-5247* приведены на рисунке 3.



а – штамм BG9; б – штамм BG21

Рисунок 3 – Антагонистическая активность штаммов *B. asteroides* в отношении патогена *P. alvei B-5247*



Результаты изучения антагонистической активности штаммов BG9 и BG21 *B. asteroides* в отношении возбудителя американского гнильца (*P. alvei* B-5247) (рисунок 3) показали ЗЗР по 12 мм каждый. Полученные данные указывают на среднюю антагонистическую активность штаммов к данному возбудителю.

Полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что штаммы *Bifidobacterium asteroides* BG9, BG21 и BG24 обладают потенциальными пробиотическими свойствами. Это открывает возможности для разработки новых пробиотических продуктов для пчеловодства, которые могут улучшить здоровье пчел, повысить их устойчивость к болезням и, следовательно, увеличить продуктивность пчелиных семей.

Идентификация новых штаммов *Bifidobacterium asteroides* BG9, BG21 и BG24 представляет собой важное достижение, так как эти микроорганизмы могут играть ключевую роль в поддержании здоровья пчел. Учитывая, что такие заболевания пчел, как гафниоз и гнилец, являются серьезными угрозами для пчелиных семей, открытие эффективных антагонистических агентов среди естественной микрофлоры

пчел имеет большое значение для профилактики и лечения этих заболеваний.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение механизмов действия этих штаммов, а также на их применение в различных условиях пчеловодства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования кишечника местных пчел *A. mellifera carnica* были выделены и идентифицированы три штамма *Bifidobacterium asteroides*: BG9, BG21 и BG24. Выделенные штаммы продемонстрировали значительную антагонистическую активность по отношению к возбудителям заболеваний пчел, таких как гафниоз, европейский и американский гнилец. Полученные результаты указывают на перспективность использования данных штаммов в качестве пробиотических культур в пчеловодстве.

Авторы благодарят заведующего лабораторией коллекции микроорганизмов, канд. биол. наук, доцента А.В. Сидоренко и научного сотрудника лаборатории коллекции микроорганизмов А.Д. Герасимович Института микробиологии НАН Беларуси за методическую помощь в выделении и идентификации культур бифидобактерий.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Билаш, Н. Г. Сравнительный анализ белковых заменителей / Н. Г. Билаш // Пчеловодство. – 2003. – № 1. – С. 53–54.
2. Мишуковская, Г. С. Применение пробиотиков для повышения продуктивности темной лесной пчелы бакирской популяции / Г. С. Мишуковская // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. – Уфа : Изд. Гилем, 2015. – С. 193–197.
3. Викуль, С. И. Антибиотики в меде – пути попадания, характеристика и особенности определения / С. И. Викуль // Напої. Технології та інновації. – 2016. – № 1-2. – С. 54–55.
4. Сердюченко, И. В. Количественная оценка микрофлоры пищеварительного тракта пчел до и после зимовки / И. В. Сердюченко // Молодой ученый. – 2017. – № 2. – С. 157–166.
5. Moran, N. A. Genomics of the honey bee microbiome / N. A. Moran // Curr. Opin. Insect Sci. – 2015. – Vol. 10. – P. 22–28.

УДК 619:616-076:619:578.842.1

Laiqing Li, chairman of the board^{1,2,4}
 Huankun Liang, quality manager¹
 Cuicui Chen, project manager^{1,2}
 Tiancai Liu³
 Wenqi Dong⁴

¹Guangzhou Youdi Bio-technology Co., Ltd., Guangzhou, China

²Jinan Laide Bio-technology Co., Ltd., Jinan, China

³School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, China

⁴Guangzhou Zhenda Biopharmaceutical Technology Co., Ltd., Guangzhou, China

DEVELOPMENT OF FLUORESCENCE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY KIT FOR AFRICAN SWINE FEVER VIRUS FAST TESTING

Summary

The continuing spread of African swine fever (ASF) outside Africa in the whole world, has heightened awareness of the threat posed by this devastating disease to the global pig industry and food security. Fast and accurate African swine fever virus (ASFV) detection method is very important for ASF prevention. A double antibody sandwich FICA method was optimized and established, and FICA strips (FICAS) were assembled and then evaluated. The sensitivity of the FICAS kit was 0,044 ng/mL. The recoveries ranged from 102,07 % to 108,60 %, and all CVs were below 7 %. The common pigs infectious disease samples, positive samples and healthy control samples did not lead to false negative and false positives. The kit can be stably stored at 37 °C for 7 days without significant decrease in fluorescence value.

The prepared FICAS kit is rapid, feasible and effective for testing ASFV within 15 min. This study provides a new method for rapidly screening ASFV infection in pigs industry.

Keywords: african swine fever virus, fluorescence immunochromatographic assay, fast testing, kit.

Резюме

Продолжающееся распространение африканской чумы свиней (АЧС) за пределами Африки во всем мире повысило осведомленность об угрозе, которую представляет это разрушительное заболевание для мировой свиноводческой отрасли и продовольственной безопасности. Быстрый и точный метод обнаружения вируса африканской чумы свиней очень важен для профилактики болезни. Метод FICA с двойным сэндвичем антител был оптимизирован и внедрен, а полоски FICA (FICAS) были собраны и затем оценены. Чувствительность набора FICAS составила 0,044 нг/мл. Возвраты варьировались от 102,07 % до 108,60 %, а все CV были ниже 7 %. Обычные образцы инфекционных заболеваний свиней, положительные образцы и здоровые контрольные образцы не привели к ложноотрицательным и ложноположительным результатам. Набор можно стабильно хранить при температуре 37 °C в течение 7 дней без существенного снижения значения флуоресценции.

Подготовленный набор FICAS является быстрым, осуществимым и эффективным способом для тестирования вируса АЧС в течение 15 минут. Это исследование предлагает новый метод быстрого скрининга инфекции вируса АЧС в свиноводстве.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, флуоресцентный иммунохроматографический анализ, быстрое тестирование, набор.

Received by the editor 08.05.2024

INTRODUCTION

African swine fever virus (ASFV) is a double stranded DNA virus, can cause approaching 100 % mortality in domestic pigs, severely threatening the global pig industry [1]. ASFV infection of domestic pigs leads to a lethal hemorrhagic fever, leading to death and virus transmission [2]. This swine disease caused by ASFV infection is called African swine fever (ASF). To date, ASFV has spread

throughout Africa, Asia and Europe [3]. As there is no effective vaccine, surveillance and diagnosis play key roles in ASFV control. However, current technique for the surveillance and diagnosis of ASFV is insufficient and inconvenient. So far, PCR and ELISA are the most commonly used testing method in clinical practice, and more convenient and fast immunological methods are urgently needed [4, 5].

Fluorescence immunochromatographic assay (FICA) is regarded as a promising diagnostic tool for fast testing, and it has been widely used in the detection of pathogens, pesticide residue, biomarkers, etc [6–8]. FICA has many advantages, including rapid test procedure, convenient operational equipment, and low cost testing. In this study, we aim to establish a fast detection method for ASFV antigen using FICA method. At present, we have already prepared P54 recombinant antigen and its paired monoclonal antibodies (MAb) [9]. Using these validated antigen and antibodies, we prepared a fast and accurate FICA kit, meanwhile evaluated its sensitivity, accuracy, specificity and stability.

This study aims to establish a fast detection method for ASFV antigen using fluorescence immunochromatographic assay (FICA).

MATERIALS AND METHODS

Antigen, antibody, reagents and clinical samples

P54 recombinant antigen (*Escherichia coli*) and its paired MAb (3E2 and 4B2) of ASFV were obtained from Guangzhou Youdi Biotechnology Co., Ltd. Europium (III) (Eu^{3+}) labeling kit was purchased from PerkinElmer (Norwalk, USA). The buffers used in this study are all self-prepared. 23 clinical nasal discharge samples with ASFV positive, and 100 healthy oral/nasopharyngeal swab samples came from South China Agricultural University. The positive samples of transmissible gastroenteritis virus (TGEV, 6 cases), porcine respiratory coronavirus (PRCV, 8 cases), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV, 12 cases), and porcine circovirus (PCV, 10 cases) also came from South China Agricultural University. All samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Conjugation of 3E2 antibodies to fluorescent microspheres

The Eu^{3+} fluorescent microspheres were activated by the classical EDC/NHS (1-(3-Dimethylaminyl)-3-ethylenediamine hydrochloride/N-hydroxysuccinimide) method and then coupled with 3E2 antibodies. After centrifugal washing, activated fluorescent microspheres were added into 3E2 antibodies (1 mg), and gently shaken at room temperature for 3 h. Then, blocked (5 % BSA, 1h, at room temperature) the fluorescent microspheres, re-

suspended them in buffer (25 mmol/L Tris-base, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20, pH 7.5), and stored in the dark at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Conjugation of DNP-BSA to fluorescent microspheres was also carried out according to the above steps.

Coating of NC membrane

4B2 antibodies were coated in Test line (T line), and DNP antibodies were coated in control line (C line). Coating was performed by the XYZ3060 3D spraying platform at a spraying speed of $1,0\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}$, and at the concentration of 1 mg/mL and 0,8 mg/mL. After coating, NC membranes were dried in a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ air drying oven for 2 h, and then used for the preparing of FICAS kit.

Preparing of sample pads and bonding pads

3E2 antibodies-fluorescent microspheres conjugates and DNP-BSA-fluorescent microspheres conjugates were dissolved in bonding pads buffer (60 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 % Triton-X100, 0,5 % polyvinyl alcohol, pH 7.4), and then simultaneously coated onto the bonding pads through soaking. After draining, cut them into 6 mm wide strips for the preparing of FICAS kit. The sample pads were soaked in a buffer (20 mmol/L sodium tetraboric acid, 0,2 % sodium casein, 1 % Triton-X100, 0,5 % polyvinyl pyrrolidone, 0,1 % ProClin 300, pH 7.8) for 1 h. After draining, cut them into 18 mm wide strips for the preparing of FICAS kit.

Preparing of FICAS kit

The FICAS consist of 5 component: PVC baseboard, sample pad, bonding pad, NC membrane, and absorbent paper. After pre-treatment, the sample pad, bonding pad, NC membrane and absorbent paper (16 mm) are sequentially fixed on the PVC baseboard, and then the whole board was cut into 3 mm wide strips. The strips were slotted into the plastic cards, sealed and stored in a dark bag. These strips, along with the sample buffer and FICA analyzer, constitute the kit.

Test procedure

After optimization, the test procedure was finally established: Sample dissolved into $100\text{ }\mu\text{L}$ sample buffer, and dropped into the sample well, and then inserts the strip into a FICA analyzer (Youdi, #YDT023). After 15 min, the analyzer will automatically perform the test and calculate the concentration of ASFV antigen, which was calculated using the built-in standard curve (Figure 1).

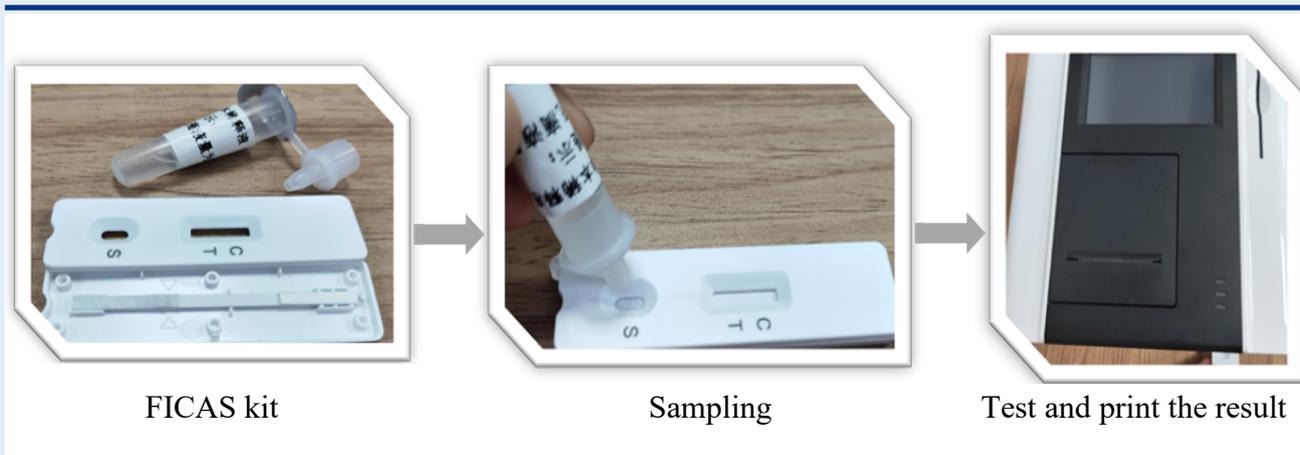


Figure 1 – FICAS kit component and Schematic diagram of test procedure

Reference interval

A total of 100 healthy control samples were used to determinate the reference interval. FICTS kit tested the above samples, and one-sided upper limit of the 95 % reference interval range was calculated using the following formula: $\text{mean} + 1,64SD$.

Sensitivity

The FICAS to detect the serial dilutions of P54 antigen (0, 0,1, 1, 10, 100 and 500 ng/mL), and the concentrations of P54 antigen were plotted as X axis, the ratio of T line' fluorescence values/C line's fluorescence values as the Y axis, performed a linear fit and obtained the standard curve. Three replicates in each concentration. 0 ng/mL was used as a sample for 20 tests, and the 20 T/C values obtained were substituted into the standard curve to calculate the mean and SD. The sensitivity of this FICAS kit is ($\text{mean} + 2*SD$).

Accuracy assay

Dilute P54 antigen to 1 ng/mL, 10 ng/mL, and 500 ng/mL using healthy control swab samples, and test their concentrations using the FICAS kits. Coefficient of variation ($CV, SD/\text{mean} \times 100\%$) and recovery ($((\text{determined concentration} - \text{basal concentration})/\text{spiked concentration} \times 100\%)$) were calculated to evaluate accuracy. Five replicates in each test.

Specificity assay

The positive samples of TGEV, PRCV, PHEV and PCV, 23 positive samples, 100 healthy control samples, as the samples, were tested using these FICAS kits. According to the reference interval, we determined the

negative or positive of these samples and finally obtained the specificity results.

Stability assay

The FICAS and sample buffer were stored at 37 °C for 7 consecutive days. The high, medium and low concentration P54 antigen (1 ng/mL, 100 ng/mL, and 500 ng/mL) as the samples to performed the daily testing, recorded their fluorescence values, and plotted the curves to evaluate the stability of FICAS kit.

Statistical methods

Data were statistically analyzed using SPSS 19.0. All date is shown as the $\text{mean} \pm SD$ or mean. Standard curve was plotted using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Standard curve and sensitivity

The standard curve of the FICAS kit is shown in Figure 2. Curves equation is: $y = 0,1407x + 0,6218$ ($R^2 = 0,9964$), and the curve exhibit a well-defined linear relationships in the 0–500 ng/mL concentration ranges. The calculated sensitivity of the FICAS kit was 0,044 ng/mL.

Reference interval

Normality test confirmed that 100 values belong to normality distribution, and the one-sided upper limit of 95 % reference interval range is 0,051 ng/mL (calculated using: $\text{mean} + 1,64SD$), indicating when the sample concentration measured using this FICTS kit is greater than 0,051 ng/mL, it may be ASFV positive, and when it is below 0,051 ng/mL, it may be ASFV negative.

Accuracy assay

The accuracy of the FICAS kit was evaluated by detecting the healthy control sample that had been added with P54 antigen (1, 10 and 500 ng/mL). As listed in Table 1,

the recoveries of three concentrations ranged from 102,07 % to 108,60 %, and all CVs were below 7 %. The accuracy results indicated that the accuracy of the FICAS kit was high.

Table 1 – Accuracy results of the FICAS kit

Added concentration (ng/mL)	mean±SD	Recovery (%)	CV (%)
1	1,11±0,070	108,60	6,35
10	10,49±0,33	104,72	3,10
500	510,36±4,48	102,07	0,88

Specificity results

Specificity results are presented in Table 2, indicating the common pigs infectious disease samples do not lead to cross-reactivity.

And, 23 positive samples and 100 healthy control samples also did not lead to false negative and false positives. Specificity results means that the FICAS kit had high specificity to ASFV.

Table 2 – Specificity results of the FICAS kit

Interferents	n	Detected concentration	P/N
ASFV	23	43,88±29,53	All P
TGEV	6	0,028±0,012	All N
PRCV	8	0,040±0,0081	All N
PHEV	12	0,030±0,010	All N
PCV	0	0,026±0,0077	All N
Healthy control	100	0,03±0,013	All N

Stability assay

After 7 consecutive days of 37 °C storage, the T line' - and C line' fluorescence values of the the high, medium and low concentration P54 antigen (1 ng/mL, 100 ng/mL, and

500 ng/mL) (Figure 3) has no significantly changes, and their ratio T/C has no markedly changes, indicating that the stability of the FICAS kit is good, the expiration date of this kit is more than 12 months at room temperature.

