

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

На правах рукописи

МАКАВЧИК СВЕТЛАНА АНАТОЛЬЕВНА

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА,
ВЫЗВАННЫЕ ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ
(ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА)**

Диссертация на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с
микотоксикологией и иммунология

06.02.03- ветеринарная фармакология с токсикологией

Научные консультанты:
доктор биологических наук, профессор,
А.А. Сухинин
доктор ветеринарных наук, профессор,
академик РАН,
С.В. Енгашев

Санкт-Петербург, 2021

ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	19
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1 Бактериальные болезни, ассоциированные с антибиотикорезистентными возбудителями и их значение в современной структуре инфекционной патологии животных.....	19
1.2 Факторы, влияющие на активизацию условно-патогенной микрофлоры и рост числа полирезистентных инфекций у животных	32
1.2.1 Иммунодефициты	32
1.2.2 Механизмы защиты микроорганизмов от иммунного ответа	39
1.2.3 Факторы, способствующие селекции и распространению антибиотикорезистентных микроорганизмов.....	41
1.3 Критерии этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов и современные методы идентификации	52
1.3.1 Критерии этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов.....	52
1.3.2 Показания к проведению идентификации возбудителей инфекций животных протеометрическим и молекулярно-генетическим методами.....	55
1.4 Антибиотикорезистентность микроорганизмов как основа выбора рационального антимикробного лечения	61
1.4.1 Фенотипическая и генотипическая резистентность к антимикробным препаратам.....	61
1.4.2 Характеристика антибиотикорезистентных условно-патогенных возбудителей бактериальных болезней животных и лабораторные методы выявления фенотипов и маркеров антибиотикорезистентности	64
1.4.2.1 Представители <i>Enterobacteriaceae</i> , продуцирующие карбапенемазы (CPE).....	69
1.4.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , устойчивые к карбапенемам.....	71
1.4.2.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , обладающие множественной	

лекарственной устойчивостью	73
1.4.2.4 <i>Acinetobacter spp.</i> , устойчивые к карбапенемам.....	75
1.4.2.5 Энтеробактерии, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра.....	77
1.4.2.6 <i>Staphylococcus spp.</i> , устойчивые к β -лактамным антибиотикам.....	82
1.4.2.7 <i>Enterococcus spp.</i> , устойчивые к ванкомицину.....	88
1.5 Принципы рационального применения антимикробных препаратов (АМП) в ветеринарной практике	89
1.6 Монотерапия и комбинированное назначение антибактериальных препаратов.....	103
1.7 Борьба с лекарственно устойчивыми бактериями в ветеринарной практике и профилактика их распространения	109
1.8 Заключение по обзору литературы	118
ГЛАВА 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	123
2.1 Материалы и методы исследования	123
2.1.1 Материалы исследования	123
2.1.2 Методы исследования	126
2.1.2.1 Бактериологические методы.....	126
2.1.2.1.1 Микроскопический метод.....	126
2.1.2.1.2 Метод культивирования микроорганизмов.....	126
2.1.2.1.3 Метод идентификации микроорганизмов с учетом биохимических свойств.....	126
2.1.2.1.4 Определение гипермукоидного фенотипа у микроорганизмов.....	128
2.1.2.1.5 Определение вирулентных свойств культур микроорганизмов для лабораторных животных	128
2.1.2.2 Видовая идентификация микроорганизмов методом MALDI–TOF–MS анализа выделенных чистых культур микроорганизмов.....	128
2.1.2.3 Молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики.....	129
2.1.2.4 Определение и анализ результатов чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам	132

2.1.2.5 Фармако-токсикологические свойства антимикробного препарата Азициклина.....	138
2.1.2.5.1 Изучение антимикробной активности препарата Азициклина.....	138
2.1.2.5.2 Определение острой и субхронической токсичности Азициклина...	139
2.1.2.5.3 Определение раздражающего и аллергического действия препарата Азициклина	141
2.1.2.5.4 Исследование терапевтической эффективности препарата Азициклина при лечении телят с болезнями органов дыхания	142
2.1.2.6 Статистический анализ.....	143
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	144
2.2.1 Результаты выявления и идентификации бактериологическим методом условно-патогенных микроорганизмов с атипичными свойствами, изолированных от крупного рогатого скота,	144
2.2.1.1 Фенотипическая характеристика выделенных грамположительных микроорганизмов.....	145
2.2.1.2 Фенотипическая характеристика выделенных грамотрицательных микроорганизмов	152
2.2.1.3 Результаты выявления и идентификации бактериологическим методом изолятов кампилобактерий.....	164
2.2.1.4 Результаты выявления и идентификации бактериологическим методом изолятов микоплазм.....	167
2.2.2 Применение MALDI–TOF–MS анализа для видовой идентификации и дифференциации микроорганизмов с атипичными биологическими свойствами, изолированных от животных.....	177
2.2.3 Молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование) в лабораторной диагностике бактериальных инфекций животных.....	180
2.2.3.1 Апробация микрочиповой системы с лиофилизированными реактивами для молекулярно-биологических исследований в производственных условиях.....	180
2.2.3.1.1 Состав и характеристика наборов микрочипов с диагностической	

лиофилизированной тест-системой	180
2.2.3.1.2 Оценка диагностических возможностей и апробация в лабораторных условиях ПЦР в режиме реального времени в формате микрочипов с лиофилизированными реактивами.....	184
2.2.3.1.3 Методологические подходы к созданию диагностических панелей для молекулярно-биологического выявления условно-патогенных микроорганизмов, изолированных от животных.....	187
2.2.3.1.4 Метод секвенирования в структуре лабораторной диагностики бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных.....	193
2.2.3.1.4.1 Результаты применения метода секвенирования для выявления и идентификации бактерий <i>Mycoplasma bovis</i>	193
2.2.3.1.4.2 Результаты филогенетического анализа при молекулярно-генетическом исследовании бактерий <i>Mycoplasma bovis</i>	197
2.2.3.1.5 Дифференцированный подход и рациональное применение молекулярно-генетических методов	199
2.2.4 Результаты мониторинга возбудителей бактериальных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ.....	209
2.2.4.1 Спектр микроорганизмов органов репродукции крупного рогатого скота.....	209
2.2.4.2 Особенности этиологии инфекционно-воспалительных болезней (ИВБ) у телят.....	214
2.2.4.3 Спектр микроорганизмов при инфекционных маститах коров.....	218
2.2.5 Микробиологические основы рациональной фармакотерапии животных.....	224
2.2.5.1 Результаты антибиотикорезистентности условно-патогенных грамположительных микроорганизмов	224
2.2.5.2 Результаты антибиотикорезистентности условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов	233

2.2.5.3	Лабораторный контроль механизмов резистентности к антимикробным препаратам для микроорганизмов, изолированных от крупного рогатого скота.....	240
2.2.6	Фармако-токсикологические испытания препарата Азициклина.....	250
2.2.6.1	Характеристика антимикробного препарата Азициклина и его антимикробная активность.....	250
2.2.6.2	Изучение острой токсичности препарата Азициклина.....	254
2.2.6.3	Изучение субхронической токсичности препарата Азициклина.....	256
2.2.6.4	Раздражающее и аллергическое действие препарата Азициклина.....	260
2.2.7	Терапевтическая эффективность применения препарата Азициклина при бактериальных болезнях телят.....	262
2.2.7.1	Результаты терапевтической эффективности применения препарата Азициклина при остром бронхите телят бактериальной этиологии	262
2.2.7.2	Результаты терапевтической эффективности применения препарата Азициклина при хронической бронхопневмонии и серозно-катаральной пневмонии телят.....	264
2.2.7.3	Влияние антибактериального препарата Азициклина на клинические и биохимические показатели крови здоровых и больных телят с респираторной патологией.....	268
2.2.8	Экономическая эффективность от применения оптимальных схем лечения при бактериальных инфекциях крупного рогатого скота.....	271
3	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	275
4	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	299
5	РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	302
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	306
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	308
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	342

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время среди сельскохозяйственных животных широко распространены болезни, ассоциированные с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ). Причиной развития тяжелых, хронических форм болезней служат нарушения адаптационных механизмов; иммунодефицитные состояния, вызванные действием вирусов и нерациональным применением антибактериальных препаратов (АМП), что приводит к значительному экономическому ущербу [13, 34, 39, 40, 95, 108, 142].

На актуальность данной проблемы указывает «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» (Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р).

В современной инфекционной патологии продуктивных животных характерно увеличение удельного веса возбудителей с атипичными свойствами метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA), *E. coli*, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), гипервирулентных *Klebsiella pneumoniae* (hvKp –hypervirulent *K. pneumoniae*), распространение возбудителей, которые редко встречались раньше (*Stenotrophomonas maltophilia* и др.) [37, 169, 225].

По данным отечественных и зарубежных авторов *Ureaplasma diversum* и *Mycoplasma bovis* являются важной и значительной частью бактериальных инфекций, вызывающих нарушения в репродуктивной системе, контагиозные микоплазменные маститы, атипичные микоплазменные и уреаплазменные пневмонии у крупного рогатого скота. Персистенция микроорганизмов ведет к хроническому или латентному течению инфекционного процесса, значительному применению АМП и появлению антибиотикорезистентных микроорганизмов, что снижает эффективность лечения и профилактики бактериальных инфекций животных [24, 26, 160, 170, 171, 225].

Так же осложняют диагностику, проведение профилактики и своевременное лечение разнообразный видовой спектр микроорганизмов, формирование ими в организме микробных биопленок, трудно культивируемых и атипичных форм возбудителей [30, 31, 132, 146].

Несвоевременно поставленный диагноз приводит к нерациональному применению АМП и к формированию антибиотикорезистентности, механизм которой довольно разнообразен: продукция бета-лактамаз расширенного спектра и хромосомные бета-лактамазы, инактивирующие ферменты, различные биохимические механизмы блокирования антимикробных препаратов. В настоящее время отмечается возрастание роли полирезистентных микроорганизмов в этиологии бактериальных инфекций [193, 169, 198].

Инфекции животных, вызванные полирезистентными микроорганизмами с атипичными биологическими свойствами, отличаются более тяжелым, хроническим или латентным течением, что увеличивает продолжительность лечения [39, 120, 123, 157, 158].

Для успешной фармакотерапии животных важным является видовая идентификация возбудителей, анализ антибиотикограмм и интерпретация результатов, лабораторный контроль за механизмами антибиотикорезистентности микроорганизмов. Это необходимо ветеринарным врачам для осуществления рационального подбора антибактериальных препаратов, их ротации и прогнозирования клинической эффективности. В животноводческих хозяйствах антимикробная терапия чаще, чем другие виды лечения требует пересмотра лечебной эффективности [59, 95, 111, 134, 135, 193, 266, 379].

Распространенность полирезистентных возбудителей бактериальных инфекций крупного рогатого скота, необходимость совершенствования методов диагностики, лечебно-профилактических мероприятий и изыскания новых высокоэффективных АМП стали предпосылками выбора направления научных исследований.

Степень разработанности темы исследования. Для полирезистентных условно-патогенных возбудителей бактериальных инфекций характерны

экологическая и фенотипическая пластичность, полиадаптивность, полипатогенность, политропность, полигостальность [64].

Микроорганизмы способны приобретать атипичные биологические свойства, в результате покидать природные биотопы, преодолевать межвидовые барьеры, передавать антимикробную резистентность.

Многие авторы отмечают значительный рост антибиотикорезистентных условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с метициллинрезистентными *S. aureus* (MRSA), *K. pneumoniae* и *E. coli*, продуцирующими β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), способных оказывать влияние на течение и исход болезни [59, 153, 169, 189, 198, 238, 229, 262].

Изучению этиологической значимости возбудителей *Ureaplasma diversum* и *Mycoplasma bovis* при атипичных пневмониях и инфекционных маститах крупного рогатого скота (КРС) посвящены работы как отечественных так и зарубежных исследователей. В рутинной работе ветеринарных лабораторий чаще проводят идентификацию этих возбудителей до рода или семейства, что связано со сложностью их выделения. В то же время видовая идентификация условно-патогенных возбудителей важна при проведении мониторинговых исследований, оценке этиологического значения инфекционного агента, выборе антимикробного препарата, при изучении механизмов резистентности с целью рациональной фармакотерапии животных [21, 24, 81, 225, 251, 305, 330].

А.С. Лабинская (2010); Т.В. Припутневич (2015); Н.А. Безбородова (2017); N. Anderson (2012) и другие исследователи указывают на эффективность идентификации условно-патогенных возбудителей с использованием ПЦР и с помощью MALDI-TOF-MS. Несмотря на многочисленные исследования в отечественной и зарубежной литературе, видовая идентификация некоторых патогенных микроорганизмов (коринебактерий, микоплазм и др.), изолированных от крупного рогатого скота, в условиях ветеринарных лабораторий не проводится [13, 86, 146, 209].

Необходимо постоянное совершенствование комбинаций лабораторных методов исследований полирезистентных возбудителей бактериальных болезней с применением инновационных технологий; изучение механизмов антибиотикорезистентности для рационального использования АМП в ветеринарной практике и для профилактики формирования и распространения антимикробной резистентности (АМР) микроорганизмов.

Вышеизложенное является приоритетным направлением данного научного исследования, послужило основанием для постановки цели и формирования задач данной работы.

Цель исследования: обосновать алгоритмы микробиологической диагностики, лечения и профилактики бактериальных инфекций крупного рогатого скота, вызванных полирезистентными микроорганизмами.

Задачи исследования:

1. Обосновать целесообразность использования MALDI–TOF–MS анализа и молекулярно-генетических (ПЦР, секвенирование) технологий в системе микробиологического мониторинга микроорганизмов у животных с инфекционной патологией бактериальной этиологии.

2. Апробировать микрочиповую систему для обнаружения нуклеиновых кислот с лиофилизированными реактивами для молекулярно-генетических исследований в производственных условиях.

3. Провести микробиологический мониторинг возбудителей инфекционного мастита, изучить видовой состав и биологическую активность возбудителей бактериальных инфекций, циркулирующих в животноводческих комплексах.

4. Изучить этиологическую структуру урогенитальных микроорганизмов при репродуктивной патологии крупного рогатого скота.

5. Выявить микробную этиологию инфекционно-воспалительных болезней (ИВБ) у телят.

6. Установить видовой спектр микроорганизмов с атипичными биологическими свойствами как стратегию формирования антибиотикорезистентности.

7. Изучить устойчивость микроорганизмов к антимикробным препаратам, и применить ранжирование, экстраполирование, выборочное репортирование АМП, лабораторные методы контроля клинически значимых механизмов резистентности микроорганизмов для профилактики их распространения.

8. Изучить фармако-токсикологические свойства комплексного антибактериального препарата Азициклина.

9. Провести клинические испытания препарата Азициклина в условиях животноводческих комплексов.

Научная новизна работы. По результатам лабораторного мониторинга получены новые данные о распространении возбудителей с атипичными биологическими свойствами и с множественной лекарственной резистентностью (гипервирулентных *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС и др.).

Впервые на региональном уровне выделен патогенный и полирезистентный эмерджентный микроорганизм *Stenotrophomonas maltophilia*.

Установлен феномен появления свойств полирезистентности к антибактериальным препаратам, гипермукоидности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae*.

Данный штамм *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae* депонирован в коллекции микроорганизмов ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ») регистрационный номер ВКШМ-Б-288М.

Получены новые сведения о циркулирующих урогенитальных микоплазмах *Mycoplasma bovis*, как этиологически важных атипичных возбудителей в респираторной патологии телят (атипичных бронхопневмоний, ринитов, кератоконъюнктивитов) и контагиозных маститных инфекциях животных в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ.

Выделенный штамм *Campylobacter fetus subsp.fetus* использован для разработки способа инактивации возбудителя кампилобактериоза крупного

рогатого скота и способа получения гидроокись алюминиевой масляной тео-вакцины против кампилобактериоза.

Научная новизна подтверждена 3 патентами РФ:

- патент на способ инактивации возбудителя кампилобактериоза крупного рогатого скота № 2642249, зарегистрированный в Государственном реестре РФ 24 января 2018 г;

- патент на способ получения гидроокись алюминиевой масляной тео-вакцины против кампилобактериоза № 2644654, зарегистрированный в Государственном реестре РФ 13 февраля 2018 г;

- патент на штамм *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae*, обладающий способностью к биопленкообразованию № 2733144, зарегистрированный в Государственном реестре РФ 29.09.2020 г.

Оптимизированы алгоритмы диагностики, лечения и профилактики оппортунистических инфекций крупного рогатого скота. Впервые апробированы методологические подходы к созданию диагностических панелей для молекулярно-генетического выявления УПМ в скрининговых исследованиях.

Обоснована целесообразность использования MALDI–TOF–MS анализа и молекулярно-генетических технологий (ПЦР, секвенирование) в системе микробиологического мониторинга у животных с инфекционной патологией бактериальной этиологии.

Полученные данные по спектру выделенных микроорганизмов и их полирезистентности загружены в таблицы Excel в платформу AMRcloud для последующего комплексного анализа и систематизации (Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, МАКМАХ), которая позволяет анализировать и визуализировать данные о чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов (<https://app.amrcloud.net/rus/?id=381a79f79178a9e4fbec1b6ea14ec55d&direct=T>).

Проведены клинические и доклинические исследования Азициклина. Теоретически и экспериментально обосновано применение антибактериального препарата Азициклина на основе Доксициклина, Азитромицина и Эмиданола.

Впервые на основе результатов экспериментальных исследований дана фармако-токсикологическая характеристика, доказывающая возможность безопасного использования лекарственного средства в терапевтических дозах и проведена оценка эффективности лечения бактериальных инфекций с учетом атипичных, персистирующих, труднокультивируемых и некультивируемых форм бактерий.

Материалы исследований Азициклина используют в ООО НВЦ «Агроветзащита» для разработки нормативно-технической документации.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследований.

Мониторинг эпизоотической ситуации бактериальных инфекций крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ позволяет расширить представление о видовом разнообразии микроорганизмов с учетом атипичных, сложно культивируемых форм.

Результаты бактериологических, молекулярно-генетических, протеометрических исследований этиологически значимых бактерий с атипичными свойствами являются основой для усовершенствования мероприятий по лечению и профилактике бактериальных инфекций.

Результаты проведенных исследований апробированы и оформлены в виде методических рекомендаций:

- «Методические рекомендации по профилактике и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц» (одобрены и рекомендованы к изданию научно-техническом Советом при Комитете по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области, протокол № 2 от 10.02.2017 г).

- «Методические рекомендации по диагностике и профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота» (одобрены ученым советом ФГБОУ ВО СПбГАВМ и утверждены Заместителем Председателя Правительства, председателем комитета по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области 30.05.2017 г).

- «Лабораторные методы диагностики инфекций, вызываемых *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*» (методические рекомендации

одобрены и рекомендованы к изданию Комитетом по ветеринарии Псковской области, от 30.04.2020 г).

Апробирована ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, основанной на использовании наборов микрочипов с лиофилизированными тест-системами, что позволяет ветеринарным специалистам в короткие сроки определить спектр выделяемой микрофлоры. Результаты работы были использованы ГК «Люмэкс» в дальнейшей работе по усовершенствованию преаналитического и аналитического этапа.

Выделенные возбудители *Campylobacter fetus subsp. fetus* и *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* рекомендованы к использованию в качестве производственных штаммов при изготовлении биологических препаратов, а также в качестве референтных при изучении механизмов устойчивости к антимикробным препаратам.

Своевременное выявление бета-лактамаз имеет важное практическое и теоретическое значение для корректировки рекомендаций по фармакотерапии бактериальных инфекций.

Теоретические и практические разработки диссертационной работы используются в учебном процессе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»; ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого»; ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья»; ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина; ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э Баумана».

Материалы изучения Азициклина использованы ООО НВЦ «Агроветзащита» для дальнейших разработок, создания новых форм и модификаций препарата.