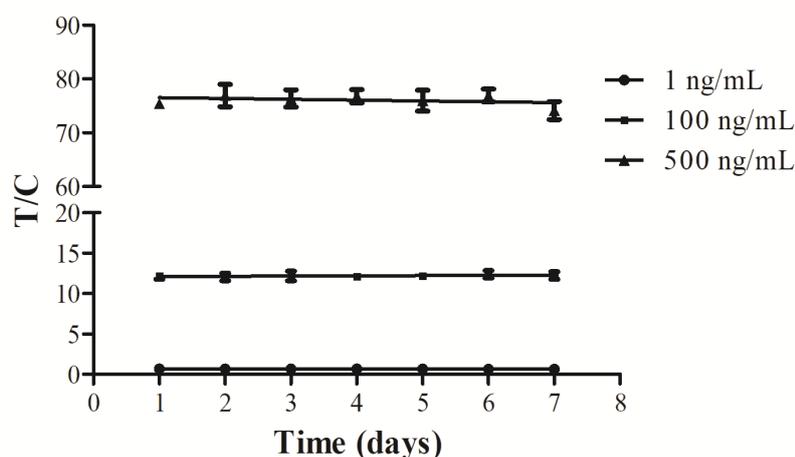


Figure 3 – Stability results of the FICAS kit (7 days, 37 °C). T/C: fluorescence values of T line/fluorescence values of C line

ASF, as a highly contagious disease of pigs, its transmission speed is very fast, so daily monitoring of pig farms at the grassroots level is very necessary. Immunological testing is more suitable for daily monitoring in pig farms due to its simplicity and rapidity. In addition to ELISA method, some new detection technologies are being developed [5, 10, 11]. Li C et al. established a reliable and sensitive suspension microarray technology-based multiplexing method for ASFV antibody detection with a 16-fold improvement in detection sensitivity compared to commercial ELISA kits [5]. Li C et al. prepared a FICTS using the truncated P54 protein as an antigen and Eu-doped fluorescent microspheres as tracers to specifically detect anti-ASFV antibodies [11]. Currently, most commonly used commercial immunological methods are used to detect ASFV antibodies [4, 5, 12]. Differently, our FICAS kit directly detects ASFV pathogens. In this study, we established a double antibody sandwich FICA method and assembled FICAS kit to detect the ASFV pathogen. This rapid, feasible and effective FICAS kit provides more options for rapidly screening ASFV infection in pigs industry.

P54 protein is a main structural protein of ASFV, a 25-kDa polypeptide encoded by the E183L gene. P54 protein is main binding site of serum antibodies and has good immunogenicity. Importantly, antibodies against P54 protein can be detectable early after ASFV infection of domestic pigs [13]. Gallardo C et al. found recombinant ASFV protein P54 is a sensitive and specific target for the detection of antibodies in European and West African domestic pigs and warthogs [14]. Cao Y et al. prepared a strain of mAb against the P54 protein, which could successfully recognize the exogenously expressed P54 protein and the chimeric virus constructed in our laboratory [15]. A FICTS using the truncated P54 protein as an antigen and commercial ELISA kits showed high consistency to specifically detect anti-ASFV antibodies [11]. Similarly, we have also prepared recombinant P54 protein and its mAb, which has been used for the detection of anti-ASFV antibodies [9]. In our this further study, we prepared a FICAS kit using P54 protein and its mAb to detect the

ASFV pathogen, which has high sensitivity, accuracy, specificity and stability, and there was a high degree of specificity/sensitivity with 23 positive samples and 100 healthy control samples.

The performance of the prepared fluorescence probes plays an important role in the sensitivity and stability of the FICA system. Eu³⁺-microspheres are one of the most commonly used fluorescence microspheres in FICA system [16, 17]. The surface of the microspheres is modified with carboxyl groups (-COOH) or streptavidin (-SA), making the formed conjugates more stable [18]. Eu³⁺ nanoparticles-based FICAS has high sensitivity and stability. The FICAS was stable and could be stored for up to one year at room temperature [19]. Research has shown that combining a europium-based ELISA can be applicable to achieve high specificity and sensitivity in an ELISA format [20, 21]. In this study, we chose Eu³⁺ label-microspheres as the fluorescence probes, and also established a high sensitivity, accuracy, specificity and stability FICA method. Our FICAS kit realized the quantitative analysis of ASFV antigen within 15 min, the sensitivity were 0,044 ng/mL with strong specificity, the expiration date of this kit was more than 12 months at room temperature, all recoveries ranged from 102,07 % to 108,60 %, and all CVs were below 7 %. Compared with the sensitivity, specificity, precision of reported time-resolved fluorescence immunoassay method (sensitivity 0.015mg/mL, recovery 92,00 to 103,62 %, CV 5,20 to 11,96 %, detection time 45 min) [22], the FICTS exhibited a comparable detection performance with the additional advantages of the detection time (15 min). Therefore, this Eu³⁺ nanoparticles-based FICAS can be a rapid, feasible and effective method in ASFV screening.

In conclusion, the prepared FICAS kit is rapid, feasible and effective for testing ASFV within 15 min, which may play a great role in serological diagnosis and epidemiological monitoring of ASF in the future. The establishment of this FICA method foreshadows FICA has great implementation promise in detecting animal infectious diseases.

LIST OF SOURCES CITED

1. Galindo I, Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses*. 2017;9(5):103. doi: 10.3390/v9050103.
2. Revilla Y, Pérez-Núñez D, Richt JA. African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches. *Adv Virus Res*. 2018;100:41-74. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.10.002.
3. Li Z, Chen W, Qiu Z, Li Y, Fan J, Wu K, Li X, Zhao M, Ding H, Fan S, Chen J. African Swine Fever Virus: A Review. *Life (Basel)*. 2022 Aug 17;12(8):1255. doi: 10.3390/life12081255. 4.
4. Wang L, Fu D, Tesfagaber W, Li F, Chen W, Zhu Y, Sun E, Wang W, He X, Guo Y, Bu Z, Zhao D. Development of an ELISA Method to Differentiate Animals Infected with Wild-Type African Swine Fever Viruses and Attenuated HLJ/18-7GD Vaccine Candidate. *Viruses*. 2022;14(8):1731. doi: 10.3390/v14081731.
5. Li C, Zou Z, Lv C, Zhao Y, Han P, Sun X, Jin M. Flow cytometry-based multiplexing antibody detection for diagnosis of African swine fever virus. *Anal Chim Acta*. 2022;1225:340244. doi: 10.1016/j.aca.2022.340244.
6. Xu ZH, Liu J, Li B, Wang JK, Zeng X, Chen ZJ, Hongsibsong S, Huang W, Lei HT, Sun YM, Xu ZL. The Simultaneous Determination of Chlorpyrifos-Ethyl and -Methyl with a New Format of Fluorescence-Based Immunochromatographic Assay. *Biosensors (Basel)*. 2022 ;12(11):1006. doi: 10.3390/bios12111006.
7. Xu ZH, Wang JK, Ye QX, Jiang LF, Deng H, Liang JF, Chen RX, Huang W, Lei HT, Xu ZL, Luo L. Highly selective monoclonal antibody-based fluorescence immunochromatographic assay for the detection of fenpropathrin in vegetable and fruit samples. *Anal Chim Acta*. 2023 Mar 15;1246:340898. doi: 10.1016/j.aca.2023.340898.
8. Choi ES, Al Faruque H, Kim JH, Cho JH, Park KM, Kim E. Immunochromatographic assay to detect α -tubulin in urine for the diagnosis of kidney injury. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(1):e23015. doi: 10.1002/jcla.23015.
9. Chen CC, Zhong, SH, Lai HR, et al. Preparation and preliminary application of time-resolved immunofluorescence assay for African swine fever virus antibody. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(3):284-289.
10. Giménez-Lirola LG, Mur L, Rivera B, Mogler M, Sun Y, Lizano S, Goodell C, Harris DL, Rowland RR, Gallardo C, Sánchez-Vizcaino JM, Zimmerman J. Detection of African Swine Fever Virus Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens Using a Recombinant Protein 30 (p30) Dual Matrix Indirect ELISA. *PLoS One*. 2016 Sep 9;11(9):e0161230. doi: 10.1371/journal.pone.0161230.
11. Li C, He X, Yang Y, Gong W, Huang K, Zhang Y, Yang Y, Sun X, Ren W, Zhang Q, Wu X, Zou Z, Jin M. Rapid and visual detection of African swine fever virus antibody by using fluorescent immunochromatography test strip. *Talanta*. 2020;219:121284. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121284.
12. Nah JJ, Kwon OK, Choi JD, Jang SH, Lee HJ, Ahn DG, Lee K, Kang B, Hae-Eun K, Shin YK. Development of an indirect ELISA against African swine fever virus using two recombinant antigens, partial p22 and p30. *J Virol Methods*. 2022v;309:114611. doi: 10.1016/j.jviromet.2022.114611.
13. Rodríguez JM, García-Escudero R, Salas ML, Andrés G. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J Virol*. 2004;78(8):4299-1313. doi: 10.1128/jvi.78.8.4299-4313.2004.
14. Gallardo C, Reis AL, Kalema-Zikusoka G, Malta J, Soler A, Blanco E, Parkhouse RM, Leitão A. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Jul;16(7):1012-20. doi: 10.1128/CVI.00408-08.
15. Cao Y, Han D, Zhang Y, Zhang K, Du N, Tong W, Li G, Zheng H, Liu C, Gao F, Tong G. Identification of one novel epitope targeting p54 protein of African swine fever virus using monoclonal antibody and development of a capable ELISA. *Res Vet Sci*. 2021;141:19-25. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.10.008.
16. Lai XH, Liang RL, Liu TC, Dong ZN, Wu YS, Li LH. A Fluorescence Immunochromatographic Assay Using Europium (III) Chelate Microparticles for Rapid, Quantitative and Sensitive Detection of Creatine Kinase MB. *J Fluoresc*. 2016;26(3):987-96. doi: 10.1007/s10895-016-1786-3.
17. Zou M, Yin Y, Guo L, Zhang Q, Li J, Zhang H, Song Q, Li Z, Wang L, Ao X, Liang X. A Europium Nanosphere-Based Time-Resolved Fluorescent Immunochromatographic Assay for the Rapid Screening of 4,4'-Dinitrocarbanilide: Aiming at Improving Strip Method Performance. *Biosensors (Basel)*. 2023 May 4;13(5):518. doi: 10.3390/bios13050518.
18. Zhou F, Dou C. Rapid detection of dexamethasone in milk by time-resolved fluorescence immunochromatography. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022;22:7331-7338.
19. Xu S, Ma B, Li J, Su W, Xu T, Zhang M. Europium Nanoparticles-Based Fluorescence Immunochromatographic Detection of Three Abused Drugs in Hair. *Toxics*. 2023 Apr 29;11(5):417. doi: 10.3390/toxics11050417.
20. Babaya N, Liu E, Miao D, Li M, Yu L, Eisenbarth GS. Murine high specificity/sensitivity competitive europium insulin autoantibody assay. *Diabetes Technol Ther*. 2009 Apr;11(4):227-33. doi: 10.1089/dia.2008.0072.
21. Haleyur Giri Setty MK, Liu J, Mahtani P, Zhang P, Du B, Ragupathy V, Devadas K, Hewlett IK. Novel Time-Resolved Fluorescence Europium Nanoparticle Immunoassay for Detection of Human Immunodeficiency Virus-1 Group O Viruses Using Microplate and Microchip Platforms. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016 Jun;32(6):612-9. doi: 10.1089/aid.2014.0351.
22. Chen C, Lai H, Liang H, He Y, Guo G, Li L. A New Method for Detection African Swine Fever Virus: Time-resolved Fluorescence Immunoassay. *J Fluoresc*. 2021;31(5):1291-1296. doi: 10.1007/s10895-021-02754-9.

УДК 576.5

Николаевич Л.Н., кандидат биологических наук, доцент**Згировская А.А.**, кандидат биологических наук**Борисовец Д.С.**, кандидат ветеринарных наук, доцент**Осипенко А.Е.**, младший научный сотрудник*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», г. Минск, Республика Беларусь*

ФОРМИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ В КАЧЕСТВЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ПЛАТФОРМЫ (ОБЗОР)

Резюме

В статье проведен обзор отечественной и зарубежной литературы, проанализированы различные методические протоколы формирования сфероидов в зависимости от типа культивируемых клеток и их использование в качестве клеточного субстрата для применения в биологии, медицине и ветеринарии.

Ключевые слова: многоклеточные сфероиды, методы исследований.

Summary

The article reviews domestic and foreign literature and analyses various methodical protocols of formation of spheroids depending on the type of cultivated cells and their use as a cellular substrate for use in biology, medicine and veterinary science.

Keywords: multicellular spheroids, research methods.

Поступила в редакцию 01.04.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Необходимым инструментом исследований в различных областях биологии и медицины является метод культуры клеток *in vitro*, который широко применяется в области биологии рака, фармацевтических и биохимических исследованиях, при разработке персонифицированных подходов в лечении и диагностике, а также создании биоимплантов. Однако используемый метод культивирования клеток в монослое имеет ряд существенных недостатков, таких как отсутствие органотипичности, сокращение межклеточных и отсутствие клеточно-матриксных взаимодействий, а также нарушение метаболических градиентов и т.д. Многие из этих проблем решаются при использовании трехмерных моделей – мультিকлеточных микросфер (сфероидов), которые в наибольшей степени отражают структурную организацию ткани. Кроме того, биохимические, метаболические и сигнальные пути в клетках в составе таких моделей наиболее активны по сравнению с 2D-моделями [1]. Благодаря пространственной структуре клеточные сфероиды гораздо лучше моделируют условия *in vivo*, в том числе прямые клеточные контакты, хими-

ческие сигналы и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом, что обеспечивает для образующих сфероиды клеток лучшую жизнеспособность и сохранение фенотипа, который зачастую утрачивается в клеточной культуре [2].

Ключевую роль в образовании сфероидов, как в эмбриональном развитии, так и в морфогенезе органов, играют молекулы клеточной адгезии. Можно выделить три стадии в процессе формирования сфероидов: на первой стадии клетки расположены рыхло; следующая стадия связана с постепенным накоплением E-кадгерина на поверхности клеток; на третьем этапе возникают кадгерин-кадгериновые межклеточные контакты и образуется плотный агрегат в форме сфероида [3]. Сфероиды – это плотно упакованные агрегаты клеток шарообразной формы [2]. Отличительными особенностями сфероидов являются сложная внутренняя структура, отражающая все виды межклеточных контактов, а также взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом; возможность формирования из разных типов клеток; способность к слиянию и образованию тканевых конструкций (матриц).

Первые упоминания о сфероидедах как об округлых многоклеточных микроагрегатах, формируемых опухолевыми клетками, относятся к 1971 г. [2]. Однако свое настоящее рождение сфероиды получили в конце XX – начале XXI века, после того, как, с одной стороны, к ученым пришло понимание, что трехмерная микросреда влияет на восприятие и интерпретацию клетками биохимических сигналов, что, в свою очередь, определяет тканевую и органную специфичность [3, 4], а с другой стороны, началось бурное развитие тканевой инженерии [5, 6]. В настоящее время сфероиды занимают прочное место в различных областях биологии и медицины, и с каждым годом спектр вопросов, для ответов на которые используются сфероиды, становится шире. Наиболее хорошо изученной областью применения сфероидов является регенеративная медицина [7]. Многими авторами научно обоснована эффективность использования сфероидов при восстановлении хряща [8], нервной ткани [9], костной ткани [10], пародонта [11], регенерации волосяных фолликулов [12], ускорении заживления кожных ран [13], лечения возрастной макулярной дегенерации [14]. Второй обширной, но гораздо менее изученной областью применения сфероидов является тканевая инженерия. Способность сфероидов к слиянию при непосредственном контакте друг с другом позволяет использовать их в качестве строительных блоков для создания более сложных структур [1]. Сформированные тканеинженерные конструкты могут быть эффективно использованы для различных целей биомедицины, таких как моделирование заболеваний, тестирование лекарственных и косметических средств, трансплантация конструктов взамен утраченных органов и тканей [15]. Использование сфероидов в качестве строительных блоков для тканевой инженерии является многообещающим направлением, требующим, с одной стороны, развития методов биофабрикации, а с другой – наличия систематического анализа биологических свойств сфероидов из различных типов клеток.

Еще одной областью внедрения сфероидов как перспективных исследовательских моделей является фармакология [16, 17]. Сфероиды используются для тестирования лекарственных соединений, исследования динамики их накопления в клетках,

анализа их цитотоксичности [18, 19]. Сфероиды, сформированные из опухолевых клеток, дополнительно применяются для оценки эффективности различных методов воздействия на опухоли [20]. Обсуждая очевидную перспективность использования сфероидов в качестве 3D-моделей в фармакологии, необходимо отметить, что полученные результаты в значительной степени зависят от множества факторов, включающих в себя морфометрические и морфологические характеристики используемых сфероидов и условия их культивирования. В связи с этим работы, направленные на развитие стандартизированных методов тестирования препаратов на сфероидедах, включая изучение взаимосвязи между биологическими свойствами сфероидов и наблюдаемой активностью лекарственных соединений, обладают несомненной актуальностью. В работе Szot C.S. et al. [21] были проведены сравнительные исследования свойств опухолевых клеток в монослое, 2D- и 3D-культурах после терапевтического воздействия противоопухолевыми лекарственными препаратами. Было установлено, что для подавления роста сфероидов требовались в 60 и более раз большие концентрации таких препаратов, как доцетаксел, цисплатин, гемцитабин, 5-флуороурацил, камптотецин, чем для клеток в монослое. Кроме того, при выявлении клеток в состоянии апоптоза (по экспрессии активированной каспазы-3) зафиксировано их меньшее количество в 3D-системе (в 2 и 2,5 раза для 5-флуороурацила и камптотецина соответственно), чем в монослойной культуре [21].