Методология и методы исследования. Методологические подходы в решении задач основаны на биологических особенностях возбудителей бактериальных болезней и проявления инфекционного процесса. При выборе

методов исследования учтены особенности культивирования, идентификации, определения чувствительности к АМП и обнаружение механизмов антибиотикорезистентности микроорганизмов.

Для проведения использовали следующие методы:

- микроскопические – использование светового микроскопа с целью изучения морфологических и тинкториальных свойств;
- метод получения чистых культур - изучение культурально-биохимических свойств;
- биологические – изучение патогенных и вирулентных свойств;
- протеомные методы – применение MALDI-TOF масс - спектрометрии для идентификации микроорганизмов с атипичными биологическими свойствами;
- молекулярно-генетические методы – полимеразная цепная реакция (ПЦР) классическая и в режиме реального времени, секвенирование;
- методы определения чувствительности и резистентности к антимикробным препаратам (АМП) – диск-диффузионный метод, метод серийных разведений, метод синергизма двойных дисков с ингибиторами ферментов - клавулановой кислотой;
- фармако-токсикологические – доклинические и клинические исследования, изучение безвредности и эффективности действия препаратов на организм животных;
- статистические – обработка полученного цифрового материала с использованием метода вариационной статистики и применением критерия погрешности по Стьюденту, Биостатистика, AMRcloud платформы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Комплексная лабораторная диагностика бактериальных болезней животных на основе бактериологических, протеометрических (MALDI-TOF-MS) и молекулярно-генетических методов (ПЦР, секвенирование) для достоверной оценки видового состава микроорганизмов. Данный алгоритм позволит повысить результативность эпизоотологического надзора за возбудителями инфекционных болезней с атипичными свойствами.

2. Микрочиповая система с лиофилизированными реактивами для одновременного обнаружения нуклеиновых кислот разных возбудителей, их видовой идентификации и дифференциации при едином режиме амплификации позволит ускорить выявление инфекционных агентов и повысить качество диагностики бактериальных инфекций в производственных условиях.

3. Методологические подходы выявления атипичных, сложно культивируемых и персистентных форм условно-патогенных микроорганизмов с использованием диагностических панелей для скринингового молекулярно-биологического их выявления позволят эффективно управлять динамикой течения инфекционного процесса, проводить своевременную фармакотерапию.

4. Разнообразный видовой спектр микроорганизмов, изолированных при респираторной, репродуктивной патологии и из секрета молочной железы при инфекционных маститах крупного рогатого скота, характеризующихся высокой частотой встречаемости и распространения, имеющих существенное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение. Спектр изолированных возбудителей с атипичными биологическими свойствами характеризуется одновременно антибиотикорезистентностью и вирулентностью.

5. Результаты антибиотикограмм, лабораторного контроля за механизмами антибиотикорезистентности у полирезистентных возбудителей бактериальных инфекций, ранжирование и выборочное репортирование являются основой выбора рационального антимикробного лечения по предотвращению и распространению резистентных микроорганизмов.

6. Результаты проведенных фармако-токсикологических исследований и клинических испытаний комплексного антибактериального препарата Азициклина дают возможность разработки и применения схем лечебных мероприятий в животноводческих хозяйствах.

Степень достоверности и апробация работы. Для решения поставленных задач в работе использованы современные средства и методы проведения анализа. Результаты исследования достоверны, что определяются достаточным объемом выборки анализируемых данных и их адекватной статистической обработкой.

Научные положения документированы таблицами, рисунками и диаграммами. Сделанные выводы строго обоснованы и вытекают из результатов проведенных исследований.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на ежегодных отчетных научных и учебно-методических конференциях профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (Санкт-Петербург, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020). Основные результаты диссертационной работы доложены на научных конференциях: 7-м Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием - 2015 (Москва); II международном Ветеринарном Конгрессе International VETistanbul Group Congress-2015 (Санкт-Петербург); Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни - актуальные проблемы, методы борьбы и профилактика», 2015 (Москва); Всероссийской научно-практической конференции «Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии», 2015 (Санкт-Петербург); 7 International Conference Global Science and Innovation», 2016 (Чикаго, США); 4-ом Европейском конгрессе Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (EAVLD), 2016 (Прага, Чехия); Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016 (Владимир); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва), Всероссийской научно-практической конференция «Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии», 2017 (Санкт-Петербург); Всероссийском Конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии XXI Кашкинские чтения, 2018 (Санкт-Петербург), Всероссийской научно-практической конференции к 95-летию кафедры микробиологии ВМА им.Кирова. Микробиология: от микроскопа до геномного анализа, 2018 (Санкт-

Петербург), Международная научная конференция профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ, 2019 (Санкт-Петербург); Всероссийском Конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии. XXI Кашкинские чтения, 2018, 2020 (Санкт-Петербург).

Личный вклад автора состоит в отборе проб, проведении диагностических, доклинических и клинических исследований. Автор осуществлял постановку и выполнение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных результатов, участвовал в написании статей, патентов, подготовке докладов и выступлений на конференциях, а также в апробации производственных результатов. Часть исследований проведена и опубликована в соавторстве. Соавторы не имеют возражений против использования в данной работе материалов совместных исследований, что подтверждено справками.

Публикации. Материалы диссертационной работы легли в основу 35 научных работ, 24 из которых опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России в Перечене российских рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации, статья в журнале из международной базы данных Web of Science Core Collection и Scopus, а также 3 патентах.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 370 страницах компьютерного текста, включает в себя введение, обзор литературы, основную часть, заключение, список сокращенных терминов, список используемой литературы и приложения, иллюстрирована 63 рисунками, 44 таблицами. Список использованной литературы включает 396 источников, из них 191 на иностранных языках.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Бактериальные болезни, ассоциированные с антибиотикорезистентными возбудителями и их значение в современной структуре инфекционной патологии животных

Понятие «полирезистентные инфекции» неразрывно связано с термином «полирезистентные штаммы», так как вызвано бактериями с множественной лекарственной устойчивостью [36, 37, 138, 168, 169, 175, 176].

Нерациональное применение антибактериальных средств в условиях нарушения адаптационных механизмов; при иммунодефицитных состояниях, вызванных действием различных факторов; приводит к тому, что потенциально патогенные микроорганизмы, которые обладают антибиотикорезистентностью и факторами персистенции, обеспечивающими «имунорезистентность» вызывают бактериальные экзо- и эндогенные инфекции, наносящие значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам [5, 9, 13, 39, 47, 109, 110, 142].

Оппортунистические эндогенные инфекции вызываются представителями нормофлоры, условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) приводят к снижению защитных сил организма. При эндогенных инфекциях микроорганизмы перемещаются из одного биотопа в другой за счет искусственного перенос, например, при оказании ветеринарной помощи и различных манипуляциях [127, 174, 181].

Значение возбудителей в развитии и течении полирезистентных инфекций зависит от полирезистентности патогенов к антимикробным препаратам, высокой инфицирующей дозы, наличия факторов патогенности, пассивного гетерогенности и изменчивости микробной популяции [13, 40, 52, 55, 63, 130].

Полирезистентные микроорганизмы («ESCAPE»-патогены - от англ. escape), эффективно «избегающие» действия антибактериальных препаратов, вызывают тяжелое, хроническое течение и латентные формы инфекционных процессов, что увеличивает продолжительность лечения [38, 67, 120, 121, 158, 159].

Наиболее актуальными для лабораторного контроля за развитием резистентности к АМП служат «индикаторные» микроорганизмы: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter spp.* [30, 36, 37, 91].

На фоне широкого распространения «проблемных» индикаторных бактерий появляется новый - эмерджентный микроорганизм *Stenotrophomonas maltophilia*, который характеризуется природной резистентностью ко многим антимикробным препаратам и успешно адаптируется в окружающей среде. *Stenotrophomonas maltophilia* представлен Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как один из ведущих возбудителей оппортунистических инфекций [112].

В научной литературе часто используют такие термины как «полирезистентность (MDR)», «экстенсивная резистентность (XDR)» и «панрезистентность (PDR)». Термином «полирезистентность» обозначают изоляты, резистентные к представителям трех или более классов антимикробных средств. Термином «экстенсивная резистентность» - резистентные ко всем, кроме одного или двух классов антибиотиков. «Панрезистентность» - резистентные ко всем доступным классам антибиотиков [36, 37].

Для бактериальных инфекций животных, вызванных полирезистентными условно-патогенными микроорганизмами, характерны следующие особенности:

Политропность. Условно-патогенные возбудители не имеют строго выраженного органного тропизма: один и тот же вид микроорганизмов может быть причиной развития различных нозологических форм (бронхитов, пневмоний, отитов, пиелонефритов, конъюнктивитов и др.).

Условно-патогенные микробы способны вызывать инфекцию при попадании в любые органы и ткани. Однако в развитии инфекционного процесса имеет значение высокая адгезивность УПМ в сочетании с конкурентной активностью в отношении нормальной микрофлоры и устойчивостью к ее конкурентному действию [38, 55, 65, 67, 120, 121, 158, 159, 302].

Одной из основных причин снижения воспроизводства в племенных хозяйствах (у коров ниже 40 %, телок - 60%) являются бактериальные болезни,

приводящие к нарушениям репродуктивной системы. Патологические изменения, вызванные возбудителями оппортунистических инфекций половых путей, приводят к эмбриональной смертности, абортам и мертворождения. Высокий риск заражения телят роисходит при прохождении родовых путей коров, являющихся носителями урогенитальных патогенов (микоплазмы, уреоплазмы, кампилобактерии) [12, 26, 182].

Л.В. Ческидова (2018), указывает на тот факт, что к числу наиболее часто встречающихся бактериальных инфекций при акушерских патологиях сельскохозяйственных животных относятся гнойно-воспалительные болезни молочной железы и половых органов в послеродовом периоде: маститы, метриты, эндометриты, вагиниты, снижающие лактацию у продуктивных животных и приводящие к бесплодию, а также к высокой заболеваемости и смертности телят [195].