Данные, полученные авторами в работе [22], свидетельствуют о существенных отличиях между самими опухолевыми клетками в условиях монослоя и трехмерной культуры, где они связаны с экстраклеточным матриксом. Такая связь опухолевых клеток в 3D-моделях обуславливает их повышенную лекарственную устойчивость по сравнению с 2D-культурами, что свидетельствует о большей адекватности 3D-модели роста реальным условиям прогрессии опухоли в организме [22].

Метод получения трехмерных клеточных сфероидов, по мнению многих авторов [19–23], является универсальным инструментом для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соедине-

ний *in vitro*. В работе Л.Б. Даниловой с соавторами при сравнении 2D- и 3D-клеточных культур выявлены существенные различия между клетками, формирующими сфероиды, а именно клетки образуют особую микросреду с отличающимися от двумерных структур характеристиками (значением pH, наличием и концентрацией аутокринных факторов, концентрацией кислорода и CO₂). При этом клетки в таком микроокружении обладают своей морфологией, способностью к дифференцировке и пролиферации, а также реакцией на различные стимулы, тем самым имитируя поведение *in vivo*. Эти свойства клеток в сфероиде важны для исследования действия различных препаратов, так как созданная микросреда ограничивает их проникновение, поэтому для достижения желаемого эффекта требуется увеличенная концентрация вещества [23, 24].

Несмотря на постоянно растущее количество работ, посвященных изучению сфероидов, данные об их биологических свойствах до сих пор очень разрозненны, так как получены разными научными группами на сфероидах различного размера и срока культивирования, что делает невозможным их сравнение между собой. Оригинальные статьи и обзоры, в которых бы проводилось стандартизированное сопоставление свойств сфероидов из разных типов клеток и выявление закономерностей их динамического поведения, отсутствуют.

Преимущества сфероидов как 3D-моделей для целей фармакологии и биомедицины уже ни у кого не вызывают сомнений [17]. Тем не менее данное направление содержит много проблем и открытых вопросов, наиболее значимый из которых – вопрос размера используемых сфероидов. Известно, что максимальное расстояние, на которое возможно проникновение кислорода и питательных веществ за счет пассивной диффузии в невакуляризованных тканях, составляет 100–200 мкм [25]. Из этого вытекает несколько важных следствий. Во-первых, с одной стороны, сфероиды с диаметром более 300–400 мкм могут содержать некротическую зону в центре [26], а с другой – короткий гипоксический стресс может оказывать стимулирующее воздействие на клетки, например активировать потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [27]. Во-вто-

рых, проникновение лекарственных препаратов в сфероиды большого диаметра ограничено внешними слоями клеток [28]. Во-вторых, гипоксия в центре сфероидов приводит к изменению pH среды, что влияет на активность pH-зависимых соединений [28]. Все эти факты необходимо учитывать при тестировании лекарственных соединений и интерпретации полученных результатов.

Таким образом, на основании всего вышеизложенного очевидно, что сфероиды являются перспективной моделью, подходящей как для фундаментальных исследований, так и для применения в различных областях биологии, медицины и ветеринарии.

В современной литературе описано множество способов формирования сфероидов из тех или иных типов клеток, и все они имеют общие этапы и принципы. Сфероиды получают из клеток, культивируемых предварительно в виде монослоя или суспензии. Клетки из первичного материала опухоли получают по стандартным методикам выделения клеток. Полную ростовую среду подбирают в зависимости от типа культивируемых клеток [7–10].

Основные методические подходы формирования клеточных сфероидов

1. Использование низкоадгезивной посуды. Самая популярная и удобная технология производства сфероидов основана на размещении клеток на поверхности с низкими адгезивными свойствами [7, 13]. Это могут быть микропланшеты с низкой адгезией и U-образным дном (например NunclonSphera) [3], агарозные планшеты, полученные с помощью специальных форм (3D PetriDishes, Microtissue, США) [7], либо обычная посуда, дно которой покрыто раствором агарозы [6, 7, 10]. В одном из возможных вариантов данной технологии из гидрогеля, чаще всего агарозы, создаются формы, в которые затем помещается суспензия клеток. Под действием силы тяжести клетки оседают на дно форм. Клетки не могут прикрепиться к неадгезивной поверхности, поэтому они вынуждены плотно взаимодействовать друг с другом и образовывать сфероиды. Принцип их использования сводится к высеванию клеток в оптимальной для конкретной линии концентрации в полную ростовую среду и культивации в CO₂ инкубаторе при темпе-

ратуре 37 °С и 5 % CO₂. Посевная плотность клеток сильно варьирует в зависимости от типа клеток и конкретной методики. Показано, что наивысшая плотность и округлость сфероидов из клеток линии HepG2 наблюдается при плотности посева 3000 клеток на лунку. Более высокая плотность посева приводила к неоднородным клеточным агрегатам, а также неблагоприятным изменениям формы и размера [19].

2. Формирование сфероидов в системе «висячая капля». Классический вариант метода висячей капли – простой и дешевый способ формирования сфероидов, не требующий покупки специального культурального пластика или реактивов. Суспензия клеток наносится в виде капель объемом 20–25 мкл на перевернутую крышку чашки Петри, после чего крышка переворачивается и аккуратно надевается на чашку Петри [17, 18]. Под действием силы тяжести клетки оседают на дно капель и формируют сфероиды. В каждой капле таким образом образуется по одному сфероиду. Данный метод позволяет четко контролировать количество клеток в каждой капле, а также получать сфероиды, состоящие из нескольких типов клеток. Однако в классическом варианте метод висячей капли является очень трудоемким, его невозможно автоматизировать и масштабировать [1, 14].

3. Микрокапсулированные опухолевые сфероиды. Метод основан на заключении клеточной суспензии в полупроницаемые альгинат-хитозановые микрокапсулы, которые в дальнейшем культивируются в виде суспензии в обычной полной ростовой среде и стандартных условиях [16]. Данный метод позволяет легко получать в достаточно большом количестве микрокапсулированные мультিকлеточные опухолевые сфероиды заданного диаметра с узким распределением по размерам. При этом можно получать сфероиды, состоящие из клеток, которые в суспензионной культуре вообще не способны формировать мультиклеточные агрегаты, следовательно, из них невозможно получить опухолевые сфероиды без микрокапсулирования. Кроме того, предложенный метод с использованием микрокапсулирования может позволить осуществлять совместное культивирование раковых клеток с другими типами клеток (фибробласты, эпителиальные клетки, макрофаги и др.) для получения более адекватной мо-

дели малых солидных опухолей *in vivo* по сравнению с классическими сфероидными [16]. Недостатками метода являются его сложность и необходимость наличия специальных реагентов и оборудования.

4. Формирование мультиклеточных микросфер с использованием цикло-RGDfK (TRP) пептида. В современной литературе большое внимание уделяется новому методу формирования сфероидов опухолевых клеток с использованием цикло-RGDfK (TRP) пептида. Данные литературных источников свидетельствуют о том, что синтетические циклические RGD-пептиды могут имитировать природные белки, найденные во внеклеточном матриксе, для облегчения формирования трехмерной модели опухоли [17]. Пептид RGDfK способствует самосборке раковых клеток без поверхностной адгезии на клеточной пластинке [18].

5. Метод культивирования в полужидкой среде. Этот метод используют для предотвращения неспецифической агрегации клеток и получения сфероидов – потомков одной клетки [19]. Методика аналогична описанной выше методике формирования сфероидов на низкоадгезивной посуде. Отличие состоит в том, что в полную ростовую среду добавляют 1 % метилцеллюлозы и клетки высевают в низкой концентрации (2300 клеток/мл) [20]. Метилцеллюлоза – это разновидность длинноцепочечных полисахаридов, которые могут способствовать образованию компактной сетки в жидкой суспензионной среде, ограничивающей движение отдельных клеток, но при этом достаточно мягкие, чтобы обеспечить формирование колоний [24]. Кроме того, разработаны разнообразные гели для удобства культивирования сфероидов, такие как GrowDex или Matrigel.

Методические подходы исследования мультиклеточных сфероидов и клеток, диссоциированных из сфероида

Сформированные сфероиды для удобства их визуализации переносят на посуду с обычным (адгезивным) покрытием на 24 ч, что позволяет оценить морфологию диссоциированных из сфероида клеток [25]. В некоторых случаях фиксация сфероидов проводится с использованием 10%-ного формалина [8], 4%-ного параформальдегида [10] и других методов, используемых также для культуры клеток. В

случае формирования микросфер в полужидкой среде для выделения сфероидов используются специальные растворители в соответствии с инструкцией к гелеобразующему препарату. Изучение состояния цельных клеточных сфероидов проводят по следующим критериям: 1) скорость образования сфероидов в динамике; 2) индекс эффективности сфероидообразования [26]; 3) оценка размеров сфероидов с помощью фотографирования [27]; 4) оценка цитотоксичности по относительной жизнеспособности клеток; 5) расчет коэффициента формы, описывающей сферичность агрегатов [30]; 6) морфология клеток, составляющих сфероид [29].

Для анализа клеток, составляющих мультиклеточный сфероид, используются те же методы, что и для обычной культуры клеток. В литературе описаны такие методы, как иммунофенотипический анализ поверхностных CD-маркеров с использованием проточной цитофлуориметрии и анализ жизнеспособности клеток методом МТТ-теста. Однако рядом авторов установлено, что клетки в составе трехмерной структуры значительно отличаются от клеток, культивируемых в монослое, не только по форме, но и интенсивностью пролиферации, устойчивостью к воздействию на них различных препаратов, уровнем дифференциации, а также экспрессией различных генов (фенотипически) [22–25]. Для диссоциации клеток из сфероида исполь-

зуют раствор аккутазы либо 0,05%-ный трипсин и ЭДТА. Изучают пролиферативную активность клеток, формирующих сфероиды. Индекс пролиферации рассчитывают как отношение числа клеток, составляющих клеточные сфероиды в данный момент, к исходному числу клеток. Исходным считают число клеток в сфероидах, образовавшихся через 18–20 ч после перевода монослойной культуры в 3D-условия и состоявших из плотно упакованных клеток. Анализ пролиферативной активности проводят через 24 и 48 ч после образования сфероидов [22, 29]. Также анализируют клоногенную выживаемость и частоту апоптотических клеток, выделенных из сфероидов методом проточной цитометрии [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивирование клеток в 3D-формате является современным и обоснованным методом исследований *in vitro*. Гибкость и разнообразие методик позволяют подобрать оптимальные протоколы для любых исследований в культуре клеток, а биологическая структура мультиклеточных сфероидов обеспечивает максимальное приближение к исследованиям *in vivo* за счет обеспечения межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, а также приближения метаболического градиента к естественному для органной структуры.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Organ printing: Tissue spheroids as building blocks* / V. Mironov [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30, № 12. – P. 2164–2174.
2. *Создание трехмерных клеточных моделей для решения теоретических и практических задач современной онкологии* / Е. А. Просекин [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2019. – Т. 65, № 5. – С. 629–637.
3. *Способ получения сфероидов клеток НераRG в среде без диметилсульфоксида* : пат. RU 2661105 / Д. А. Сахаров, О. А. Бурмистрова, А. Г. Тоневицкий. – Оpubл. 21.01.2016.
4. *Формирование мультиклеточных сфероидов в культурах клеток надпочечников поросят разного возраста* / Е. М. Ушакова [и др.] // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2018. – Вип. 1, т. 1 (142). – С. 79–83.
5. *Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering* / V. Mironov [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, № 4. – P. 157–161.
6. *Engineering biological structures of prescribed shaped using self-assembling multicellular systems* / K. Jakab [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol. 101, № 9. – P. 2864–2869.
7. *The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications* / S. J. Chae [et al.] // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11, № 14. – P. 6818–6832.
8. *One-year clinical and radiological results of a prospective, investigator-initiated trial examining a novel, purely autologous 3-Dimensional autologous chondrocyte transplantation product in the knee* / S. Fickert [et al.] // *Cartilage*. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 27–42.

9. Tseng, T. C. *Substrate-mediated nanoparticle/gene delivery to MSC spheroids and their applications in peripheral nerve regeneration* / T. C. Tseng, S. hui Hsu // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, № 9. – P. 2630–2641.
10. *Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids* / H. Suenaga [et al.] // *J Mater Sci Mater Med*. – 2015. – Vol. 26, № 11. – P. 254.
11. *Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration* / K. Sano [et al.] // *Regen Ther*. – 2020. – Vol. 14. – P. 59–71.
12. *Scalable production of controllable dermal papilla spheroids on PVA surfaces and the effects of spheroid size on hair follicle regeneration* / Y. C. Huang [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34, № 2. – P. 442–451.
13. *Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing* / J. M. Santos [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 90.
14. *Первый опыт трансплантации 3D-сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте* / С. А. Борзенко [и др.] // *Офтальмохирургия*. – 2019. – Vol. 1. – P. 27–32.
15. *Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues* / E. Fennema [et al.] // *Trends Biotechnol*. – 2013. – Vol. 31, № 2. – P. 108–115.
16. *Underhill, G. H. Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies* / G. H. Underhill, S. R. Khetani // *CMGH*. – 2018. – Vol. 5, № 3. – P. 426–439.
17. *Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine* / Z. Gilazieva [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 2727.
18. *Han, S. J. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase* / S. J. Han, S. Kwon, K. S. Kim // *Cancer Cell Int*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 152.
19. *Сфероиды НЕК2-положительной аденокарциномы молочной железы человека как модель для тестирования противоопухолевых иммунотоксинов* / И. В. Балалаева [et al.] // *Acta Naturae*. – 2017. – Vol. 9, № 1 (32). – P. 40–46.
20. *Fabrication and evaluation of nanocontainers for lipophilic anticancer drug delivery in 3D in vitro model* / T. Borodina [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2021. – Vol. 109, № 4. – P. 527–537.
21. *3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels* / C. S. Szot [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 7905–7912.
22. *Elliott, N. T. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies* / N. T. Elliott, F. Yuan // *J Pharm. Sci*. – 2011. – Vol. 100. – P. 59–74.
23. *Метод получения трехмерных клеточных сфероидов: универсальный инструмент для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соединений in vitro* / А. С. Согомонян [и др.] // *ACTA NATURAE*, 2022. – Т. 14, № 1 (52). – С. 92–100.
24. *Данилова, А. Б. Оценка эффективности использования тумороидов для индивидуального подбора лекарственной терапии солидных опухолей* / А. Б. Данилова [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 815–828.
25. *Foty, R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids* / R. Foty // *J Vis Exp*. – 2011. – № 51. – P. 2720.
26. *Engineering vascularized tissue* / R. K. Jain [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2005. – Vol. 23, № 7. – P. 821–823.
27. *Optical coherence tomography detects necrotic regions and volumetrically quantifies multicellular tumor spheroids* / Y. Huang [et al.] // *Cancer Res*. – 2017. – Vol. 77, № 21. – P. 6011–6020.
28. *Андреева, Е. Р. Гипоксический стресс как индуктор активации потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток* / Е. Р. Андреева, М. В. Погодина, Л. Б. Буравкова // *Физиология человека*. – 2015. – Т. 41, № 2. – P. 123–129.
29. *Данилова, А. Б. Разработка и характеристика трехмерных клеточных моделей для индивидуализации лечения онкологических больных* / А. Б. Данилова, Е. А. Нехаева, Н. А. Ефремова // *Сибирский онкологический журнал*. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 58–74.
30. *Микрокапсулированные мультиклеточные опухолевые сфероиды: получение и использование в качестве модели in vitro для тестирования лекарств* / А. М. Цой [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2010. – Т. 56, вып. 6. – С. 674–685.

УДК 619:617.636.087.72:636.2

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Василевич И.Б., научный сотрудник²
Волотовский И.Д., доктор биологических наук, академик²
Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент³
Борисик Р.Н., ассистент⁴
Руколь В.М., доктор ветеринарных наук, профессор⁴
Стрельченя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент⁵

¹БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

³РУП «Опытная научная станция по птицеводству», г. Заславль, Республика Беларусь

⁴УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

⁵РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск, Республика Беларусь

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ТЕРАПИИ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН ПАЛЬЦЕВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Резюме

Изучено влияние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крупного рогатого скота (МСК ЖТ КРС) на микрофлору, обуславливающую гнойно-некротические поражения пальцев у коров.

Полученные результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что введение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в схему лечения инфицированных ран пальцев наиболее эффективно уменьшает количество микроорганизмов в патологических очагах.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, микрофлора, трансплантация клеток, раны пальцев и копытец крупного рогатого скота.

Summary

The effect of mesenchymal stem cells of bovine adipose tissue on the microflora causing purulent necrotic lesions of the fingers in cows has been studied.

The obtained results of clinical studies indicate that the introduction of mesenchymal adipose tissue stem cells into the treatment regimen for infected finger wounds most effectively reduces the number of microorganisms in pathological foci.

Keywords: mesenchymal stem cells, microflora, cell transplantation, wounds of fingers and hooves in cattle.

Поступила в редакцию 25.04.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в Республике Беларусь уже практически сформировано новое крупное товарное агропромышленное производство. Преобразования в АПК предполагают создание крупных агропромышленных агрокомбинатов. Для успешной и эффективной работы на предприятиях молочного направления (фермах и комплексах) необходимо учитывать физиологические особенности крупного рогатого скота при различных системах содержания [4, 8, 12].

Применение новых технологий содержания крупного рогатого скота молоч-

ного направления в помещениях с беспривязным боксовым содержанием при механизации основных производственных процессов приводит к увеличению количества животных с клиническими признаками хромоты и распространению болезней конечностей, в частности повреждений копытец. Различные изменения со стороны рога копытец влияют не только на здоровье крупного рогатого скота, но и на его поведение. Для облегчения и усиления работы по профилактике и лечению болезней конечностей КРС разработаны обязательные требования, которые нашли отражение в республиканском регламенте

«Организационно-технологические требования при производстве молока на молочных комплексах промышленного типа», одобренном Постановлением коллегии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 4 июня 2018 г. № 16 [12, 13].