Публикации зарубежных и отечественных ученых свидетельствуют о том, что бактериальные болезни молочной железы, респираторного и желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота (КРС) в ассоциативной форме встречаются повсеместно [1, 7, 12, 50, 51, 54, 71, 188].

На долю болезней дыхательной системы (главным образом пневмоний) при традиционной технологии скотоводства приходится 33,2-44,0%, при промышленной – свыше 60% всех случаев болезней телят, на долю желудочно-кишечных болезней – соответственно 55-70% и – до 100%. Среди молодняка КРС данные болезни занимают доминирующее положение [3, 93, 82, 84, 131, 188].

Так, при развитии энтеритов, болезнь может быть обусловлена ассоциацией вирусов ИРТ, рота- и коронавируса, парвовируса КРС, эшерихий и сальмонелл [86, 93, 131, 188].

При респираторной патологии болезни чаще протекают в ассоциации с вирусами вирусной диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота, парагриппа-3, респираторно-синтициальным вирусом и аденовирусами. Кроме того, к возбудителям вирусной этиологии при респираторной инфекции крупного рогатого скота могут присоединиться бактериальные патогены

(клебсиеллы, уреоплазмы и микоплазмы). При урогенитальных инфекциях у взрослых животных смешанная инфекция обусловлена возбудителями вирусной диареи, ИРТ, а также уреоплазмами, микоплазмами и хламидиями [12, 32, 82, 83, 84, 86, 188, 311, 312, 345, 348, 355, 365].

К числу патогенов наиболее часто встречающихся оппортунистических инфекций на территории нашей страны относятся возбудители гнойно-воспалительных болезней дыхательных путей: бронхопневмонии, бронхиты среди молодняка крупного рогатого скота. Бактериальные болезни дыхательных путей телят наносят большой экономический ущерб, так как среди больных животных поражаются до 30-50% поголовья [12, 86, 188].

Полиэтиологичность. Одна и та же нозологическая форма (пневмония, менингит, пиелонефрит и др.) может быть обусловлена любым условно-патогенным микробом.

Основным этиологическим фактором оппортунистических инфекций молочной железы, репродуктивного, респираторного и желудочно-кишечного трактов, являются такие условно-патогенные микроорганизмы, как *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и их ассоциации, способные к образованию мукоидного фенотипа и микробных биопленок. Характер и вид биопленок находится в прямой зависимости от степени тяжести инфекционного процесса [161, 166, 167, 187, 188].

Важная и значительная часть этиологии оппортунистических инфекций животных - атипичные и некультивируемые формы возбудителей, вызывающих контагиозные маститы, атипичные пневмонии и репродуктивные нарушения у крупного рогатого скота, которые наносят значительный экономический ущерб хозяйствам [20, 21, 25, 27, 29, 80, 81, 226, 329, 330].

В последние десятилетие произошло значительное увеличение спектра бактерий, способных вызывать инфекционные болезни животных. Причем это оказались не только свободноживущие, но и фитопатогенные микроорганизмы (*Erwinia*, *Agrobacterium* и др.). Исследования ученых ряда дикорастущих и культурных растений показали их значительную обсемененность условно-

патогенными микроорганизмами (*Enterobacter aeruginosa*, *Citrobacter koseri*, *Providentia stuartii* и другие). Yu.A. Markova, A.S. Romanenko, T.N. Shafikova, (2007), установили, что между механизмами бактериального патогенеза, происходящими в животных и растительных организмах, имеется сходство [302].

В основе биологических свойств возбудителей оппортунистических инфекций лежат факторы вирулентности (адгезины, инвазины, ферменты, токсины и др.), которые сформировались у них в процессе эволюции для существования в объектах окружающей среды и проникновения в клетки и ткани представителей почвенной, водной, морской флоры и фауны [65, 302].

Полигостальность – способность микроорганизмов использовать в качестве резервуарных хозяев животных, зоо- и фитопланктон в водоемах, обитателей почв и т.д., что свидетельствует о вовлечении их во всеобщий процесс циркуляции возбудителей в природе [302].

Факторы патогенности и вирулентности условно-патогенных бактерий, таких как адгезия, секреция ряда ферментов, подвижность, феномен кооперативной чувствительности позволяют им поражать разные макроорганизмы, т.е. быть «многохозяинными», или иначе полигостальными.

Возбудители способны покидать природные биотопы, преодолевать межвидовые барьеры, распространять антимикробную резистентность, что является биологической угрозой.

Пластичность. Метаболическая пластичность - способность микроорганизмов осуществлять свой обмен в различных условиях, как во внутренней среде теплокровного организма так и в объектах окружающей среды. *Психрофильность* – способность микроорганизмов сохранять необходимый для жизни уровень метаболизма при низкой температуре и повышать в этих условиях свою вирулентность [152].

Экологическая пластичность позволяет возбудителям легко осуществлять смену разных хозяев. Более того, при пассажировании через простейших, цитопатогенное действие бактерий способно возрастать. Бактериальные популяции неоднородны по устойчивости к фагоцитозу (перевариванию)

простейшими: большинство микробных клеток утилизируется в пищеварительных вакуолях, другие трансформируются, но отдельные клетки неизменно сохраняются интактными, размножаются и выходят из погибших хозяев в окружающую среду [152].

Проявлениями фенотипической морфологической пластичности у неспорообразующих микроорганизмов стали открытые в XX в. устойчивые к традиционной антибиотикотерапии клеточные формы: L-формы (L-трансформация, *cell wall deficient bacteria*, CWD); жизнеспособные, но некультивируемые бактерии (*viable but notculturable*, VBNC); клетки-персистеры, объединенные термином «клеточная персистентность бактерий» [8, 27, 174, 275, 307, 318, 342].

Фенотипическая пластичность микроорганизмов является эффективной формой адаптации. Эта биологическая способность позволяет одинаковым по генотипу бактериям создавать различные фенотипы в результате воздействия факторов внешней среды. Такая изменчивость не является наследуемой, однако имеет приоритетное значение в сохранении популяции бактерий и в основе стратегий развития их резистентности к антибиотикам.

Возбудители оппортунистических инфекций за счет биологической и экологической пластичности могут широко распространяться во внешней среде, а также длительно персистировать в организме животных, вызывая продолжительное, в том числе хроническое, течение инфекций [276, 255, 347].

Высокая экологическая пластичность позволяет возбудителям иметь разных хозяев и легко допускает их смену.

Полиадаптивность - способность микроорганизмов адаптироваться ко многим факторам окружающей среды и приобретать новые биологические свойства. Адаптация к непрерывно меняющимся условиям среды обитания - одно из важнейших свойств микроорганизмов.

Наряду с адаптацией к непростым, изменчивым абиотическим условиям почв и водоемов, существование бактериальных популяций обеспечивается сложными взаимодействиями с другими организмами. Культуры *P. aeruginosa*,

Pantoea agglomerans, выделенные из растений, оказались патогенными и для животных, а клинические изоляты обладали выраженными фитопатогенными свойствами для различных растений. Псевдомонады медицинского значения, в частности *B. cepacia*, *Erwinia carotovora*, давно известны как фитопатогены [9, 15, 65].

При изменении условий среды микроорганизмы могут изменять структуру, количественные соотношения клеток различного типа или возникновение новых признаков (микроэволюция) [65].

Клиническая картина бактериальных болезней животных, вызванных полирезистентными микроорганизмами в большей степени зависит от пораженного органа, чем от возбудителя болезни.

Например, пневмонии, вызванные *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *E. coli*, не различимы по клинической картине, но антибактериальная терапия этих нозологических форм должна иметь свои особенности.

При хронических, вялотекущих болезнях бактериальной и смешанной этиологии у животных отмечают неравномерный или низкий прирост массы тела, повышенную чувствительность к стрессам, низкую конверсию корма, ослабление поствакцинального противовирусного/противомикробного иммунитета, снижение продуктивности. При этом клинические признаки могут быть стерты микроорганизмом, атипичны или соответствуют болезни, вызываемой наиболее вирулентным в каждом конкретном случае [13, 52, 63].

Бактериальные болезни животных, вызванные полирезистентными микроорганизмами часто протекают как смешанные, микст-инфекции.

В современных условиях животноводства оппортунистические болезни в большинстве случаев протекают в ассоциации с вирусами, бактериями, вызывая развитие болезней со смешанной клинической картиной, значительно снижая сохранность и продуктивность животных.

Выявляется четкая закономерность: смешанные инфекции животных обусловлены наличием 3-х факторов: биологические свойства возбудителя, особенности макроорганизма и воздействие окружающей среды [13, 52, 63].

Специфическая профилактика позволяет снизить количество клинических проявлений болезни и выделение возбудителей во внешнюю среду, однако, она освобождает нишу для других возбудителей, которые в дальнейшем становятся ведущими этиологическими агентами [86].

Можно привести пример, микст-инфекции, длительная персистенция возбудителей таких болезней, как инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота в организме требует постоянного внимания ветеринарного врача к своевременной профилактике, т.к. в противном случае при снижении популяционного иммунитета вирус активизируется и приводит к вспышке болезни, а ввиду его политропизма он может выступать в роли основного этиологического агента как при респираторной, так и репродуктивной и энтеритной патологии.

Частая смена возбудителей в ходе болезни. Если рассматривать динамику болезней в отдельно взятом хозяйстве на протяжении нескольких лет, то можно проследить закономерность смены ведущих этиологических факторов. В один период будут преобладать вирусные респираторные болезни, в другой - бактериальные респираторные, которые могут смениться энтеритами вирусной или бактериальной этиологии. Эта закономерность объясняется концепцией экологических ниш [84, 86].

Бактериальным болезням, вызванным полирезистентными микроорганизмами свойственно хроническое течение. Инфекции животных, вызванные полирезистентными микроорганизмами с атипичными биологическими свойствами, отличаются более тяжелым клиническим течением, высокой смертностью, хроническим или латентным инфекционным процессом, что увеличивает продолжительность лечения [38, 120, 121, 158, 159, 338].

Бактериальные болезни, вызванные полирезистентными микроорганизмами, имеют выраженную тенденцию к генерализации, к осложнению септикопиемией.