В Республике Беларусь, согласно последним исследованиям, гнойные и гнойно-некротические поражения конечностей КРС наблюдаются у 14–60 % животных от общего поголовья. Возникновение патологий конечностей происходит в зависимости от породы, возраста животных, времени года, условий и системы содержания [1, 2, 4, 10, 13]. По мнению Dolcheck K.A. et al., заболевания копытцев встречаются даже в высокоразвитых странах. В частности, сообщается о том, что 90 % молочных тёлочек в доильных залах имеют заболевания копытцев, спровоцированные передвижением животных с пастбищ на твёрдые покрытия доильных площадок [21, 22].

Лечение болезней копытцев крупного рогатого скота начинается с санации и терапии, направленной на заживление гнойно-некротического очага поражения (расчистка копытцевого рога, использование антибактериальных, пробиотических препаратов и др.), снятие воспалительной реакции и болевого синдрома, а также повышение резистентности организма (стимулирующая, заместительная, симптоматическая терапия) [2, 4, 17, 18]. Однако при недостаточной эффективности первоначального этапа лечения развиваются системные осложнения, так как в ране накапливаются продукты некроза, сгустки фибрина, являющиеся питательной средой для микроорганизмов, в борьбе с которыми требуется применение антибактериальных препаратов. Как известно, широкое применение антибиотиков сопровождается распространением резистентных к антибиотикам микроорганизмов, что остается одной из самых непростых и актуальных проблем ветеринарной медицины [10, 12, 20, 25].

Новые методы терапии должны быть направлены на увеличение эффективности лечения, снижение случаев рецидивов болезней, сокращение сроков выздоровления, уменьшение стоимости лечения, фармакологической нагрузки на организм

и сохранение качества мяса и молока животных, а также снижение периода каренции [18, 19, 23].

Все большую популярность в ветеринарной практике набирает клеточная терапия. Высокий терапевтический потенциал МСК ЖТ в лечении гнойно-некротических поражений нижнего отдела конечностей крупного рогатого скота основывается на способности МСК обуславливать антибактериальный, противовоспалительный и регенеративный эффект [6, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 18, 19, 23].

Использование клеточных технологий может являться одним из наиболее перспективных подходов в решении проблем лечения хирургических болезней крупного рогатого скота, в том числе пальцев и копытцев животных. Эффективность и безопасность применения МСК подтверждена многочисленными литературными данными и работами белорусских ученых, разработавших на данный момент более 15 клеточных технологий лечения различных болезней животных и человека [3, 5, 8, 10, 11].

Клеточная технология на основе МСК может являться одним из перспективных подходов в терапии и профилактике болезней незаразной этиологии, а также инфицированных ран [3, 6, 8, 14, 18].

Цель настоящих исследований – провести оценку клеточной технологии с применением мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении инфицированных ран в области пальцев крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения испытаний мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крупного рогатого скота сотрудники ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» предоставили культуру мезенхимальных стволовых клеток с аналитическим паспортом. МСК ЖТ КРС представляли собой стерильную бесцветную опалесцирующую жидкость со взвесью клеток на физиологическом растворе.

В условиях животноводческих хозяйств республики проведена сравнительная оценка клеточной и стандартной терапии по эффективности действия на микроорганизмы, присутствующие в инфицированных ранах в области пальцев.

Лабораторные методы включали в себя качественное и количественное изучение микрофлоры в области пальцев в динамике (до и после лечения).

Численность микроорганизмов (количественный состав) в ране проводили методом определения численности бактерий в 1 г ткани с последующей микроскопией. Первичное выделение культур микроорганизмов, находящихся на поверхности раны, проводили классическими методами, используя метод микроскопии препаратов-отпечатков из места локализации патологического процесса, окрашенных по Романовскому-Гимза, посевы на селективные среды, а идентификацию микроорганизмов проводили на автоматической системе, обеспечивающей идентификацию микроорганизмов, Vitek 2-compat с использованием программного обеспечения Windows. Для изготовления препаратов-отпечатков рану очищали стерильным ватно-марлевым тампоном и стерильным предметным стеклом прикасались к месту исследования. Препарат высушивали и фиксировали путем погружения в метиловый спирт при экспозиции 15 мин. После окрашивания исследовали методом световой микроскопии, используя инвертированный микроскоп Nikon ECLIPSE TS 100 (Япония).

Для определения качественного состава микробных возбудителей было сформировано 2 группы, опытная и контрольная, по 10 коров в каждой с инфицированными ранами в дистальной области конечностей.

Животным контрольной группы проводилась терапия инфицированных ран в области пальцев по стандартной схеме, применяемой в хозяйстве, с использованием антибактериальной, симптоматической и заместительной терапии.

Материал от больных животных с соблюдением правил асептики и антисептики был отобран одноразовым стерильным зондом с тампоном в пробирке. При взятии пробы пробирку открывали, тампон пропитывали экссудатом из патологического очага и помещали в пробирку. Полученный материал высевали на кровяной агар, мясо-пептонный агар (МПА), агар Сабуро, среда Эндо, мясо-пептонный бульон (МПБ).

Перед лечением коров опытной и контрольной групп нами была проведена механическая очистка пальцев и функциональная расчистка копыт, а далее – санация раневого очага по принципу асептики и антисептики. Рану осушали стерильными салфетками. В дальнейшем проведена хирургическая обработка раны и наложение защитной бинтовой влагоустойчивой фиксирующей повязки. В опытной группе было исключено дополнительное лечение с применением антибактериальных средств.

В опытной группе коров дополнительно в область локализации инфицированных ран вводили мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани. Клеточный препарат вводили инъекционно в виде суспензии на физиологическом растворе в область свода кожи межпальцевой щели, как можно ближе к области раневого дефекта, в дозе 4,0 мл с концентрацией клеток $2,5 \times 10^6$. Препарат применялся однократно.

Все животные, участвующие в опыте, содержались в одинаковых условиях, и за ними велось клиническое наблюдение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При бактериологическом исследовании смывов отмечен рост микроорганизмов на средах МПБ и МПА, кровяном агаре, среде Эндо, при этом на агаре Сабуро рост микроорганизмов отсутствовал.

При микроскопическом исследовании препаратов-отпечатков, взятых с поверхности патологического процесса после асептики и антисептики пораженного участка до применяемого лечения у животных опытной и контрольной групп, обнаруживались различные микроорганизмы в ассоциации, преимущественно короткие, длиной 2–3 и диаметром 0,5–0,8 мкм, грамтрицательные палочки, не образующие спор и капсул, а также шаровидные микроорганизмы диаметром 1,0–1,5 мкм, располагающиеся одиночно, попарно и гроздьями, которые спор не образуют, однако образуют капсулу, по Граму окрашиваются положительно.

При исследовании навески гомогената под микроскопом было обнаружено от 3 до 5 бактерий, значит, в 1 г ткани биоптата раневого дефекта содержалось более 10^5 – 10^6 бактерий. На 14-е сутки при повторном изготовлении препаратов-отпе-

чатков у коров, которым вводились стволовые клетки, количество микробов значительно уменьшилось, что подтвердилось исследованием биоптата тканей. При осмотре под микроскопом в навеске биоптата отсутствовали бактерии, из чего следует, что в 1 г ткани содержалось 10^5 бактерий или меньше, тогда как у животных контрольной группы в ране на 14-е сутки было более 10^5 бактерий.

После выделения чистых культур микроорганизмов их идентификацию провели на автоматической системе Vitek 2-compact.

На плотных питательных средах (кровяной агар, МПА) наблюдали характерный рост колоний размером 1,0–4,0 мм округлой, слегка выпуклой формы с ровными краями и влажной глянцевой поверхностью. Цвет колоний был эмалево-белый и золотистый. На МПБ наблюдался характерный рост с помутнением среды, обильным осадком и серовато-белой пленкой. Таким образом, на МПА изолирован эпидермальный (*Staphylococcus epidermidis*) и золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) (рисунок 1).



Рисунок 1 – Культуральные свойства микроорганизмов рода *Staphylococcus* на МПА



Рисунок 2 – Культуральные свойства микроорганизмов рода *Escherichia*

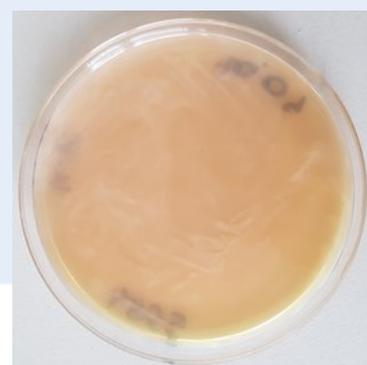


Рисунок 3 – Культуральные свойства микроорганизмов рода *Proteus*

При бактериологическом исследовании одновременно со стафилококками выделяли и кишечную палочку (*Escherichia coli*).

При микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму, обнаруживали грамотрицательные единично располагающиеся палочки. На МПА через 24 ч появлялись сочные круглые, с ровными краями и гладкой поверхностью (S-формы) серо-белого цвета колонии, на среде Эндо – малиновые круглые, гладкие, с металлическим блеском колонии диаметром 2,0–3,0 мм со слегка приподнятой в центре поверхностью (рисунок 2).

На МПБ – интенсивное помутнение среды и наличие незначительного осадка, легко разбивающегося при встряхивании (*E. coli*).

При культивировании на МПА и МПБ обнаруживали микроорганизмы, которые давали рост, присутствовал неприятный гнилостный запах. На МПА наблюдался рост микроорганизмов без образования отдельных колоний с наличием вуалеобразного налета (рисунок 3).

Обобщенные и проанализированные данные, полученные при изучении микроорганизмов из инфицированных ран области пальцев крупного рогатого скота, представлены в таблице.

Таблица – Результаты выделения микрофлоры от коров с инфицированными ранами в области пальцев

Вид микроорганизма	Количество выделенных культур	Процент выделяемости, %
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14	70
<i>Proteus vulgaris</i>	12	60
<i>Escherichia coli</i>	16	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	90

Из данных таблицы видно, что при инфицированных ранах в дистальных отделах конечностей у коров наиболее часто выявляются микроорганизмы *Staphylococcus aureus* (90 %), *Escherichia coli* (80 %), *Staphylococcus epidermidis* (70 %), *Proteus vulgaris* (60 %). Другие виды микроорганизмов составляли менее 6 % в отобранном экссудате.

При проведении клинических исследований нами было установлено, что в результате лечения животных опытной группы с применением мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, начиная с третьих суток, отмечено улучшение общего состояния. При осмотре раневого дефекта было установлено уменьшение отечности ткани и снижение болезненности. К 7–10-м суткам размеры раневого дефекта значительно уменьшились, раны заполнились грануляционной тканью, а по краям раны наблюдали рост эпидермального ободка или образование струпа. Животные уверенно опирались на пораженную конечность. Защитная повязка не накладывалась. На 13–14-е сутки у 3 коров при визуальном осмотре поверхность раны была заполнена здоровой грануляционной тканью, у 7 животных на месте инфицированных ран наблюдалось образование струпа. Полное клиническое выздоровление наступило в среднем на 15–17-е сутки.

В результате лечения животных контрольной группы при осмотре через 5–7 дней после начала лечения общее состояние было удовлетворительным. У всех животных сохранялась болезненность и отечность, 3 коровы двигались неохотно и практически не наступали на пораженную конечность. Поверхность раны немного подсохла, сохранялась кровоточивость. К 7–10-м суткам размеры раневого дефекта уменьшились незначительно, раны медленно заполнялись грануляционной тканью, рост эпидермального ободка по краям раны происходил медленно. К 13–14-м суткам большая часть раны заполнена грануляционной тканью и частично покрыта струпом. Местные изменения характеризовались уменьшением болезненности и отечности

тканей. На 15–17-е сутки при визуальном осмотре поверхность раны была заполнена грануляционной тканью и покрыта струпом. Полное клиническое выздоровление у коров наступило в среднем на 20–23-и сутки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественная оценка микрофлоры из инфицированных ран в области пальцев крупного рогатого скота опытной и контрольной групп показала, что до начала терапии в раневых очагах обнаруживалось более 10^5 – 10^6 бактерий. На 10-е сутки у коров опытной группы в смывах препаратов-отпечатков микроорганизмы отсутствовали, что подтверждалось исследованием биоптата тканей под микроскопом, тогда как у животных контрольной группы в ране на 10-е сутки по-прежнему обнаруживалось не менее 10^5 бактерий. Таким образом, было установлено, что применение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крупного рогатого скота в комплексной схеме лечения более эффективно уменьшает количество микроорганизмов в патологических очагах.

При клиническом исследовании было установлено, что применение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении крупного рогатого скота с инфицированными ранами позволяет сократить сроки лечения животных в среднем на 5–6 суток.

В результате данного исследования установлено, в частности, что применение мезенхимальных стволовых клеток может быть альтернативой использованию антибиотиков в животноводстве, которые вызывают известные негативные последствия, связанные прежде всего с появлением устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов, встречающихся как у животных, так и человека. Изложенные в данной статье результаты также представляют собой опыт применения МСК в лечении заболеваний дистального отдела конечностей крупного рогатого скота и будут использованы при разработке схем лечения животных с инфицированными ранами.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Ветеринарная ортопедия: учебник для среднего профессионального образования / А. А. Стекольников [и др.]. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : Юрайт, 2019. – 292 с.*

2. Волотко, И. И. Профилактика и лечение эндогенного кормового травматизма у коров / И. И. Волотко, А. И. Безин, Н. И. Бутакова // Известия ОГАУ. – 2014. – № 6 (50). – С. 34–42.
3. Волотовский, И. Д. Стволовые клетки: перспективы развития клеточных технологий / И. Д. Волотовский, Е. С. Лобанок, Е. Н. Лойко // Наука и инновации. – 2011. – № 1 (95). – С. 17.
4. Елисеев, А. Н. Болезни конечностей у коров в условиях молочных комплексов, профилактика, лечение / А. Н. Елисеев, С. М. Коломийцев, А. И. Бледнов // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 9. – С. 124–132.
5. Клеточные технологии в лечении пациентов с рецессией десны / С. П. Рубникович [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2019. – 199 с.
6. Клинические возможности применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани при лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей / Е. В. Баранов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. VIII. – № 2. – С. 78–83.
7. Кривенко, С. И. Опыт и перспективы клинического применения мезенхимальных стволовых клеток / С. И. Кривенко, А. Л. Усс, Н. И. Дедюля // Актуальные вопросы гематологии: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гомель, 15-16 сент. 2011 г. / Гомел. гос. мед. ун-т. – Гомель, 2011. – С. 51–54.
8. Корочкин, Л. И. Стволовые клетки в биологии и медицине / Л. И. Корочкин // Вестн. эстет. медицины. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 9–18.
9. Локальная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и фибробластов кожи: особенности регенерации кожного покрова и сравнительная оценка показателей заживления экспериментальных раневых дефектов / Е. В. Баранов [и др.] // Воен. медицина. – 2017. – № 2. – С. 79–86.
10. Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике некробактериоза, пальцевого дерматита и болезней копыт крупного рогатого скота незаразной этиологии / Д. А. Хузин [и др.]; Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – М. : Минсельхоз России, 2017. – 41 с.
11. Морфологические признаки эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в комплексном лечении длительно незаживающих инфицированных ран в эксперименте / В. Я. Третьяк [и др.] // Военная медицина. – 2012. – № 1. – С. 122–124.
12. Организационно-технологические требования при производстве молока на молочных комплексах промышленного типа : одобрены Постановлением коллегии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 4 июня 2018 г. № 16.
13. Организация сельскохозяйственного производства : учеб. пособие / Н. С. Яковчик, Н. Н. Котковец, П. И. Малихтарович ; под общ. ред. проф. Н. С. Яковчика. – Минск : ИВЦ Минфина, 2016. – 598 с.
14. Особенности регенерации кожного покрова при применении мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани у лабораторных животных с дефектом мягких тканей / Х. А. Сахаб [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 2. – С. 134–139.
15. Петренко, А. Ю. Трансплантация стволовых клеток – перспективное направление терапии 21 века. 2. Стволовые кроветворные клетки из разных источников / А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко // Междунар. мед. журн. – 2003. – Т. 9, № 1. – С. 123–129.
16. Петренко, А. Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А. Ю. Петренко, Ю. А. Хуанов, Э. Н. Иванов. – Луганск : Пресс-Экспресс, 2011. – 368 с.
17. Руколь, В. М. Болезни конечностей у крупного рогатого скота в условиях интенсификации молочного скотоводства : монография / В. М. Руколь, В. А. Журба. – Витебск : ВГАВМ, 2022. – 368 с.
18. Руколь, В. М. Диагностика и профилактика болезней конечностей крупного рогатого скота / В. М. Руколь, В. А. Журба. – Витебск : ВГАВМ, 2021. – 178 с.
19. Сахаб, Хайдар А. Противовоспалительный эффект мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани при лечении инфицированных ран в эксперименте / Хайдар А. Сахаб, С. И. Третьяк, Е. В. Баранов // Медицинский журнал. – 2012. – С. 77–81.
20. Хузин, Д. А. Болезни пальцев и копыт у коров их профилактика и лечение / Д. А. Хузин, Т. Р. Гайнутдинов, Ф. А. Хусниев // Ветеринарный врач. – 2014. – № 5. – С. 24–28.
21. Johann Kofler Pathogenesis and Treatment of Toe Lesions in Cattle Including «Nonhealing» Toe Lesions // Vet. Vet. Clin. Food Anim. – 2017. – V. 33. – С. 301–328.
22. Estimating the value of infectious or noninfectious foot disorder prevention strategies within dairy farms, as influenced by foot disorder incidence rates and prevention effectiveness / K.A. Dolecheck [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2019 Jan, Volume 102, – Issue 1. – P. 731–741.
23. Fortier, L. A. Stem cells in veterinary medicine / L. A. Fortier, A. J. Travis // Stem Cell Res. Ther. – 2011. – V. 2. – P. 9.
24. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species / A.B.T. Hill [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – V. 10. – P. 44.
25. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon / E. E. Godwin [et al.] // Equine Vet. J. – 2012. – V. 44. – P. 25–32.