Генерализацию оппортунистических инфекций связывают со сниженной способностью организма к ограничению микробного очага от остальной части

организма, что является следствием недостаточности механизмов естественного и приобретенного противоиного инфекционного иммунитета [45, 108, 122, 123].

Медленное развитие болезни, вызванное полнрезистентными микроорганизмами, и низкий приобретенный противоиного инфекционный иммунитет приводит к генерализованной форме инфекции, хроническому течению патологического процесса, устойчивости к терапевтическим мероприятиям.

Бактериальные болезни животных, вызванные полнрезистентными микроорганизмами, трудно поддаются терапевтическим мероприятиям.

Это обусловлено широким распространением штаммов множественно устойчивых к антимикробным препаратам, гетерогенностью и изменчивостью популяций возбудителей, недостаточной активностью факторов естественного иммунитета и сниженной способностью к развитию эффективного иммунного ответа на антигены возбудителей.

Лечить животных с подобными болезнями сложно из-за того, что к симптомам и патогенезу основной болезни, например, респираторной, присоединяются поражения других систем, органов с развитием гастроэнтеритов, анемий и др. [131].

Проведение специфической терапии, приводящее к клиническому благополучию, часто не способствует к элиминации возбудителя из организма, а лишь обуславливает переход острой формы инфекции в хроническую и скрытую. Персистирующие микоплазмы и уреоплазмы могут активироваться на фоне нарушения адаптационных механизмов, иммунодефицитных состояний и дисбактериозов животных [20, 21, 26, 81, 162, 138, 148].

Уменьшение ущерба от потери продуктивности и сохранности, вызванных оппортунистическими инфекциями, осуществляется путем применения антимикробных препаратов. Постоянное их назначение в субтерапевтических дозах позволяет не только сдерживать рост циркулирующей в хозяйствах предприятиях микрофлоры и обеспечивать сохранность животных, но и стимулировать рост и продуктивность животных. Однако данная технология

провоцирует развитие антимикробной резистентности и применение все большего количества антибиотиков, дезинфектантов и других ветеринарных препаратов.

Широкое распространение в настоящее время получили антибиотикорезистентные социально опасные, эпизоотологически и эпидемически значимые микроорганизмы (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *E. coli*. и др.). Остаточные количества антибиотиков попадают в продукты питания животного происхождения, в составе органических удобрений – в почву, растения, загрязняя окружающую среду, способствуя развитию антимикробной резистентности.

Глобальный рост резистентности возбудителей к антибиотикам приводит к высокой вероятности возникновения оппортунистических инфекций животных, вызванных полирезистентными микроорганизмами. Наиболее важными возбудителями инфекции, учитывая их распространенность и потенциал формирования антибиотикорезистентности, являются энтеробактерии, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемазы, метициллинрезистентные микроорганизмы [59, 119, 144, 158, 159, 193, 194, 228, 235].

Эпизоотологические особенности оппортунистических инфекций животных, вызванные полирезистентными микроорганизмами. Оппортунистические инфекции отличаются от инфекций, вызванных облигатно-патогенными микробами:

- широким распространением в животноводческих комплексах; частыми случаями эндогенной инфекции;
- частой контаминацией объектов внешней среды возбудителями и их способностью размножаться в объектах внешней среды;
- избирательностью поражения животных; невысокой контагиозностью больных животных и носителей;
- низкой восприимчивостью у здоровых животных; широким кругом хозяев (полигостальностью).

Привычной особенностью ведения животноводства в зарубежных странах (США и странах Европейского Союза (ЕС)) является технология содержания животных на небольших фермах, а интеграция производства обеспечивается за счет мясоперерабатывающих предприятий. Технологии и правила содержания, кормления, схемы ветеринарных обработок животных регламентируются интегратором при поддержке государства, что обеспечивает эпизоотологическую и эпидемиологическую безопасность, качество выпускаемой продукции. В ЕС крупной считается ферма, где содержится 100-200 коров, в США – до 500 голов крупного рогатого скота. Такая ситуация сложилась еще в 80-х годах прошлого столетия, когда двухлетние исследования Национальной Комиссии США установили негативное воздействие животноводческих комплексов на окружающую среду и их неэффективность в экономическом плане, так как при расчетах рентабельности не учитывались затраты на ликвидацию последствий негативного воздействия на здоровье людей и экологическую безопасность. Крупные хозяйства могут нанести вред здоровью персонала, а также живущих рядом с комплексами людей, вследствие загрязнения почвы, воды и воздуха, что может вызвать у них болезни [56, 57, 68, 84, 93, 196, 198, 199].

Следует отметить, что наращивание объемов производства, увеличение поголовья и концентрации на единицу площади приводит к закономерному эволюционно сложившемуся результату – повышению заболеваемости животных, увеличению количества применяемых антибиотиков, возникновению антимикробной резистентности и повышенному содержанию остаточных количеств антибиотиков и других фармакологически активных веществ в продуктах питания для людей. Данная проблема возникла в Китае при увеличении объемов производства. Для ее решения создан международный проект FarmWatch, объединяющий работу ведущих международных научных организаций Голландии, Великобритании, ряда других стран [58, 198, 199].

Высокая концентрация поголовья животных на единицу площади приводит к усиленному пассажированию и усилению вирулентности микроорганизмов. Множественные факторы (недостаточная система гигиенических,

профилактических, общехозяйственных мероприятий, ввод нового поголовья, осеменение контаминированным УПМ генетическим материалом, нерациональное применение ветеринарных препаратов и др.) способствуют размножению и циркуляции на комплексах так называемых «полевых» штаммов микроорганизмов, создающих свой собственный, уникальный микробиоценоз на каждом предприятии по производству мяса, молока [64, 84, 185, 198, 199].

Вследствие этого любое нарушение технологии (плохое качество корма, нарушение параметров микроклимата, гигиены, стресс и др.) приводят к возникновению оппортунистических инфекций - болезней, проявляющихся на фоне снижения иммунитета [60, 65, 122, 123].

Осложняет ситуацию то, что вместе с генетическим материалом в Российскую Федерацию завезено большое количество возбудителей инфекционных болезней, ранее не свойственных отечественным породам животных: инфекционный ринотрахеит (ИРТ, герпесвирус 1 типа), вирусная диарея - болезнь слизистых оболочек 1 и 2 генетические типы, респираторно-синтициальная инфекция (РСИ, три генетических типа), ротавирусная и коронавирусная инфекции, реовирусные пневмоэнтериты, клостридиозы, листериоз, колибактериоз, сальмонеллез, пастереллез, микоплазмоз, кампилобактериоз и другие [68, 84, 170, 196].

Промышленное ведение животноводства предполагает размещение большого количества скота в ограниченном пространстве, что с точки зрения эпизоотологии создает благоприятные условия для развития инфекционного процесса. При появлении нового возбудителя ввиду нарушения норм биобезопасности, комплектования стада поголовьем из других хозяйств с нарушением карантинирования животных происходит заражение восприимчивого скота и быстрое распространение болезни. Несмотря на проводимые профилактические мероприятия, периодически происходят вспышки оппортунистических болезней.

Таким образом, проблема распространения бактериальных инфекций животных, ассоциированных с полирезистентными микроорганизмами, и их связь

с патологическим процессом занимают значительное место в современной патологии животных. Клинические изоляты микроорганизмов демонстрируют разные фенотипы, характеристики которых зависят от многих параметров, включая клональную принадлежность штамма, локализацию патологического процесса, проводимую антибактериальную терапию. Несмотря на проведение противоэпизоотических мероприятий, частота возникновения этих бактериальных болезней, летальность и увеличение стоимости лечения продолжают возрастать.

1.2 Факторы, влияющие на активизацию условно-патогенной микрофлоры и рост числа полирезистентных инфекций у животных

1.2.1 Иммунодефициты

Роль организма животных в активизации условно-патогенной микрофлоры зависит от нарушений целостности покровов, снижения напряженности естественного иммунитета и недостаточной способности к развитию приобретенного противоинфекционного иммунитета [55, 60].

Известно, что условно-патогенные бактерии чаще являются полирезистентными, но встречаются сочетания в одном микроорганизме антибиотикорезистентных и вирулентных свойств [91].

Весь комплекс защитных факторов организма животных от возбудителей инфекционных болезней можно условно разделить на физиологические барьеры, систему врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета [121, 122, 127].

На продуктивность животных и их адаптацию существенное влияние оказывает наследственность и иммунная система. Иммунная система является одной из важнейших гомеостатических систем организма, которая во многом определяет степень здоровья, продуктивность и адаптационные возможности [121, 122, 127].

Иммунодефициты представляют собой патологическое состояние организма, при котором отмечается пониженный иммунный ответ на действие антигенов или его отсутствие [52, 56, 59, 60, 61, 120, 121, 127].

Первичные иммунодефициты представляют собой наследственные болезни, связанные со структурными дефектами тех или иных генов и развитием пороков внутриутробного развития. Первичные иммунодефициты встречаются редко. При этом может быть дефект в работе макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов, дефицит неспецифических гуморальных факторов защиты (системы комплемента), дефицит Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и их комбинации [121, 122, 127].

Физиологические иммунодефициты встречаются у новорожденных животных в результате физиологической незрелости организма. У них имеются проницаемые физиологические барьеры для микроорганизмов. Несовершенными барьерами являются слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей. Лимфоидный аппарат начинает функционировать не сразу после рождения, а после созревания под влиянием микрофлоры. Ферментативный аппарат у новорожденных животных полностью не сформирован. Секреторные иммуноглобулины не вырабатываются, а поступают у млекопитающих с молоком матери (колостральные антитела) [121, 122, 127].

Для крупного рогатого скота наиболее важными являются вторичные иммунодефициты. Вторичный иммунодефицит - это приобретенный клинко-иммунологический синдром, характеризующийся снижением эффекторных звеньев иммунной системы, неспецифических факторов защиты [56, 60, 61, 104, 105, 106, 120, 121, 127].

Имунодефициты при бактериальных инфекциях. Часто наблюдается снижение Т-лимфоцитов и митогенной активности на фитогемагглютинин (ФГА). При стрепто- и стафилококковых инфекциях подавление Т-звена иммунитета часто сочетается с повышением функции В-системы и формированием инфекционно-аллергических и аутоиммунных осложнений (болезней) [56, 60, 61, 120, 121, 122, 127, 134].

Для попадания в макроорганизм микробы должны преодолеть многочисленные физиологические барьеры. Небольшая часть возбудителей, которая успешно преодолевает барьеры, распознается и нейтрализуется системами врожденного и приобретенного иммунитета.

Факторы патогенности при оппортунистической инфекции активно действуют на всех этапах инфекционного процесса — адгезии, инвазии, в случае диссеминации и персистенции, а также вызывают прямую интоксикацию и обеспечивают защиту от иммунного ответа [56, 60, 61, 120, 121].

В определенных условиях (иммунодефицитные состояния, травмы и операции с проникновением микроорганизмов в ткани) условно-патогенные

микроорганизмы могут вызывать оппортунистические инфекции у животных.

Иммунодефициты при вирусных инфекциях. Многие вирусы вызывают резкое угнетение Т-звена иммунитета. Это нарушение сочетается с дефектами фагоцитоза, что еще более угнетает противомикробную защиту и способствует присоединению бактериальных осложнений [122, 127, 184].

Механизмы формирования иммунодефицитных состояний разнообразны и во многом зависят от иммунодепрессантов. У КРС иммунодефицитные состояния развиваются после инфицирования возбудителями вирусной диареи- болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, лейкоза, парвовирусной инфекции и других вирусных и медленных инфекций [74, 122].

Однако наиболее существенные нарушения иммунной системы вызывают вирусы, непосредственно поражающие иммунную систему.

Нарушение презентации клетками вирусных антигенов и выработка веществ, блокирующих развитие иммунного ответа

Вирусы практически все время своего существования находятся в клетках организма. Во внеклеточном пространстве вирионы находятся только в период после выхода из клетки до момента попадания в следующую клетку. Поэтому вирусы, особенно те, репродукция которых не сопровождается лизисом клеток, практически неуязвимы для комплемента, антител и фагоцитов. Единственными механизмами, способными обеспечить полную элиминацию таких вирусов, являются NK-клетки и CTL (cytotoxic T lymphocyte).

CTL распознают инфицированные вирусом клетки только если на их поверхности презентируется комплекс рМНС1, содержащий вирусные антигены. Некоторые вирусы снижают уровень экспрессии молекул МНС1 в инфицированных клетках. Это приводит к менее эффективной презентации антигенов, и активированные CTL не замечают таких клеток. Однако сниженный уровень МНС1 является сигналом для атаки NK-клетками [55,60].

Клеточная цитотоксичность

Защитные механизмы иммунной системы позволяют справляться с большинством возбудителей инфекционных болезней.

Другой тактикой уклонения от иммунного ответа является выработка вирусами веществ, блокирующих межклеточную сигнализацию. Способные к этому вирусы кодируют вещества, связывающие цитокины, которые в норме обеспечивают своевременное развитие иммунного ответа. Связывание цитокинов до их контакта с цитокиновыми рецепторами на поверхности клеток-мишеней приводит к нарушению межклеточной биокommunikации и замедлению развития иммунного ответа [61].

Инфицирование иммунокомпетентных клеток

Некоторые вирусы, инфицируют в организме преимущественно макрофаги и Т-хелперные лимфоциты. Инфицирование Т-хелперов часто сопровождается их гибелью. Прогрессирующее снижение их количества в конечном итоге приводит к развитию тотального иммунодефицита, так как Т-хелперы занимают центральное место в регуляции и развитии иммунного ответа [60, 121, 122].

При этом иммунная система не может адекватно ответить на инфицирование и элиминировать вирус. Вирус быстро меняет поверхностные антигены, из-за чего всегда находятся вирионы, против которых наработанные антитела и Т-лимфоциты неэффективны. Более того клетки, которые способны распознать презентированные вирусные антигены, атакуют как раз Т-хелперы, так как именно в них находится вирус. Таким образом происходит методичное уничтожение одних клеток иммунной системы другими, что в конце концов приводит к развитию сильного иммунодефицита [55, 60].

Иммунодефициты, связанные с недостаточностью питания, голоданием, нарушениями обмена веществ.

Дефицит белка в организме также повышает восприимчивость к инфекциям. Угнетается первичный иммунный ответ (синтез IgM), фагоцитарная активность клеток, митогенная активность.

Дефицит микроэлементов существенно сказывается на иммунной системе.

Дефицит железа ведет к снижению активности железосодержащих ферментов, Т-звена, уровня миелопероксидазы и АФК. Существенно сказывается на иммунной системе дефицит цинка, лития, меди, селена, кальция, магния. С дефицитом магния связаны нарушения синтеза антител, активации системы комплемента. Неполноценное кормление животных приводит к супрессии Т-независимого иммунитета. При дефиците или снижении поступления жизненно необходимых микроэлементов с кормами в организме животных возникает хронический комплексный гипомикроэлементоз, проявляющийся снижением всех видов продуктивности и приводящий к развитию вторичных иммунодефицитных состояний [122, 127, 184].

Лекарственные иммунодефициты связаны преимущественно с их иммунотоксическим действием. Достаточно часто отмечается активация Т-супрессоров, уменьшение количества В-клеток, снижение IgA. Существенное влияние на иммунный статус оказывают антибиотики, даже при коротких циклах применения, прежде всего – пенициллины, тетрациклины, стрептомицин и антигрибковые препараты. Они вызывают дефекты формирования первичного иммунного ответа (скорости образования клона плазматических клеток и антителообразования); снижение противовирусной защиты; снижение цитотоксической активности Т-лимфоцитов; уменьшение фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов [122, 127, 184].

Антибиотики и сульфаниламиды, интенсивно применяемые для лечения животных, воздействуют на нормальную микрофлору организма как в пищеварительной, так и в респираторной и репродуктивной системах, вызывают дисбактериозы, приводящие к возникновению иммунодефицитов, накапливаются в организме животных, и обладают иммунодепрессивными свойствами. Нарушаются механизмы антагонистической активности лакто-, бифидобактерий, молочнокислых энтеро- и стрептококков, что ослабляет защитные механизмы слизистых оболочек и делает их более восприимчивыми к проникновению патогенов [4, 5, 6, 19, 24].

Лекарственные препараты могут быть сложными гаптенами, попадая в

организм, соединяться со структурными и функциональными компонентами данного индивида (белками), приобретать свойства полноценных антигенов и индуцировать иммунный ответ [122, 127, 184].

Можно предполагать, что при болезнях, вызванных бактериями, продуцирующими пенициллиназу, а также при иммунизации макроорганизма бета-лактамами в макроорганизме постепенно формируется система, инактивирующая введенные антибиотики и состоящая из:

- антител, связывающих антибиотик, но не разрушающих его;
- антител-абзимов, связывающих и разрушающих антибиотик путем его гидролиза (за счет собственной каталитической активности);
- антител к бактериальной пенициллиназе [280].

Данная система должна функционировать параллельно с другими системами инактивации и выведения антибиотиков из организма (прежде всего параллельно с метаболизмом лекарственных препаратов в печени).

Результаты, полученные зарубежными и отечественными авторами, указывают на необходимость проведения строгого лабораторного контроля за назначением бета-лактаменных антибиотиков в лечении животных с бактериальными инфекциями с целью предупреждения распространения каталитической активности антител и дальнейшего снижения клинической эффективности лекарственных препаратов данной группы [122, 127, 184].

Роль внешней среды на активизацию условно-патогенной микрофлоры зависит от наличия факторов эффективной передачи возбудителя от инфицированного к неинфицированному животному.

Стрессовые факторы и нарушение условий внешней среды могут также воздействовать на резистентность организма и при ее снижении вызывать различные болезни, либо угнетать иммунитет при возникновении инфекций. Высочайший уровень изменчивости и адаптационных механизмов микроорганизмов требует создания идеальной технологии производства и постоянной разработки новых лечебно-профилактических препаратов для животных, технологий и способов их применения. Однако скорость размножения

микроорганизмов и их адаптация к изменяющимся условиям внешней среды значительно быстрее, чем скорость разработки и внедрения в широкую практику новых вакцин, антибиотиков, других фармакологически активных веществ. Это, в свою очередь, приводит к удорожанию био- и фармтехнологий, снижению рентабельности животноводства [11, 38, 49, 112, 121, 122, 132, 190].

Существенное влияние на организм животного оказывает *стресс*, снижающий противоинфекционный иммунитет. Хронический стресс неизбежно приводит к формированию вторичного иммунодефицита.

Ряд неизбежных особенностей технологии промышленного животноводства (высокая концентрация поголовья, безвыпасное и безвыгульное содержание, транспортировка, частые перегруппировки, состояние микроклимата в закрытых помещениях, несбалансированное и неполноценное кормление) вызывают развитие стрессовых состояний в организме животных, приводящих к возникновению иммунодефицитов [11, 38, 49, 112, 120, 121, 132, 190].

Организм крупного рогатого скота особенно чувствителен к стрессам в первые 3-4 мес жизни, а материнский организм - в последний период стельности и первые 2-3 мес после отела. У коров вторичные иммунодефициты протекают с преимущественным нарушением Т - клеточного звена иммунитета и в основном в хронической форме. У телят вторичные иммунодефициты проявляются в острой форме с нарушением В - клеточного звена иммунитета.

Большинство отечественных и зарубежных исследователей считает, что длительный отбор и подбор животных, обладающих высокой физиологической резистентностью, будут способствовать созданию стад, в значительной части устойчивых к большинству вредных факторов. Такое поголовье будет проявлять и лучшую реактивность при искусственной иммунизации, и у животных на длительный срок закрепится невосприимчивость к болезням [11, 38, 49, 112, 120, 121, 123, 122, 128, 132, 190].

Таким образом, показатели неспецифической резистентности у импортных животных менее эффективны, что, в конечном итоге, влияет на состояние здоровья и продуктивные функции. Изучаемые группы животных различаются по

норме реакции иммунных систем на антигенный состав местных условий. Импортные первотелки имеют пониженную бактерицидную активность кожи и значительный дефицит IgM. Использование показателей базового метаболизма, теплоустойчивости и естественной резистентности позволит усовершенствовать селекционную оценку животных [122, 123, 128].