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Лысенко, А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
 Кучвальский М.В., научный сотрудник²
 Красникова Е.Л., старший научный сотрудник³
 Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент⁴
 Якобсон Е.И., магистрант⁵

¹УП «Научно-исследовательский институт “БиоФарм”», г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», г. Минск, Республика Беларусь

³РУП «Институт мясо-молочной промышленности», г. Минск, Республика Беларусь

⁴РУП «Опытная научная станция по птицеводству», г. Заславль, Республика Беларусь

⁵ЗАО «Белорусская национальная биотехнологическая корпорация», Минская обл., Республика Беларусь

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

Резюме

Инактивированные глутаровым альдегидом (ГА) клетки *Mycobacterium bovis* после внесения в стерильную увлажненную почву сохраняли кислотоустойчивость и визуально обнаруживались в течение 15 месяцев, хотя их количество уменьшалось за счет восстановления жизнеспособности в виде некислотоустойчивых (НКУ) форм с дефектной клеточной стенкой (CWD). К 21-му месяцу они превращались в малозаметные спороподобные формы. В течение 21-го месяца во всех случаях из контаминированной почвы удавалось выделить НКУ CWD *M. bovis* при посеве суспензии почвы с предварительной инкубацией в стимуляторе роста MycCel DW и без нее. Изоляты слабо индуцировали гиперчувствительность к туберкулинам, были резистентны к большинству природных антибиотиков, обладали повышенной устойчивостью к ГА и резистентностью к полигексаметиленгуанидину.

Предположено, что обнаруженный феномен приводит к формированию природных очагов инфекции и может играть роль в индукции реакций на туберкулин у крупного рогатого скота.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, инактивация дезинфектантами, контаминированная почва, восстановление жизнеспособности, микобактерии с дефектной клеточной стенкой.

Summary

Mycobacterium bovis cells inactivated with glutaraldehyde (GA) after application to sterile moistened soil retained acid fastness and were visually detected for 15 months, although their number decreased due to the restoration of viability in the form of non-acid-fast (NAF) cell wall deficient (CWD) forms. By the 21st month, these forms turned into inconspicuous spore-like forms. For 21 months, in all cases, NAF CWD *M. bovis* was isolated from contaminated soil when sowing a soil suspension with pre-incubation in the MycCel DW growth stimulant and without it. The isolates weakly induced hypersensitivity to tuberculins, were resistant to most natural antibiotics, had increased resistance to GA and resistance to polyhexamethylene guanidine. It is assumed that the discovered phenomenon leads to the formation of natural foci of infection, and may play a role in the induction of reactions to tuberculin in cattle.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, inactivation with disinfectants, contaminated soil, restoration of viability, non-acid-fast mycobacteria.

Поступила в редакцию 20.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

В 1897 г. Jaime Ferrán Clúa сообщил, что при пересевах микобактерий туберкулеза (МБТ) на питательной среде с уменьшающейся концентрацией пептона, глицерина и сахаров появляются некислотоустойчивые (НКУ) клетки, стадийно трансформирующиеся в разные по морфологии

непатогенные α -, β -, Δ -, ϵ -формы. На основании этого исследователь выдвинул гипотезу о том, что кислотоустойчивые (КУ) МБТ представляют лишь часть популяции вида, в основном они существуют в α - и β -формах, находящихся и размножающихся во внешней среде, но способны при попадании в организм трансформироваться в

патогенную γ -форму [1, 2, 3]. Поэтому Ferrán предположил, что туберкулез невозможно ликвидировать из-за неконтролируемого источника инфекции, а бороться с болезнью можно только вакцинацией. Для этого он разработал вакцину из смеси α - и ϵ -форм МБТ, которой было привито около 1 млн детей в Испании, Аргентине и Уругвае [4].

Из-за методических сложностей спорная гипотеза Ferrán'a так и не нашла подтверждения. Вместе с тем МБТ действительно могут долго (до 2 лет) сохраняться во внешней среде, а заражение, в частности крупного рогатого скота, чаще происходит при контакте с контаминированными объектами [5, 6]. В связи с этим дезинфекция признана ключевой мерой борьбы с инфекцией [6]. Так как у МБТ мощная липидная клеточная стенка, придающая им устойчивость к химическим веществам, для дезинфекции используют специальные композиции [6, 7]. Однако было замечено, что некоторые дезинфектанты, например традиционно применяющиеся при профилактике туберкулеза 3%-ный щелочной раствора формальдегида, 3%-ные растворы едкого натрия и хлорамина Б, способствуют трансформации МБТ в НКУ и L-формы формы, отличающиеся повышенной устойчивостью к ним [8, 9]. Более того, было установлено, что даже если под действием дезинфектанта происходит гибель МБТ, они, реагируя на химический стресс, успевают образовать «защитные» формы, способные восстанавливать жизнеспособность в виде НКУ МБТ с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD) [10]. Скорее всего, это не частный эффект *in vitro*, а универсальный защитный механизм при любых стрессах [11]. Поэтому представляет интерес выяснить, что может происходить с инактивированными МБТ во внешней среде, в частности в почве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Почву с границы плодородного и подстиляющего слоя подсушивали при температуре 100 °С, просеивали через сито (4 мм) и стерилизовали гамма-лучами (24,6 Кгрей).

Бактериальную массу *Mycobacterium bovis* 8 гомогенизировали в 0,9%-ном сте-

рильном растворе NaCl. Суспензию с 3,3 мг клеток смешивали 1:1 с 3%-ным раствором дезинфектанта на основе глутарового альдегида (ГА) и поверхностно активного вещества (ПАВ), инкубировали 2 ч при температуре 23 °С. Микобактерии осаждали (14000 об/мин), осадок суспендировали в стерильной воде. Для проверки полноты инактивации суспензию МБТ высевали на среду Гельберга.

В стерильную почву, помещенную в 3 чашки Петри, внесли суспензию инактивированных МБТ (по 2 мг бактериальной массы). Чашки в герметичных пакетах хранили 21 месяц при температуре 21–23 °С, при этом почву периодически увлажняли стерильной водой.

Микроскопию и посев контаминированной почвы проводили через 1, 4, 7, 15 и 21 месяц. Для посева через 1 и 4 месяца суспензию почвы смешивали со стимулятором роста ВКГ («Hansa»), инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали по 0,3 мл на пробирки с питательной средой MucCel DW [12].

На 7-й, 15-й и 21-й месяц на среду MucCel DW высевали непосредственно увлажненную суспензию почвы без инкубации в стимуляторе роста. Посевы инкубировали при температуре 37 °С, если видимого роста не было, через 1-2 суток проводили «слепые» пересевы.

Мазки почвы и изолятов окрашивали по Kinyoun и дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП), включавшим инактивацию эндогенной пероксидазы (3 % H₂O₂), окраску по Kinyoun, инкубацию с конъюгатом пероксидазы и аффинно очищенных антител к *M. bovis*, обработку раствором 3,3`-диаминобензидина с H₂O₂. Метод обеспечивал окрашивание КУ клеток в красный цвет, НКУ CWD МБТ – в коричневый, а немикобактериальной микрофлоры и тканей – в синий [13]. Микроскопию проводили на Olympus B51X.

ДНК из пробы почвы и изолятов исследовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами 16S RNA, MPB 70, MPB 64, а также Is 6110 (ПЦР-RT). ДНК выделяли из проб, прогретых в лизирующем буфере (95 °С, 5 мин) и на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили на C1000™ ThermoCycler

(BioRad) и на CFX96™ Real-Time System (BioRad) по стандартным протоколам.

Изоляты выращивали на среде MycCel DW, отмывали 1%-ным раствором фенола и дезинтегрировали на Bandelin Sonopuls 2400 (4 цикла по 5 мин). Антигенный состав соникатов изолятов изучали в реакции иммунодиффузии (РИД) с антисывороткой к НКУ CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv в сравнении с соникатом *M. bovis* «tbc 24» из лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis*.

Для изучения патогенности и сенсибилизирующих свойств 3 изолятами заразили 3 морских свинок (подкожно по 3–4 мг). Через 45 суток их исследовали туберкулином очищенным (ТО) для млекопитающих, ППД туберкулином для птиц (по 100 МЕ) и аллергеном из сониката НКУ CWD *M. bovis* 8 (в эквивалентной по белку дозе), а также в ИФА с соникатами *M. bovis* 8 и *M. avium*.

Чувствительность изолятов НКУ CWD МБТ к композициям на основе ГА и ПАВ (№ 1), ГА и четвертичных аммониевых соединений (ЧАС, № 2), полигексаметиленгуанидина (ПГМГ, № 3), а также к антибиотикам (стандартные диски) определяли в диффузионном тесте.

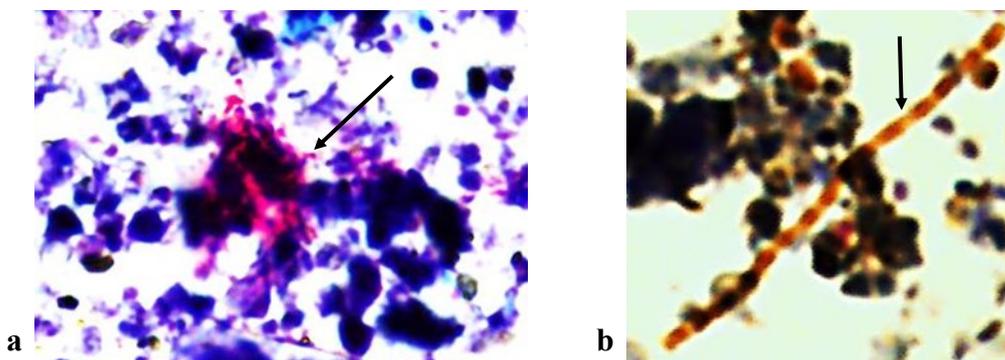
Для постановки диффузионного теста с дезинфектантами чашки Петри со средой MycCel DW засеивали культурами НКУ CWD МБТ. В слое питательной среды вы-

резали лунки, в которые вносили по 100 мкл разведений растворов дезинфектантов в концентрации 0,063–1 %. Через 20–22 ч инкубирования посевов при температуре 37 °С проводили учет роста культур и определение размеров зон его задержки. Для последующего пассажа делали посев бактериальной массы, взятой с границы зоны задержки роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Через 1 месяц после контаминации в мазках почвы обнаружены отдельные КУ МБТ и их кластеры (рисунок 1 а), а также длинные зернистые НКУ палочковидные формы (НКУ CWD МБТ), связывавшие при ДИП окраске антитела к антигенам *M. bovis* (рисунок 1 б, стрелка).

Через 15 месяцев в мазках почвы КУ МБТ не обнаружено, но найдены единичные утолщенные короткие частично кислотоустойчивые (ЧКУ) красного цвета палочки с НКУ зернами (рисунок 2 а), веретеноподобные клетки, иногда образующие ЧКУ палочковидные зернистые формы (рисунок 2 б, стрелка), короткие НКУ биполярные и полностью окрашенные палочки (рисунок 2 с). Также встречались длинные зернистые ЧКУ палочковидной формы (рисунок 2 д), такие, как в единичных случаях были обнаружены в начале опыта (рисунок 1 б).



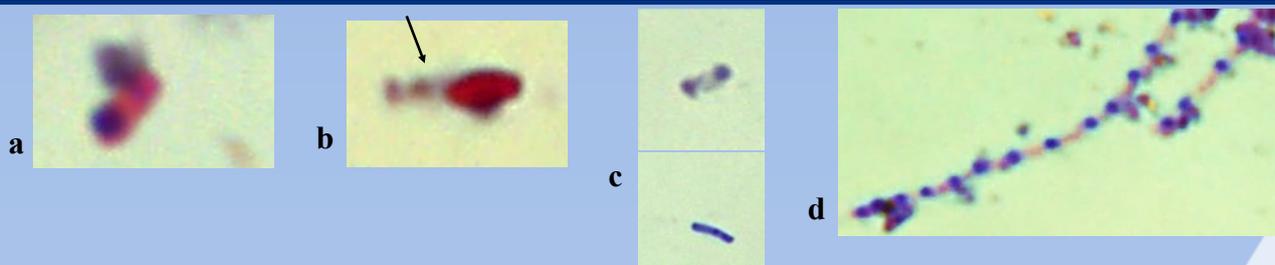
а – Kinyoun; б – ДИП окраска, 10×100

Рисунок 1 – Инактивированные МБТ в почве через 1 месяц опыта

При микроскопии почвы через 21 месяц МБТ и их измененных форм и генома не обнаружено.

Посевы через 1 и 4 месяца, проведенные с предварительной инкубацией проб почвы в стимуляторе роста, а также

через 7, 15 и 21 месяц без инкубации в стимуляторе роста во всех случаях дали рост НКУ и ЧКУ микроорганизмов, который, как правило, появлялся на 4–7-й день или через 1–2 дня в I–II «слепом» пересеве во всех 3 чашках.

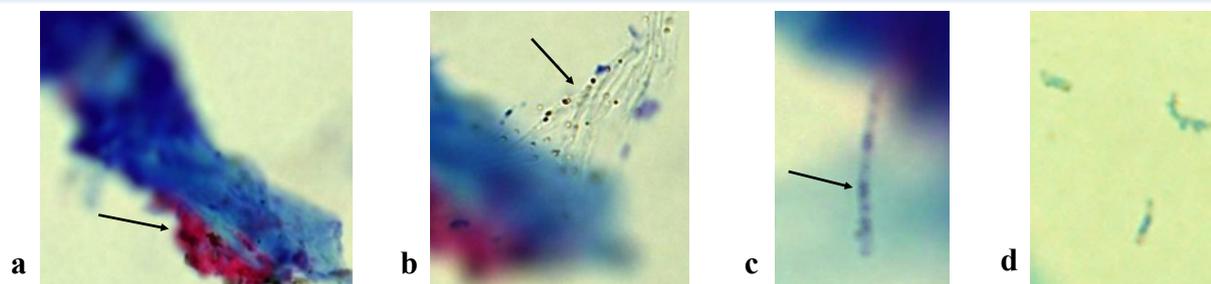


а – ЧКУ палочки с НКУ зернами красного цвета; б – ЧКУ палочковидные зернистые формы; с – НКУ биполярные окрашенные палочки; д – зернистые ЧКУ палочковидной формы

Рисунок 2 – Инактивированные МБТ в почве через 15 месяцев опыта. Kinyoun, 10×100

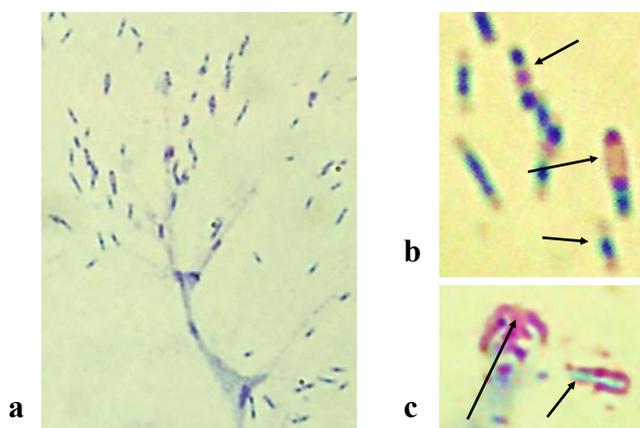
В посевах почвы через 1 месяц были заметны кластеры КУ клеток, образовывавших НКУ синего цвета протопласты (рисунок 3 а), из которых прорастали мицелиоподобные формы (рисунки 3 б, 4 а), превращавшиеся в НКУ зернистые палочковидные формы (рисунок 3 с), которые, вероятно, распадались на мелкие палочки (рисунок 3 д), в том числе биполярные с

КУ зерном (рисунок 4 б), а также ЧКУ веретеноподобные клетки (рисунок 4 б). Кроме того, появлялись округлые НКУ образования с красной ЧКУ окантовкой, окруженные НКУ зернистостью, в которой явно образовывались палочковидные формы (рисунок 4 с). При дальнейших пересевах образовывались клетки с характерной для НКУ CWD МБТ морфологией [14].