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что на уровень гуморального иммунитета существенное влияние оказывает физиологический и иммунобиологический статус животного. В системе мер борьбы и профилактики необходимо учитывать иммунодефицитное состояние крупного рогатого скота, а вакцинопрофилактику проводить с учетом результатов иммуномониторинга [56, 60, 120, 121, 122, 123].

1.2.2 Механизмы защиты микроорганизмов от иммунного ответа

В ходе эволюции некоторые микробы выработали механизмы, позволяющие им защищаться от иммунного ответа. Для этого группы микробов используют различные стратегии. Однако эти механизмы не являются абсолютными, так как иммунная система эволюционировала параллельно и, как правило, обладает дублирующими защитными механизмами, что в конечном итоге позволяет полностью элиминировать из организма большинство патогенов [122, 123].

Фактором, определяющим риск развития оппортунистических инфекций, является эффективность иммунного ответа на реализацию патогенетического потенциала макроорганизма.

Условно-патогенные микроорганизмы используют многочисленные механизмы защиты от иммунных эффекторов и даже прямую агрессию в отношении иммунной системы.

Защита от фагоцитоза и незавершенный фагоцитоз

Антифагоцитарные свойства описаны у капсульных полисахаридов, ЛПС, флагеллина, пигментов, альгината. Защита от повреждения кислородными радикалами осуществляется за счет пигментов, оксидазы, альгината.

Бактерии способны избегать эффективного фагоцитоза посредством ряда механизмов. Одна часть бактерий пытается избежать поглощения фагоцитами, тогда как другая часть способна выживать внутри фагоцитов.

Инкапсулированные бактериальные клетки хуже поддаются фагоцитозу, так как распознаваемые фагоцитом структуры у них экранированы капсулой. Такие бактерии эффективно фагоцитируются лишь после опсонизации антителами. *Streptococcus pneumoniae*, например, имеет относительно инертную для иммунной системы капсулу, состоящую из гиалуроновой кислоты. Так как данная кислота входит в состав собственной соединительной ткани макроорганизма, она не распознается системой врожденного иммунитета [122, 123, 127].

Staphylococcus aureus и *Streptococcus pyogenes* имеют белки в составе своих клеточных стенок, связывающие сывороточные белки макроорганизма. В результате эти два микроба способны образовывать псевдокапсулу, состоящую из белков макроорганизма, что замедляет их распознавание фагоцитами. Оба возбудителя продуцируют цитотоксины, повреждающие мембраны нейтрофилов, поэтому часть мобилизованных из крови нейтрофилов погибает еще до того, как они свяжутся с микробными клетками.

Некоторые микробы способны выживать внутри фагоцитов, более того, для многих из них макрофаги являются основным местом обитания в организме. Данная группа микробов избегает разрушения внутри фагоцитов посредством одного или нескольких из приведенных механизмов:

- выход из фагосомы в цитоплазму до образования фаголизосомы;
- блокирование слияния фагосомы и лизосомы;
- выживание в фаголизосоме за счет капсулы или особо устойчивой клеточной стенки.

Антигенная вариабельность - некоторые бактерии и особенно вирусы способны обходить адаптивный иммунный ответ за счет быстрого изменения структуры поверхностных антигенов. Изменения антигенов при этом могут быть незначительными, всего на несколько аминокислот. Однако этого бывает достаточно, чтобы предотвратить связывание с антителами и распознавание

эффекторными лимфоцитами, а также Т- и В-клетками иммунологической памяти. Все наработанные ранее эффекторные защитные механизмы системы адаптивного иммунитета при этом становятся бесполезными, и иммунный ответ, по сути, запускается заново.

Особо защищены от иммунной системы мукоидные (альгинатобразующие) и биопленочные штаммы. Альгинат увеличивает вязкость секретов и экссудатов, следствием чего являются два негативных явления. С одной стороны, блокируется отток экссудата, с другой — затрудняется миграция в очаг воспаления клеточных и гуморальных факторов иммунитета. Альгинат непосредственно ингибирует эффекторные способности иммуноцитов.

Бактерии, имеющие полисахаридную капсулу (*Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* и др.) вызывают тяжелые бактериальные инфекции. Полисахаридные антигены стимулируют тимус-независимый ответ, поскольку они плохо процессируются антигенпрезентирующими клетками, что объясняет неспособность последних индуцировать специфичные к полисахаридам CD4⁺ лимфоциты [127, 128].

Таким образом, в данной главе описаны лишь некоторые механизмы, позволяющие микробам уклоняться от иммунного ответа или хотя бы приостановить его развитие. В реальности механизмы уклонения не исчерпываются приведенным выше списком.

1.2.3 Факторы, способствующие селекции и распространению антибиотикорезистентных микроорганизмов

Массовой селекции и распространению антибиотикорезистентности среди бактерий способствуют факторы:

- нерациональное и бесконтрольное применение антибиотиков и антисептиков с лечебно-профилактическими целями;
- использование пищевых продуктов, содержащих антибиотики [267].

Применение антибиотиков в сельском хозяйстве, в ветеринарии создает условия для селекции устойчивых изолятов. Проблему могут также создавать

антибиотики в почве (в относительно низких концентрациях) за счет своих естественных продуцентов [43, 44, 56, 57, 153].

Наличие в почве солей тяжелых металлов также ведет к селекции бактерий и росту количества резистентных изолятов. Последнее связано с тем, что интегрированные опероны содержат вместе гены антибиотикорезистентности и гены резистентности к тяжелым металлам (ко-селекция) [153].

Основные причины развития и распространения антибиотикорезистентности в животноводческих кооплексах:

- активное и бесконтрольное использование антибиотиков;
- неадекватное проведение антибактериальной профилактики;
- появление «некачественных» дженериков;
- неадекватность выбора антибактериального препарата и его дозировки;
- генетические мутации микроорганизмов;
- отсутствие эпизоотологического контроля;
- распространение полирезистентных клинических штаммов;
- низкое качество микробиологической диагностики механизмов резистентности микроорганизмов в ветеринарных лабораториях;
- неблагоприятные экономические и экологические условия;
- отсутствие обратного контакта лечащего ветеринарного врача с бактериологом;
- недостаточный уровень знаний клиницистов по фармакологии, фармакодинамике, фармакокинетике, микробиологии [43, 44, 56, 57, 119, 198, 199].

Несомненно, что самой важной причиной приобретения бактериями резистентности к антибиотикам является широкое применение самих антибиотиков. Неадекватное использование антимикробных лекарственных средств обуславливает терапевтические неудачи, повышает показатели летальности и частоту развития резистентности. У животных, некорректный режим дозировки также может быть причиной неспособности антимикробного

препарата достичь соответствующих концентраций в очаге инфекции вследствие изменения фармакокинетики лекарственного средства, вызванного патофизиологическими нарушениями [119].

Повторные курсы антимикробной терапии, наличие инвазивных устройств, включая доильное и поильное оборудование, в комбинации с ответом организма на микроорганизм, служат путями передачи и распространения резистентных форм инфекции. Однако, основными факторами развития резистентности является эмпирическая неадекватная антибиотикотерапия и отсутствие ротации антибиотиков.

Длительная или неадекватная антимикробная терапия позволяет микроорганизмам видоизменяться, приспосабливаться к антибиотикам и быстро становиться новыми, доминирующими штаммами.

Применение антибактериальных препаратов является одним из главных движущих факторов в смене преобладающего микроорганизма и усилении его вирулентности. Несмотря на высокую эффективность АМП в терапии инфекционных болезней бактериальной этиологии, при их открытии они показали действенность только в краткосрочной перспективе. При назначении АМП происходит освобождение ниши для устойчивого к этому антибиотику патогена (вирусы или устойчивые бактерии), а у чувствительного в процессе эволюции микроорганизмов вырабатываются механизмы резистентности [8, 64, 84, 184, 198, 228, 343].

Вирулентность микроорганизмов обеспечивается целым комплексом факторов, среди которых наиболее значимыми являются: адгезия и колонизация; инвазия; конкуренция за железо и питательные компоненты; синтез продуктов бактериального роста; токсинообразование; индукция избыточного воспаления; капсулообразование [146, 147].

Факторы адгезии (адгезины). Важнейшим фактором адгезии микроорганизмов являются пили (реснички, фимбрии). Возможность реализации первого этапа инфекционного процесса — адгезии на тканях животных и абиотических поверхностях.

Необходимо учитывать, что адгезия во многом зависит от состава, стабильности и защитных свойств микрофлоры организма. Определенная роль в этом отношении принадлежит нормальной микрофлоре, как антагонистам патогенных бактерий. Основные механизмы местного иммунитета зависят от совокупности факторов, препятствующих адгезии и размножению бактерий на слизистых оболочках. Известно, что бактериальная адгезия к клеточным поверхностям может ингибироваться антибиотиками, вакцинами, приготовленными на основе адгезинов, секреторными глобулинами или гликопротеинами, антигенно родственными рецепторами слизистой, так манноза и N-ацетил-О-галактозамин блокирует прилипание кишечной и синегнойной палочек к эпителиальным клеткам [147].

Факторы адгезии, вырабатываемые различными микроорганизмами (*S. aureus*, *K. pneumoniae* и др.) способствуют формированию микробных биопленок на поверхности объектов окружающей среды (доильного оборудования, поилках, стенах и полах животноводческих помещений), продолжается с образованием колоний и, завершающийся их отделением от поверхности, приводящий к диссеминации инфекционного процесса [135, 136].

Факторы инвазии и диссеминации. Микроорганизмы активно проникают через тканевые барьеры. Механизмы инвазии включают процессы, направленные на разрушение тканевых барьеров — клеток и межклеточного вещества. В качестве факторов инвазии могут прямо или косвенно выступать ферменты, токсины дистантного и контактного типов, эндотоксин (ЛПС), апоптоз-индуцирующие белки, сидерофоры, вторичные токсины микробного и тканевого происхождения.