а – кластер КУ клеток (стрелка) с НКУ протопластом (синего цвета); б – мицелиоподобные формы (стрелка), с – зернистые палочковидные формы, д – мелкие палочки. Kinyoun, 10×100

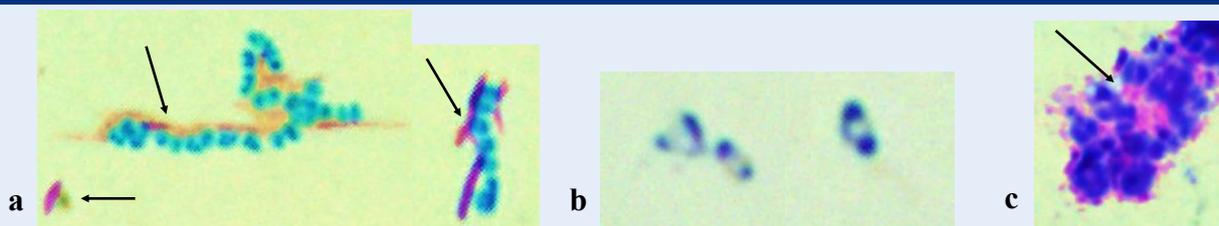
Рисунок 3 – Посев почвы через 1 месяц



а – образование палочковидных форм; б – зернистые палочки и веретеноподобная клетка (ЧКУ элементы – стрелки); с – ЧКУ палочковидные формы (стрелки). Kinyoun, 10×100

Рисунок 4 – Рост в посевах контаминированной почвы (посев через 1 месяца опыта)

В посевах почвы через 4 месяца отмечен рост длинных зернистых форм с КУ элементами, а также отдельных ЧКУ клеток (рисунок 5 а, стрелки). Встречались короткие биполярные палочки (рисунок 5 б), а также крупные формы с ЧКУ элементами, в которых образовывались округлые НКУ формы (рисунок 5 с).



а – мазок из чашки № 1; б – мазок из чашки № 2; с – мазок из чашки № 3. Kinyoun, 10×100

Рисунок 5 – Рост в посевах почвы через 4 месяца

Через 7, 15 и 21 месяц посев контаминированной почвы из всех чашек без предварительной инкубации проб в стимуляторе дал рост культур, похожих по морфологии на предыдущие изоляты (стрелки – рисунки 5 а, 6 а, 4 а, 7). Среди них встре-

чались весьма характерные формы, такие же, как образовывались при экспериментальной трансформации штамма *M. bovis* 8 или при росте изолята НКУ CWD *M. bovis* из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом (рисунок 8 а, 8 б, 8 с).

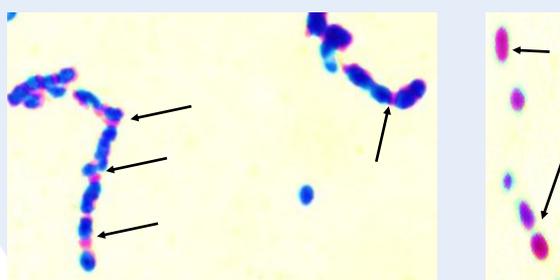
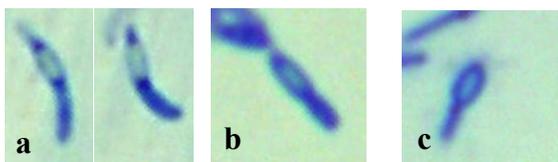


Рисунок 6 – Рост в посевах почвы из чашки № 1, посев через 7 месяцев опыта (стрелки – ЧКУ фрагменты клеток). Kinyoun, 10×100



Рисунок 7 – Характерные формы клеток роста в посевах почвы (чашка № 2) через 15 месяцев после контаминации. Kinyoun, 10×100

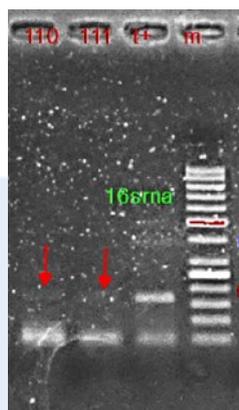


а – в посевах через 21 месяц почвы из чашки № 3; б, с – аналогичные формы НКУ CWD *M. bovis* 8 и изолята из туберкулезной гранулемы

Рисунок 8 – Характерная форма НКУ МБТ

ДНК изолятов из контаминированной почвы реагировала в ПЦР с праймерами 16s RNA, МРВ 64, Is 6110, и это подтверждало, что они являлись НКУ МБТ (рисунок 9, таблица 1). Их антигенный сос-

тав, соответственно, не отличался от состава НКУ CWD *M. bovis* «tbc 24» из лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis* (рисунок 10).



а – из изолятов, выделенных через 1 месяц:
110 – из чашки № 1; 111 – из чашки № 2;
t+ – положительный контроль; m – маркер молекулярного веса; б – из изолятов, выделенных через 21 месяц: 9 – отрицательный контроль; 10 – из чашки № 3 (праймеры 16s RNA, МРВ 70, МРВ 64); стрелками обозначены ампликоны

Рисунок 9 – Амплификаты ДНК изолятов из почвы

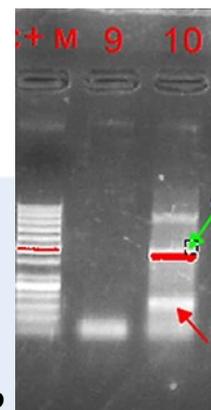
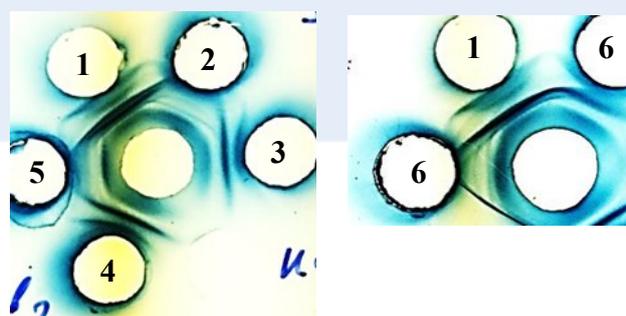


Таблица 1 – Результаты ПЦР ДНК изолятов из контаминированной почвы

Изоляты из чашек	16s RNA	MPB 70	MPB 64	Ct IS 6110
через 1 месяц				
№ 1, пробирка № 1	-	-	+	38,20
№ 2, пробирка № 2	-	-	+	35,21
№ 3, пробирка № 2	+	-	-	35,08
через 21 месяц				
№ 3, пробирка № 1	+	-	+	39,15

Морские свинки, зараженные НКУ МБТ из почвы, слабо реагировали на туберкулины для млекопитающих и птицы (папулы 4,5–7,0 мм) и несколько сильнее – на аллерген из НКУ CWD *M. bovis* 8 (папулы 8,0–13,0 мм). Вместе с тем у зара-

женных животных развивался выраженный гуморальный ответ на антигены типичных МБТ (титры в ИФА 1:2560–1:5120), причем более интенсивный – на соникат *M. bovis*, чем *M. avium* (таблица 2).



В центре – антисыворотка к НКУ CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, соникаты изолятов:
 1 – НКУ CWD МБТ «tbc 24» из почвы;
 2 – из чашки № 3 через 1 месяц;
 3 – из чашки № 1; 4 и 5 – из чашки № 2;
 6 – из чашки № 2 через 7 месяцев

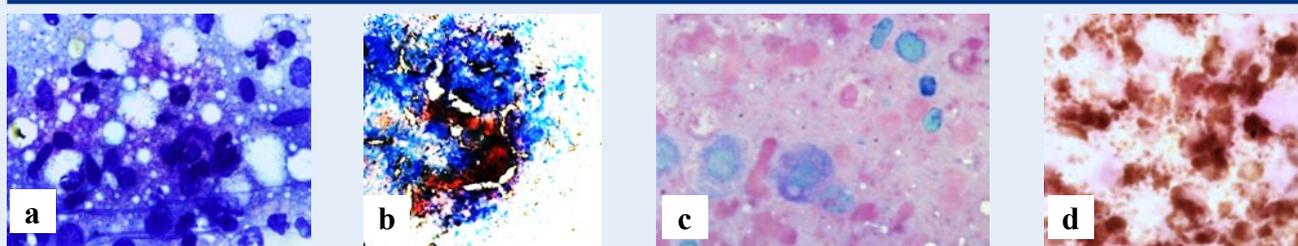
Рисунок 10 – Исследование антигенного состава изолятов из контаминированной почвы в РИД

Морская свинка, зараженная изолятом из чашки № 2, пала через 64 дня. На вскрытии отмечена гиперплазия селезенки, в которой выявлены микрогранулемы с ан-

тигенами МБТ (коричневые участки, рисунок 11). Остальные зараженные животные оставались живыми (срок наблюдения 90 дней).

Таблица 2 – Результаты исследования в ИФА крови морских свинок, зараженных изолятами из почвы с соникатами *M. avium* и *M. bovis*

Разведение сывороток	Сыворотка свинки, зараженной изолятом из чашки № 1				Сыворотка свинки, зараженной изолятом из чашки № 3			
	<i>M. avium</i>		<i>M. bovis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. bovis</i>	
	ОП	S/neg	ОП	S/neg	ОП	S/neg	ОП	S/neg
1:40	923	2,1	1801	6,4	1199	2,6	1527	5,5
1:80	1041	3,3	1235	8,4	1392	4,5	15871	10,6
1:160	792	3,3	1304	6,9	1114	4,6	1753	9,3
1:320	638	2,4	1037	5,5	744	2,8	1084	5,7
1:640	446	3,1	584	4,3	447	3,1	634	4,7
1:1280	319	2,5	365	2,9	374	2,5	567	4,6
1:2560	308	2,4	304	2,5	343	2,7	417	3,2
1:5120	246	1,9	235	1,8	312	2,4	279	2,2



а, b – селезенка; с, d – печень (а, с – контроль инактивации эндогенной пероксидазы; b, d – ДИП окраска)

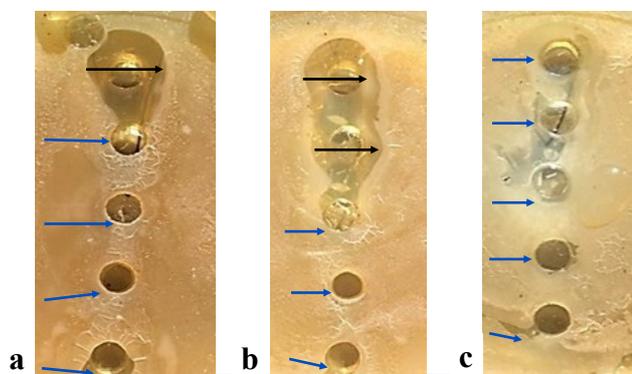
Рисунок 11 – Отпечатки селезенки и печени морской свинки, зараженной изолятом из чашки № 2

НКУ МБТ, выделенные из контаминированной почвы, отличались повышенной устойчивостью к дезинфектантам. В диффузионном тесте дезинфектант № 1 (ГА+ПАВ) в концентрациях 0,063–0,5 %, а № 2 (ГА+ЧАС) 0,063–0,25 % совсем не подавляли их рост, а в 1%-ной концентрации оказывали лишь слабое действие, образуя зоны задержки в 12–13 мм (таблица 3, ри-

сунок 12). Дезинфектант № 3 на основе ПГМГ вообще не действовал на изоляты из почвы (таблица 3, рисунок 12). При этом НКУ CWD МБТ, никогда не контактировавшие с дезинфектантами, в частности «D» – из крови человека с онкологическим заболеванием, инактивировались дезинфектантами, использовавшимися в опыте, уже в концентрации 0,063 % (таблица 3).

Таблица 3 – Диаметры зон задержки роста (в мм) в диффузионном тесте изолята из почвы № 3/2 (числитель) и НКУ CWD МБТ «D» (знаменатель) дезинфектантами на основе ГА и ПГМГ

Концентрация	№ 1 ГА+ПАВ	№ 2 ГА+ЧАС	№ 3 ПГМГ
1 %	12/26	13	0/25
0,5 %	0/22	11	0/23
0,25 %	0/19	0	0/19
0,125 %	0/12	0	0/11
0,063 %	0/11	0	0/10



Композиции: а – ГА+ПАВ; б – ГА+ЧАС; с – ПГМГ (черные стрелки – зоны задержки роста, синие – отсутствие зон задержки)

Рисунок 12 – Зоны задержки роста изолята из чашки № 3 разведениями дезинфектантов в концентрациях 0,063–1,0 %

Изоляты НКУ (CWD) МБТ из контаминированной почвы, как и экспериментально полученный штамм НКУ CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, отличались резистентностью к пенициллинам, аминогликозидам и

цефалоспорином, при этом резистентность к антибиотикам, которые первоначально оказывали действие на изоляты (неомицин, тетрациклин, линезолид), появлялась уже после 2 контактов с ними (таблица 4).

Таблица 4 – Чувствительности к антибиотикам изолята № 3 из контаминированной почвы, НКУ CWD *M. tub.* H₃₇Rv (зоны задержки роста в мм) в диффузионном тесте

Изоляты	Пенициллин	Ампициллин	Стрептомицин	Канамицин	Неомицин	Азигромин	Тетрациклин	Левифлоксацин	ипрофлоксацин	Офлоксацин	Цефалотин	Линезолид
№ 3	0	13	14	16	19/18/15 ^x	27	29/22/12	36	37	27	0	31/26/16 ^x
НКУ CWD <i>M. tub.</i> H ₃₇ Rv	0	20	20	20	22	22	23	37	35	26	12	29

Примечание – красным цветом обозначена зона меньше 19 мм, указывающая на резистентность к антибиотику; ^xизменения размеров зон при повторных контактах с антибиотиком

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее было установлено, что МБТ, инактивированные дезинфектантами, могут восстанавливать жизнеспособность *in vitro* в виде НКУ CWD форм после инкубации в стимуляторе роста и посева на специальную питательную среду [10].

Для оценки практической значимости феномена необходимо было выяснить, может ли подобное происходить во внешней среде после эффективной дезинфекции. Установлено, что инактивированные КУ МБТ визуально обнаруживаются в почве как минимум в течение 15 месяцев, но их количество уменьшается. Это связано не только с деградацией клеток, но и с постепенным восстановлением жизнеспособности в увлажненной почве и превращением в НКУ CWD формы. Это подтверждается появлением клеток, специфически окрашивавшихся ДИП методом, благодаря связыванию антител к *M. bovis*.

К 21-му месяцу визуально заметные формы МБТ исчезают. Скорее всего, это связано с тем, что использованная стерильная почва была бедна питательными веществами, а «голодание» стимулирует образование спороподобных «защитных» форм МБТ, которые из-за малого размера и снижения способности связывать красители становятся малозаметными [15, 16, 17]. Тем не менее, на всех этапах опыта из контаминированной почвы удается выделить НКУ CWD МБТ. Важным результатом было получение роста НКУ CWD МБТ при посеве

суспензии почвы на среду MycCel DW без предварительной инкубации в стимуляторе роста. То есть сохраняющиеся в почве защитные формы МБТ при увлажнении и повышении концентрации питательных веществ трансформировались в способные к размножению НКУ CWD МБТ. Следовательно, этот процесс может происходить не только *in vitro*, но и в естественных условиях.

Известно, что в почве много микроорганизмов, выделяющих антибиотики для подавления конкурентов. Интересно, что изоляты НКУ CWD МБТ были резистентны к большинству природных антибиотиков, также у них быстро развивалась резистентность к ним, что облегчало их существование в окружении других почвенных микроорганизмов.

Полученные результаты расширяют представления о биологии и адаптивных возможностях МБТ. Практическое значение феномена нуждается в дальнейшем изучении, но уже понятно, что даже при эффективной противотуберкулезной дезинфекции попадающие в почву инактивированные МБТ могут стать не только резервуаром, но и источником инфекции. Вопрос состоит в том, способны ли измененные МБТ или их «защитные» формы, происходящие из инактивированного возбудителя, при попадании в организм вызывать туберкулез или какие-то другие эффекты? Ранее было установлено, что НКУ CWD МБТ, образовавшиеся из химически инактивированных клеток, при попадании *per*

ос приживаются и персистируют в организме мышей [10]. То есть, проникая с пищей, водой, аэрозолями, они могут инфицировать животных и людей, но при этом вряд ли способны быстро трансформироваться в типичные патогенные МБТ. В условиях эксперимента реверсию клинического изолята L-формы МБТ удалось получить только после 13 пассажей на морских свинках

[1]. Вместе с тем полученные результаты показали, что изоляты НКУ CWD МБТ из контаминированной почвы вызывали у морских свинок слабую чувствительность к туберкулину. Тем не менее нельзя исключать, что, имея целый ряд общих антигенов с типичным *M. bovis*, они могут быть причиной возникновения реакций на туберкулин у крупного рогатого скота.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ferran, J. Note relative aux aptitudes saprophytes du bacilli de la tuberculose, a ses affinites avec le bacille du typhus et le coli-bacille et aux proprietes immunisantes et therapeutiques que possede ce bacille converti en saprophyte / J. Ferran // Comptes rendus de la l academie de sciences de Paris. – 1897. – Vol. 125. – P. 515–518.
2. Ferran, J. La nueva bacteriologia de la tuberculosis: Congreso de la Tuberculosis / J. Ferran. – Valencia : Litografia de Jose Ortega, 1912. – 51 p.
3. Ferran, J. Errores doctrinales concernientes a la tuberculosis y a su bacilo: rectificación de estos errores: nuevas orientaciones conducentes a la solución del problema de la profilaxis y de la terapéutica específicas de esta enfermedad. / J. Ferran. – Segunda edicion. – Valencia : Imprenta y Encuadernacion de V. Tordesillas, 1910. – 56 p.
4. Модель, Л. М. Идеи Феррана об этиологии, патогенезе и профилактике туберкулеза / Л. М. Модель // Иммунобиология, клиника и профилактика туберкулеза у детей / ред. А. А. Кисель, В. Н. Иванов. – Л. : Практическая медицина, 1926. – С. 37–43.
5. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA / A. E. Fine [et al.] // Veterinary Medicine International. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–12.
6. Колычев, Н. М. Методы индикации и обезвреживания микобактерий туберкулеза на объектах внешней среды : дис. ... д-ра ветеринар. наук : 16.00.03 / Н. М. Колычев. – Омск, 1983. – 436 с.
7. Maris, P. Modes of action of disinfectants / P. Maris // Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics). – 1995. – Vol. 14, № 1. – P. 47–55.
8. Sweany, H. C. Mutation forms of the tubercle bacillus / H. C. Sweany // JAMA. – 1926. – Vol. 87, № 15. – P. 1206–1211.
9. Секин, Е. Ю. L-трансформация микобактерий, свойства и способы культивирования L-форм: дис. ... канд. ветеринарных наук : 16.00.03 / Е. Ю. Секин. – Омск, 2006. – 133 с.
10. Микобактерии туберкулеза после летального воздействия дезинфектантов могут восстанавливать жизнеспособность в виде микобактерий с дефектной клеточной стенкой / А. Э. Высоцкий [и др.] // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2019. – № 2. – С. 26–35.
11. The tuberculin skin test: How safe is safe? – the tuberculins contain unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria / A. P. Lysenko [et al.] // Clinical and Experimental Medical Sciences. – 2014. – Vol. 2. – P. 55–73.
12. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // Туберкулез – глобальная катастрофа человечества: материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г., Ростов-на-Дону. – Ростов н/Д : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.
13. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
14. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // Экология и животный мир. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
15. Nyka, W. Studies on the Effect of Starvation on *Mycobacteria* / W. Nyka // Infection and Immunity. – 1974. – Vol. 9, № 5. – P. 843–850.
16. Sporulation in mycobacteria / J. Ghosh [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106, № 26. – P. 10781–10786.
17. Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Cultures / E. A. Lamont [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. e30648.

УДК 619:615.28:614.48

Кривенок Л.Л., магистр ветеринарных наук

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

СОЗДАНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «КРИОКС», ЕГО БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Резюме

В статье описан процесс создания дезинфицирующего средства на основе стабилизированной перекиси водорода, исследованы его антимикробная активность и токсикологические свойства.

Ключевые слова: перекись водорода, органические кислоты, бактерицидная активность, белковая нагрузка.

Summary

The article describes the process of creating a disinfectant based on stabilized hydrogen peroxide, its antimicrobial activity and toxicological properties have been studied.

Keywords: hydrogen peroxide, organic acids, bactericidal activity, protein load.

Поступила в редакцию 03.06.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Современные подходы к ведению интенсивного животноводства направлены на создание наиболее оптимальных условий для содержания животных, что включает полноценное кормление, поддержание необходимого микроклимата и снижение микробной нагрузки с помощью эффективных современных дезинфицирующих средств.

Помимо снижения микробной нагрузки, использование дезинфицирующих средств в системе санитарно-противоэпизоотических мероприятий позволяет предупредить возникновение, распространение и способствует ликвидации патогенных микроорганизмов на объектах внешней среды, что обеспечивает прерывание передачи инфекции [1].

Для осуществления дезинфекционных мероприятий предложено значительное количество химических средств, но, невзирая на их обилие и разнообразие, поиск новых средств и композиций, обладающих дезинфицирующими свойствами, продолжается [2, 3].

Поэтому целью нашего исследования стало создание композиции дезинфекционного препарата, изучение его бактерицидной эффективности и токсичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При создании композиции дезинфицирующего средства в качестве основного компонента была использована перекись водорода, так как она имеет широкий спектр биоцидного действия, быстро разлагается во внешней среде на нетоксичные компоненты. Резистентные формы микроорганизмов к перекиси водорода отсутствуют, а органические кислоты, помимо бактерицидных свойств, обладают способностью стабилизировать неустойчивую при хранении перекись водорода [4].

Лабораторный образец средства, показавший наиболее высокую активность, далее исследовали на культурах микроорганизмов с различной устойчивостью: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micobacterium terra* и грибах *Candida albicans* при микробной нагрузке 1 млрд клеток/см³ и экспозициях 15, 30 и 60 минут. Использовали 0,1, 0,5 и 1,0%ные растворы препарата. В качестве белковой нагрузки использовали 20%-ную сыворотку крови. Рост микроорганизмов на питательных средах учитывали через 24–48 часов, грибов – через 10 суток и 21 день в отношении *Micobacterium terra*. Контролем служили исходные культуры и применяемые питательные среды.

Токсикологическую оценку препарата проводили на линейных белых мышах согласно Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно литературным данным и проведенным предварительным опытам было установлено, что наиболее перспективными из органических кислот являются молочная, уксусная и муравьиная. Нами были созданы три композиции препарата, состоящие из перекиси водорода и данных кислот.

По результатам предварительных лабораторных испытаний лучшая бактерицидная активность наблюдалась у композиции с уксусной кислотой. Решено включить ее в состав будущего средства.

На втором этапе определяли процентное соотношение перекиси водорода и уксусной кислоты. Для этого были созданы 3 композиции с разным соотношением перекиси водорода и уксусной кислоты: № 1 – 95 % перекиси водорода + 5 % уксусной кислоты; № 2 – 90 % перекиси водорода + 10 % уксусной кислоты; № 3 – 85 % перекиси водорода + 15 % уксусной кислоты. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследования антимикробных свойств композиций на тест-культурах

Наименование культуры	Композиция № 1			Композиция № 2			Композиция № 3		
	0,5 %	1,0 %	1,5 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %
<i>E. coli</i>	±	–	–	±	–	–	±	–	–
<i>S. aureus</i>	±	–	–	±	–	–	±	–	–
<i>Bac. subtilis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
при белковой нагрузке (20 % сыворотки крови)									
<i>E. coli</i>	±	–	–	±	–	–	±	–	–
<i>S. aureus</i>	±	–	–	±	–	–	±	–	–
<i>Bac. subtilis</i>	+	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание – микробная нагрузка 1 млрд клеток/см³; экспозиция 15 минут; «+» – рост; «–» – отсутствие роста; «±» – уменьшение роста. Контроль культур – все положительно, контроль среды – отрицательно

По результатам опыта было принято решение использовать композицию перекиси водорода и уксусной кислоты в соотношении 90:10 (композиция № 2). Увеличение в препарате количества уксусной кислоты до 15 % (композиция № 3) не привело к усилению активности композиции, а уменьшение концентрации до 5 % (композиция № 1) ее снижало, что выражалось проявлением роста *Bacillus subtilis* в опыте с белковой нагрузкой.

Так как композиция дезинфицирующего средства имела явный запах уксусной кислоты, что при аэрозольной дезинфекции в присутствии животных, возможно, будет негативно отражаться на их поведении, нами было принято решение в выбранную композицию внести вторую органическую кислоту, что должно улучшить характеристики средства.

Для этого нами отобраны три органические кислоты – молочная, яблочная и янтарная, были сконструированы композиции № 2.1, 2.2, 2.3 соответственно. Было принято решение внести по 5 % данных кислот в выбранную композицию препарата, при этом в исходной композиции снизить концентрацию уксусной кислоты с 10 до 5 %. Антимикробную активность данных композиций исследовали на тест-культуре *Staphylococcus aureus* при микробной нагрузке 1 млрд клеток/см³ и экспозиции 15 минут. Использовали композиции в концентрации 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 и 1,0 %.

Посевы делали на мясо-пептонном агаре (МПА) в чашках Петри. Рост учитывали через 24–48 ч при температуре инкубации 37–38 °С. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследования антимикробных свойств композиций со второй органической кислотой на тест-культуре

Наименование тест-культуры	Композиция № 2.1					Композиция № 2.2					Композиция № 2.3				
	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	1,0 %	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	1,0 %	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	1,0 %
<i>S. aureus</i>	+	+	+	±	–	+	+	±	–	–	+	±	±	–	–
<i>S. aureus</i> +БН	+	+	+	+	±	+	+	+	±	–	+	+	±	–	–

Примечание – «+» – рост, «–» – отсутствие роста, «±» – уменьшение роста, БН – белковая нагрузка (20 % сыворотки крови). Контроль культуры – положительно, контроль среды – отрицательно

Как видно из таблицы, композиция № 2.3 обладает лучшими показателями по антимикробной активности, при этом резкий запах уксусной кислоты исчез, и в дальнейшем было решено использовать композицию, состоящую из перекиси водорода с добавлением уксусной и янтарной кислот.

Из литературных источников известно, что внесение поверхностно-активных веществ в средство способствует созданию на обрабатываемых поверхностях защитной бактерицидной пленки, улучшает показатели адгезии, снижает скорость испарения дезинфектантов, а многие из них обладают антимикробной активностью. Поэто-

му в третьей части опыта мы проводили исследования по возможности включения в состав композиции № 2.3 различных поверхностно-активных веществ. Для исследования были использованы 1%-ные растворы лаурилсульфата натрия, алкилбензолсульфокислоты марки А, неонола, алкилбензосульфоната и фосфоновой кислоты (торговое название – секвион). В дальнейшем все композиции, а также композиция, на 80 % состоящая из перекиси водорода, были испытаны на антимикробную активность на тест-культуре *Staphylococcus aureus* при микробной нагрузке 1 млрд клеток/см³ с экспозицией 15, 30 и 60 минут в концентрациях 0,1; 0,5 и 1,0 % (таблица 3).

Таблица 3 – Антимикробная активность композиции дезинфицирующего средства с содержанием различных поверхностно-активных веществ

Состав композиции	Экспозиция 15 минут			Экспозиция 30 минут			Экспозиция 60 минут		
	0,1 %	0,5 %	1,0 %	0,1 %	0,5 %	1,0 %	0,1 %	0,5 %	1,0 %
H ₂ O ₂ 80 %	+	+	+	+	+	±	+	±	–
H ₂ O ₂ 80 % + УК 5 % + ЯК 5 % + H ₂ O _(д) 10 % (композиция № 2.3)	+	±	–	±	–	–	–	–	–
Композиция № 2.3 + 1 % лаурилсульфата натрия	+	+	+	+	±	–	±	±	–
Композиция № 2.3 + 1 % алкилбензолсульфокислоты	+	+	±	+	+	–	±	±	–
Композиция № 2.3 + 1 % неонола	+	+	+	+	+	±	±	±	–
Композиция № 2.3 + 1 % алкилбензосульфоната	+	+	+	+	+	±	±	±	–
Композиция № 2.3 + 1 % секвиона	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание – «+» – рост культуры; «±» – снижение роста; «–» – рост отсутствует. H₂O₂ – перекись водорода; УК – уксусная кислота; ЯК – янтарная кислота; H₂O_(д) – дистиллированная вода. Контроль культур – все положительно, контроль среды – все отрицательно

По результатам исследования было установлено, что 80%-ный водный раствор перекиси водорода в концентрациях 0,1–1,0 % и экспозиции 15 минут не проявлял активности в отношении тест-культуры *Staphylococcus aureus* и только в концентрации 1,0 % при экспозиции 30 минут и 0,5 % – при экспозиции 60 минут действовал бактериостатически.

Добавление к перекиси водорода уксусной (5 %) и янтарной (5 %) кислот значительно усиливало ее бактерицидность: при концентрации 0,5 % и 15 минутах экспозиции и концентрации 0,1 % и 30-минутной экспозиции проявлялся бактериостатический эффект в отношении тест-культуры, а при концентрации 1,0 % с экспозицией 15 минут проявлялся бактерицидный эффект, который усиливался с увеличением экспозиции.

Наиболее выраженное усиление бактерицидной активности наблюдалось при добавлении к выбранной композиции 1 % секвиона. В дальнейшем именно эта компо-

зиция с условным названием «Криокс» была выбрана как лабораторный образец препарата и подверглась дальнейшим исследованиям по определению антимикробной активности и токсичности.

Антимикробная активность была испытана в отношении тест-культур *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micobacterium terra* и *Candida albicans*. Для этого использовали концентрации препарата 0,1; 0,5 и 1,0 %, микробная нагрузка составила 1 млрд клеток в 1 см³, экспозиция – 5, 15 и 30 минут. Все посевы, кроме микобактерий и кандид, производились на МПА в чашки Петри, термостатирование осуществлялось при температуре 37–38 °С. Учет результата проводили через 24–48 часов и 7 дней. Грибы *Candida albicans* выращивали на среде Сабуро в течение 10 дней при температуре 25–28 °С, микобактерии – на среде Гельберга в течение 21 дня при температуре 37–38 °С. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Антимикробная активность дезинфицирующего средства по отношению к показательным тест-культурам

Тест-культуры	Экспозиция 5 минут			Экспозиция 15 минут			Экспозиция 30 минут		
	0,1 %	0,5 %	1,0 %	0,1 %	0,5 %	1,0 %	0,1 %	0,5 %	1,0 %
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
+ белковая нагрузка	+	–	–	±	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
+ белковая нагрузка	±	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>	+	–	–	–	–	–	–	–	–
+ белковая нагрузка	+	±	±	+	–	–	±	–	–
<i>Candida albicans</i>	+	–	–	+	–	–	±	–	–
+ белковая нагрузка	+	±	±	+	–	–	+	–	–
<i>Micobacterium terra</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+ белковая нагрузка	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание – «+» – рост, «±» – снижение роста, «–» – отсутствие роста. Контроль культур – все положительно, контроль среды – все отрицательно

Из таблицы 4 следует, что бактерицидная активность дезинфицирующего средства проявляется в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* в 0,1%-ной концентрации при экспозиции 5 минут, при белковой нагрузке в той же экспозиции – при 0,5%-ной концентрации. В отношении

тест-культур *Bacillus subtilis* и *Candida albicans* бактерицидная активность средства проявляется в 1,0%-ной концентрации после 5 минут, а при белковой нагрузке в 0,5%-ной концентрации – при экспозиции 15 минут.

Тест-культура *Micobacterium terra* при данных режимах сохраняла жизнеспособность, бактериостатическое действие препарата отмечалось после применения 1%-ного раствора при экспозиции 60 минут, бактерицидное – через 30 минут при 2%-ной концентрации раствора.

Экспериментально было установлено, что среднесмертельная доза (ЛД₅₀) средства при внутрижелудочном введении равна 3900 мг/кг, что соответствует 3-му классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76 (вещества умеренно опасные).

В опыте по изучению хронической токсичности препарата при внутрижелудочном введении белым мышам в течение 16 дней в дозе от 1/10; 1/25 и 1/50 LD₅₀ изменений в их поведении, общем состоянии и поедаемости корма не наблюдалось. По окончании опыта при вскрытии мышей патологических изменений во внутренних органах не обнаружено, статистически достоверных изменений в показателях относительных коэффициентов масс внутренних органов у подопытных мышей по сравнению с контрольными животными не отмечено.

В опыте по изучению острой ингаляционной токсичности (ЛК₅₀) на белых мышах установлено, что она составляла 2000 мл/м³, максимально недействующая доза – 1500 мл/м³.

Ингаляционные обработки белых мышей в герметических камерах в течение 20 дней из расчета 1/10 и 1/20 ЛК₅₀ в виде 3%-ного водного раствора не вызывали изменений в поведении, общем состоянии и поедаемости корма. При вскрытии животных после окончания опыта у некоторых подопытных мышей, обрабатываемых дозой из расчета 1/10 ЛК₅₀, в легких отмечалась застойная гиперемия, в других внутренних органах видимые изменения отсутствовали. В контрольной группе мышей отклонений от нормы не обнаружено.

Для выявления влияния аэрозольных обработок на организм животных на протяжении длительного времени был проведен дополнительный опыт на 16 морских свинках весом 530–620 г. Опыт проводился в течение 60 суток.

Процедуру проводили в герметичных камерах объемом 1 м³. Животных разделили на 3 группы – 2 опытные (ОГ) и контрольная. Первую ОГ через день обрабатывали 3%-ным раствором препарата из расчета 20 мл/м³, вторая ОГ подвергалась обработке ежедневно в том же количестве и с той же концентрацией препарата. Контрольная группа обработкам не подвергалась. Экспозиция при обработках составляла 30 минут. Учитывали привесы животных, поведение, гематологические показатели, состояние видимых слизистых оболочек. В конце опыта проводили отбор проб внутренних органов для гистологических исследований.

Результаты опыта показали, что длительная аэрозольная обработка дезинфицирующим средством «Криокс» не вызывала у животных изменений в поведении и поедаемости корма, общем клиническом состоянии, изменении видимых слизистых оболочек. При вскрытии животных после окончания опыта видимые изменения отсутствовали, результаты гистосрезов органов опытных групп существенно не отличались от контрольной. Достоверных изменений гематологических показателей также не выявлено.

ВЫВОДЫ

1. Дезинфицирующее средство «Криокс» оказывает бактерицидное действие на тест-культуры *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* в 0,1%-ной концентрации при экспозиции 5 минут, на культуру *Bacillus subtilis* и грибы *Candida albicans* – в 0,5%-ной концентрации при такой же экспозиции, на культуру *Mycobacterium terra* – в концентрации 2 % и экспозиции 30 минут.

2. Среднесмертельная доза (ЛД₅₀) средства при внутрижелудочном введении составляет 3900 мг/кг, что соответствует 3-му классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76. Не обладает хронической токсичностью при внутрижелудочном введении.

3. Ингаляционная токсичность (ЛК₅₀) для белых мышей составляет 2000 мл/м³, хроническая ингаляционная токсичность в дозах 1/10 и 1/20 ЛК₅₀ не проявляется.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Каменская, Т. Н. Микробная обсемененность помещений на комплексе по откорму крупного рогатого скота и их аэрозольная санация в присутствии телят / Т. Н. Каменская, С. А. Лукьянич, Л. Л. Кривенок // *Экология и животный мир*. – 2017. – № 2. – С. 35–39.
2. Шандала, М. Г. Методологические проблемы современной дезинфектологии / М. Г. Шандала // *Актуальные проблемы дезинфектологии в профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний : материалы Всероссийской науч. конф., посвященной 100-летию со дня рождения В.И. Вашкова*. – М. : ИТАР-ТАСС, 2002 – 244 с.
3. Кривенок, Л. Л. Использование перекисного препарата для дезинфекции помещений и санации животных / Л. Л. Кривенок // *Животноводство и ветеринарная медицина*. – 2020. – № 4. – С. 17–21.
4. Высоцкий, А. Э. Биоцидная активность и токсикологическая характеристика дезинфицирующего препарата САНДИМ-Д / А. Э. Высоцкий // *Ветеринарная медицина Беларуси*. – 2005. – № 2. – С. 27–30.
5. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / А. Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.

УДК 619:615.28:614.48

Кривенок Л.Л., магистр ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», г. Минск, Республика Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ КОРРОЗИЙНОЙ АКТИВНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «КРИОКС»

Резюме

В статье изложены результаты исследования экологически чистого дезинфицирующего средства на основе стабилизированной перекиси водорода. В качестве стабилизатора использованы органические кислоты и модифицированная фосфоновая кислота. Описаны коррозионные свойства, стабильность средства при длительном хранении и его токсикологическая характеристика. Среднесмертельная доза (ЛД₅₀) дезинфицирующего средства при внутрижелудочном введении составляет 3900 мг/кг, что соответствует 3-му классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76.

Ключевые слова: перекись водорода, органические кислоты, коррозионные свойства, стабильность препарата.

Summary

The article presents the results of a study of an environmentally friendly disinfectant based on stabilized hydrogen peroxide. Organic acids and modified phosphonic acid were used as stabilizers. The corrosive properties, stability of the product during long-term storage and its toxicological characteristics are described. The average lethal dose (LD₅₀) of the disinfectant after intragastric administration is 3900 mg/kg, which corresponds to the 3rd hazard class according to GOST 12.1.007-76.

Keywords: hydrogen peroxide, organic acids, corrosion properties, stability of the preparation.

Поступила в редакцию 03.06.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее эффективных и экономически выгодных методов профилактики заболеваний животных является дезинфекция животноводческих помещений. Стоит отметить, что для её проведения в условиях хозяйства на данный момент разработано, внедрено и находится в продаже множество дезинфицирующих средств [1, 2, 3, 4]. Современные дезинфицирующие средства, как правило, представляют собой композицию на основе одного или

нескольких активнодействующих веществ с различными функциональными добавками [1, 5, 6].

Основная масса дезинфекционных средств может применяться в отсутствие животных, но освободить помещение от них не всегда возможно. Наиболее актуальна такая проблема для крупных животноводческих комплексов, где сам технологический период занимает много времени, поскольку нужно подобрать эффективный по отношению к микроорганизмам и безо-

пасный для животных препарат. На наш взгляд, такими качествами обладают препараты на основе перекиси водорода. Популярность перекиси водорода как противомикробного средства на практике связана еще и с тем, что ее растворы хорошо переносятся кожей и слизистой оболочкой, не накапливаются в организме при длительном применении, не оказывают токсического и аллергенного действия. Перекись водорода распадается во внешней среде с образованием молекул воды и кислорода, т.е. является экологически безопасной, обладает высоким спороцидным и фунгицидным действием и отсутствием привыкания у микроорганизмов [7, 8, 9, 10].

Средство дезинфицирующее «Криокс» разработано в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», состоит из перекиси водорода, надкислотных групп (продуктов каталитического взаимодействия уксусной и янтарной кислот), стабилизатора (секвион) и воды питьевой. Стабилизатором служит модифицированная фосфоновая кислота. Применяется в качестве комплексообразователя, ингибитора коррозии и ингибитора осаждения, устойчивого к окисляющим агентам, образует растворимые комплексы с ионами металлов; стабилизирует коллоидные системы; защищает металлические поверхности, контактирующие с жидкостями; не разлагается в водных растворах при экстремальных значениях pH и температуры. Среднесмертельная доза (LD₅₀) средства дезинфицирующего при внутрижелудочном введении составляет 3900 мг/кг, что соответствует 3-му классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76 [5].

Целью нашего исследования стало изучение коррозионной активности и стабильности дезинфекционного средства «Криокс» в условиях длительного хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для испытания коррозионных свойств растворов криокса брали образцы из листовой стали марки Ст-3, оцинкованной жести и алюминия марки А размером 50×20 мм и толщиной 1–4 мм. Контрольные пластины помещали в водопроводную воду. Образцы предварительно подготавливали – отполировывали мелкозернистой наждачной бумагой, промывали моющим средством, ополаскивали дистиллированной водой и просу-

шивали в течение 15 минут в сушильном шкафу при температуре 120 °С. Затем охлаждали и взвешивали на аналитических весах с точностью 0,0001 г. В стеклянные стаканы наливали рабочие 1- и 3%-ные растворы средства дезинфицирующего «Криокс» так, чтобы полностью покрыть тест-пластинку. Тест-пластинки образцов металлов (сталь, оцинкованная жесь и алюминий) закрепляли капроновой нитью на стеклянной палочке и погружали в растворы, чтобы они не касались стенок сосуда. Контрольные тест-пластинки помещались в водопроводную воду. Образцы тест-пластинок выдерживали при температуре 18–20 °С в течение 8 суток. Затем они извлекались из растворов дезинфицирующего средства, освобождались от коррозии, ополаскивались дистиллированной водой, высушивались в сушильном шкафу 15 минут при температуре 120 °С, охлаждались до комнатной температуры и взвешивались [11].

Стабильность препарата изучали по динамике изменений внешнего вида и цвета, концентрации водородных ионов (pH), концентрации перекиси водорода и надкислотных групп при температуре хранения от 0 °С до +25 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Коррозионную активность 1- и 3%-ных растворов средства дезинфицирующего по отношению к металлам определяли по изменению веса металла в результате коррозии, отнесенному к единице поверхности (потеря массы, Δm) и единице времени (скорость коррозии, K). Потерю массы (Δm), г/м², рассчитывали по формуле 1:

$$\Delta m = (P_1 - P_2) : S, \quad (1)$$

где Δm – потеря массы, г/м²;
P₁ – начальная масса тест-пластинки, г;
P₂ – масса пластинки после испытания, г;
S – площадь поверхности тест-пластинки, м².
Скорость коррозии металла (K), г/м² сут., рассчитывали по формуле 2:

$$K = \Delta m : t, \quad (2)$$

где K – скорость коррозии, г/м² сут.;
Δm – потеря массы, г/м²;
t – продолжительность испытаний, сут.

Установлено, что 1- и 3%-ные растворы средства дезинфицирующего оказыва-

ют умеренное коррозионное действие на образцы стали и оцинкованной жести и обладают слабой коррозионной активностью в отношении образца алюминия. Так, в среднем при воздействии препарата с концентрацией 1 % потеря массы образцов из стали составила 0,0829 г, при 3%-ной концентрации – 0,1228 г, скорость коррозии составила 5,18 и 7,68 г/м² в сутки соответственно. В отношении оцинкованной жести – 0,0948 и 0,1488 г, скорость коррозии – 5,93 и 9,3 г/м² в сутки соответственно. Потеря массы тест-пластины из алюминия при воздействии 1- и 3%-ными растворами дезинфицирующего средства соста-

вила 0,0005 и 0,0008 г, скорость коррозии – 0,03 и 0,05 г/м² в сутки соответственно.

Стабильность препарата изучали в динамике в течение 15 месяцев. От партии произведенного препарата были отобраны образцы препарата, которые проверялись на соответствие следующим показателям: внешний вид и цвет; концентрация водородных ионов (рН); массовая доля перекиси водорода (%); массовая доля надкислотных групп (%). Результаты опыта отражены в таблице 1 при условии хранения средства дезинфицирующего при температуре +25 °С, в таблице 2 – при температуре 0 °С.

Таблица 1 – Результаты изучения стабильности средства дезинфицирующего «Криокс», хранящегося при температуре +25 °С

Наименование показателя	Показатель	Сроки испытаний (месяцы)					
		0*	3	6	9	12	15
Внешний вид, цвет	прозрачная бесцветная жидкость	прозрачная бесцветная жидкость					
Концентрация водородных ионов, рН	1,0±0,5	1,1	1,12	1,15	1,2	1,27	1,33
Массовая доля перекиси водорода, %	не менее 20,0	25,6	24,8	23,6	22,4	21,2	19,3
Массовая доля надкислотных групп, %	не менее 2,0	2,85	2,81	2,77	2,72	2,64	2,57

*Примечание – *показатели средства при изготовлении*

Из таблицы 1 видно, что средство оставалось стабильным на протяжении 12 месяцев. При исследовании через 15 меся-

цев было установлено снижение концентрации массовой доли перекиси водорода до 19,3 %.

Таблица 2 – Результаты изучения стабильности средства дезинфицирующего «Криокс», хранящегося при температуре 0 °С

Наименование показателя	Показатель	Сроки испытаний (месяцы)					
		0*	3	6	9	12	15
Внешний вид, цвет	прозрачная бесцветная жидкость	прозрачная бесцветная жидкость					
Концентрация водородных ионов, рН	1,0±0,5	1,1	1,11	1,14	1,18	1,25	1,3
Массовая доля перекиси водорода, %	не менее 20,0	25,6	25,3	24,4	23,7	22,6	19,9
Массовая доля надкислотных групп, %	не менее 2,0	2,85	2,82	2,78	2,75	2,67	2,61

*Примечание – *показатели средства при изготовлении*

При хранении средства дезинфицирующего при температуре 0 °С также отмечены его стабильность в течение 12 месяцев и снижение концентрации массовой доли перекиси водорода до 19,9 % на протяжении 15 месяцев хранения.

Согласно полученным результатам показатели дезинфицирующего средства

«Криокс» на протяжении 12 месяцев хранения при температуре от 0 °С до +25 °С соответствуют требованиям и только через 15 месяцев было выявлено снижение массовой доли перекиси водорода.

Использование в рецептуре криокса стабилизатора в виде модифицированной фосфоновой кислоты (секвион) позволило

предотвратить нежелательные реакции, например, окисление металлов. Помимо этого, был получен синергетический эффект, выразившийся в повышении биоцидных свойств надкислот и перекиси водорода, снижении коррозионных свойств обрабатываемых поверхностей и увеличении стабильности средства [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что 1- и 3%-ные растворы средства дезинфицирующего «Криокс» оказывают умеренное коррозионное действие по отношению к образцам из стали и оцинко-ванной жести и обладают слабой коррозионной активностью в отношении образца алюминия. Так, в среднем при воздействии препарата с концентрацией 1 % потеря массы образцов из стали составила 0,0829 г, при 3%-ной концентрации – 0,1228 г, скорость коррозии – 5,18 и 7,68 г/м² в сутки соответственно. В отношении оцинкованной жести – 0,0948 и 0,1488 г,

скорость коррозии – 5,93 и 9,3 г/м² в сутки соответственно. Потеря массы тест-пластины из алюминия при воздействии 1- и 3%-ными растворами дезинфицирующего средства составила 0,0005 и 0,0008 г, скорость коррозии – 0,03 и 0,05 г/м² в сутки соответственно.

Выбор в качестве действующего вещества перекиси водорода позволил получить композицию с широким спектром антимикробного действия, быстро разлагающуюся во внешней среде на нетоксичные компоненты, не требующие смывания.

Использование в рецептуре дезинфицирующего средства «Криокс» стабилизатора в виде модифицированной фосфоновой кислоты (секвион) позволило получить синергетический эффект, выразившийся в снижении коррозионной активности при воздействии на обрабатываемые металлические поверхности и увеличении стабильности средства, что позволяет удвоить срок его хранения до 12 месяцев.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Шандала, М. Г. *Методологические проблемы современной дезинфектологии* / М. Г. Шандала // *Актуальные проблемы дезинфектологии в профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний : материалы Всероссийской науч. конф., посвященной 100-летию со дня рождения В.И. Васильева*. – М. : ИТАР-ТАСС, 2002 – 244 с.
2. Каменская, Т. Н. *Микробная обсемененность помещений на комплексе по откорму крупного рогатого скота и их аэрозольная санация в присутствии телят* / Т. Н. Каменская, С. А. Лукьянчик, Л. Л. Кривенок // *Экология и животный мир*. – 2017. – № 2. – С. 35–39.
3. *Аэрозоли в профилактике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных* / Ю. И. Боченин [и др.] // *Ветеринарный консультант*. – 2004. – № 23–24. – С. 10–18.
4. *Ветеринарная санитария: учеб. пособие* / А. А. Сидорчук [и др.]. – СПб. : Издательство «Лань», 2011. – 386 с.
5. *Средство дезинфицирующее «Криокс» – эффективный дезинфектант для санации объектов ветеринарного надзора* / Т. Н. Каменская [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 2. – С. 52–58.
6. Шкарин, В. В. *Дезинфекция. Дезинсекция и дератизация* / В. В. Шкарин. – Н. Новгород : изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. – 580 с.
7. Кривенок, Л. Л. *Антимикробная активность и токсикологические свойства средства дезинфицирующего «Криокс»* [Электронный ресурс] / Л. Л. Кривенок, Т. Н. Каменская, С. А. Лукьянчик // *Вестник Вятского ГАТУ. Сельскохозяйственные науки*. – 2022. – № 3-(13). – Режим доступа: https://v-vgsha.info/wpcontent/uploads/journal/2022/3/N3_2022_krivenoc_antimicrobnaya/ - Дата доступа: 29.09.2022.
8. Высоцкий, А. Э. *Биоцидная активность и токсикологическая характеристика дезинфицирующего препарата САНДИМ-Д* / А. Э. Высоцкий // *Ветеринарная медицина Беларуси*. – 2005. – № 2. – С. 27–30.
9. *Использование дезинфектанта «Пермокс» для санации животноводческих помещений* / А. А. Богуш [и др.] // *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр.* – Вып. 12, ч. 1. – Горки, 2009. – С. 221–227.
10. *Санация поверхностей и воздушной среды животноводческих объектов дезинфицирующим средством «Пермокс»* / А. А. Богуш [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2011. – № 1. – С. 63–69.
11. Высоцкий, А. Э. *Коррозионное действие отечественных дезинфекционных препаратов: в 2 ч.* / А. Э. Высоцкий // *Ученые записки ВГАВМ : сб. науч. тр. / УО ВГАВМ*. – Витебск, 2008. – Т. 44, ч. 1. – С. 32–36.



XXXIV МЕЖДУНАРОДНАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА BELAGRO-2024



С 4 по 9 июня 2024 г. в выставочном центре Китайско-Белорусского промышленного парка «Великий Камень» прошла Белорусская агропромышленная неделя, в рамках которой проводилась XXXIV Международная специализированная выставка «Белагро-2024».

Выставка стала брендом страны, объединив вокруг себя множество предприятий и организаций. На «Белагро-2024» представлены отечественные достижения в области агропромышленного комплекса, а также эксклюзив от Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, Казахстана, Монголии, Германии, Китая, Турции. Всего в этом году в выставке приняли участие 490 компаний из 11 стран. В рамках выставки проведены деловые встречи, семинары и конференции, конкурсы и мастер-классы. В списке ключевых тем – аграрное образование, перспективные разработки белорусских ученых для АПК и многое другое.

Входящий в состав Научно-практического центра НАН Беларуси по животноводству Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского представил более 50 макетов вакцин для профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций животных, противопаразитарных, лечебно-профилактических препаратов и стимуляторов иммунной системы, дезинфицирующих средств и диагностикумов, демонстрационный улей с пчелами. В экспозиции широко представлена печатная продукция: каталог производимых вакцин и препаратов, буклет института, журналы, сборники, рекламные брошюры, флаеры, визитки и др.

Посетителям были представлены для ознакомления препараты-новинки, разработанные в 2023–2024 гг.:

- вакцина для профилактики рота- и коронавирусной инфекции, колибактериоза и клостридиоза телят «ВироКолиКлост» поливалентная инактивированная;
- вакцина инактивированная для профилактики болезни Ньюкасла у домашних птиц и голубей «Колньювак Плюс»;
- вакцина для профилактики пастереллеза, бордетеллеза и миксоматоза кроликов «Респимикс»;
- вакцина инактивированная для профилактики рота- и коронавирусной инфекции, вирусной диареи и колибактериоза крупного рогатого скота «ВироКолиВак»;

- вакцина «Колитокс-ЛТ» инактивированная эмульгированная для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза крупного рогатого скота;
- препараты ветеринарные «Мастин», «А-Маст», «Метрафарм», «Нуклеозан», «Поликокс», «Энтероглоб», «Пероксисорбофит».

Особый интерес у посетителей вызвала приманка антирабическая «Белраборал» для пероральной иммунизации плотоядных животных против бешенства, не имеющая аналогов в мире.

Экспозицию Института посетило большое количество специалистов ветеринарного профиля Республики Беларусь, ближнего и дальнего зарубежья. Ученые института давали квалифицированные консультации по всем интересующим гостей вопросам.

На официальной церемонии закрытия выставки состоялось подведение итогов. Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского награжден дипломами Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, а также компании-организатора «МинскЭкспо» за представление инновационных разработок в сфере агропромышленного комплекса и активное участие в 34-й Международной специализированной выставке «БЕЛАГРО-2024».