Факторы инвазии оказывают повреждающий эффект на иммунциты в такой же степени, как и на другие клетки. Ферменты инвазии (эластаза, щелочная протеаза, протеаза IV) обеспечивают деструкцию иммуноглобулинов, факторов комплемента, γ - и α -интерферонов.

Пигменты также расцениваются в качестве факторов инвазии: пиоцианин вызывает непосредственное повреждение эпителиальных тканей, пиовердин и пиоцианин обладают способностью к прямому гемолизу эритроцитов [149, 346].

Возникновение резистентности и распространение ее среди микроорганизмов является естественным процессом, возникшим в ответ на широкое использование АМП в клинической практике, обусловленное селекцией в окружающей среде, имеет большое социально-экономическое значение и в развитых странах рассматривается как угроза национальной безопасности [44, 59, 158, 159, 228].

Важным механизмом антибиотикорезистентности является формирование у микроорганизмов мукоидного фенотипа, объединение в бактериальные сообщества, формирование общего защитного матрикса. Благодаря этому феномену бактерии остаются жизнеспособными после антибиотикотерапии, которая приводит только к эрадикации планктонных форм [64, 8].

Микробные биопленки. Огромной проблемой в настоящее время помимо передачи генов антибиотикорезистентности, является формирование так называемых микробных биопленок - симбиоза микроорганизмов, погруженных в выделяемый ими внеклеточный белково-полисахаридный матрикс (рис. 2.2.3.1).

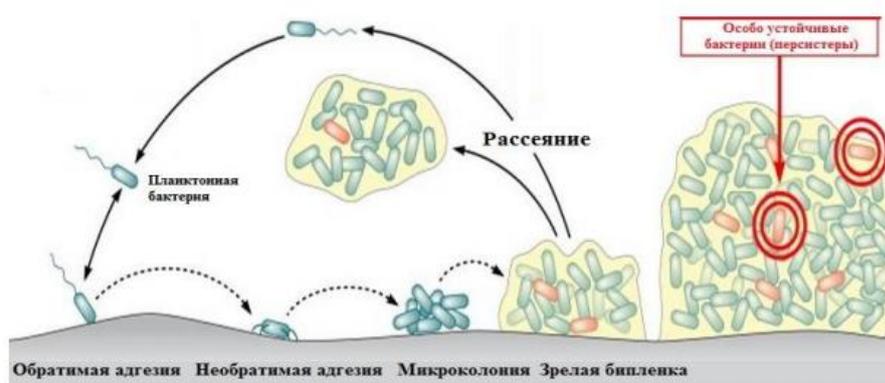


Рисунок. 2.2.3.1 - Стадии формирования биопленок [D. Lebeaux et al., 2014], [293].

Стадии развития бактериальных пленок:

- 1 – адгезия бактерий на поверхности ткани;
- 2 – фиксация;
- 3 – созревание;
- 4 – образование взрослой биопленки в белково-полисахаридном каркасе;
- 5 – выброс бактерий и образование новых колоний биопленок.

Следует отметить, что применение антибиотиков наиболее эффективно на первых трех стадиях формирования биопленок, в то время как воздействие на уже сформированную, зрелую биопленку и на ее новые колонии представляет собой крайне сложную задачу.

Клинические изоляты оппортунистических микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *Staphylococcus haemolyticus* и др.) демонстрируют разные фенотипы, характеристики которых зависят от многих параметров, включая локализацию патологического процесса, проводимую антибактериальную терапию. Например, при пневмониях и маститах преобладают мукоидные штаммы с гиперпродукцией альгината; при ассоциированных инфекциях чаще регистрируют биопленкообразующие изоляты, слизееобразование для которых не является обязательным признаком. Подобные различия фенотипов микроорганизмов связаны как с селекцией клонов, так и с регуляцией экспрессии тех или иных генов, определяемой местными условиями обитания.

Биопленки являются одной из самых совершенных и сложных стратегий защиты бактерий от иммунной системы макроорганизма [76, 92, 180, 185, 186, 317, 379, 387].

Способностью к образованию биопленок обладают различные бактерии: стафилококки, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и др. [317, 371, 387].

Формирование биопленок, представляющих собой сообщество бактерий, находящихся внутри биополимерного матрикса, состоящего из полисахаридов, является важным механизмом антибиотикорезистентности [131, 132, 135, 136, 180].

Низкая эффективность терапии и, как следствие, риск неблагоприятного исхода инфекции ассоциируется с антибиотикорезистентностью микроорганизмов.

Установлено, что антибиотикорезистентность ассоциируется со сравнительно мало вирулентными условно-патогенными микроорганизмами. Возможность объединения в одном микроорганизме свойств антибиотикорезистентности и вирулентности приводит к формированию «суперпатогена», способного ухудшить течение и исход болезни животных [91].

Важную роль в регуляции вирулентности микроорганизмов играет *quorum sensing*-механизм. Известно, что биокommunikация бактерий обеспечивается продуцируемыми ими сигнальными молекулами, получившими название аутоиндукторов. При высокой концентрации бактерий на колонизируемой поверхности аутоиндукторы продуцируются в большем объеме, что сопровождается: активацией генов вирулентности; продукцией факторов адгезии бактерий; продукцией различных токсинов; капсулообразованием; увеличением подвижности микроорганизмов; формированием микробных биопленок [130, 135, 136, 180].

Результатом этих процессов является преодоление бактериями иммунного ответа макроорганизма и развитие заболевания. Считается, что *quorum sensing*-механизм контролирует тип взаимоотношений бактерий с макроорганизмом и возможной сменой наиболее распространенного комменсализма на паразитизм. Одни и те же УПМ могут быть представителями как нормальной микробиоты, так и причиной развития тяжелых форм болезней животных [229].

Теория экологических ниш хорошо изучена на высших организмах и предполагает, что если ниша освобождается в результате гибели какого-то вида микроорганизма, то она тут же заполняется другим видом, что характерно для многих биотопов. Одним из механизмов видовой смены возбудителей болезни является специфическая профилактика. Под действием вакцин и вырабатываемого ими специфического иммунитета при профилактике болезней, происходит освобождение ниши для других возбудителей, обладающих сходным

тропизмом. В настоящее время вакцинация - обязательное мероприятие, без которого не обходится ни одно хозяйство. Проводимые вакцинации привели к формированию атипичных и скрытых форм течения болезней. Характерный эпизоотический процесс с классическими клиническими признаками постепенно переходит в скрытое, бессимптомное течение и распространение болезни. При этом создается обманчивая ситуация благополучия [84].

В настоящее время все чаще обсуждается проблема перекрёстной устойчивости микроорганизмов. Под перекрёстной устойчивостью (в англ. источниках «cross-resistance»), в некоторых отечественных источниках используется термин «комбинированная устойчивость» - понимают формирование устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, которая возникает в ходе адаптации микроорганизмов к дезинфектантам [154, 189].

Феномен формирования перекрёстной устойчивости у микроорганизмов связан с тем, что механизмы устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам в ряде случаев могут быть сходными. К наиболее вероятным механизмам перекрёстной устойчивости относят изменение проницаемости цитоплазматической мембраны клеток и повышение эффективности эффлюкса (системы активного энергозависимого транспорта и выброса антимикробных соединений из клеток). Однако, несмотря на то, что неоднократно было показано формирование перекрёстной устойчивости *in vitro*, возможность формирования перекрёстной устойчивости *in vivo* до сих пор обсуждается. В то же время, по мнению ряда исследователей, этот процесс может вносить значительный вклад в рост множественной лекарственной устойчивости среди возбудителей инфекций. Также необходимо учитывать, что сублетальные концентрации дезинфектантов оказывают селективное давление, которое, с одной стороны, стимулирует формирование резистентности к антимикробным препаратам, а с другой стороны, позволяет сохранять и поддерживать резистентность как свойство популяции микроорганизмов. В случае формирования перекрёстной устойчивости сублетальные концентрации дезинфектантов за счёт селективного давления могут поддерживать высокий уровень устойчивости микроорганизмов к антибиотикам,

даже если микроорганизмы в ходе своего роста не взаимодействуют с этими антибиотиками. Таким образом, проблема устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам требует всестороннего анализа и поиска путей её практического решения [154, 184, 189, 230].

Применение антибактериальных препаратов является одним из главных движущих факторов в смене преобладающего патогенного агента. Несмотря на их высокую лечебную эффективность при инфекционных болезнях бактериальной этиологии, показали действенность только в краткосрочной перспективе. Применение антибактериальных препаратов с лечебными целями подавляет развитие собственной нормофлоры кишечника у животных. Происходит освобождение ниши для устойчивого к этому антибиотику патогена (вирусы или устойчивые бактерии), а у чувствительного микроорганизма в процессе эволюции вырабатываются механизмы резистентности. Ежегодно публикуются сообщения о выделении так называемых «супербактерий», которые резистентны ко всем известным антибиотикам. В отраслях сельского хозяйства разработаны схемы ротации антибиотиков [59, 91, 184, 192, 374, 381].

Кроме того, такие антибиотики, как стрептомицин, биомицин, синтомицин стимулируют развитие грибов с поражением слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, легких и возможным развитием сепсиса. Антибиотики, которые влияют на репликацию ДНК у бактерий, активируют SOS-ответ и частоту горизонтального переноса факторов вирулентности другим микроорганизмов [130].

Полагают, что механизм устойчивости к антибиотикам может развиваться у определенной части бактерий конкретного вида вследствие природной резистентности. Обычно природные инфекционные агенты представляют собой популяцию разных штаммов одного патогенного организма. При воздействии антибиотика более устойчивые штаммы становятся доминирующими. Немаловажная роль отводится и генетическим мутациям, приводящим к образованию антибиотикорезистентной формы у микроорганизмов. Здесь ведущую роль играют разнообразные варианты горизонтального переноса генов

между микроорганизмами как одного, так и разных видов, что в условиях селекции, обусловленной прессингом антибиотика, обеспечивает доминирование резистентных штаммов [250, 251].

Принято считать, что основные механизмы антибиотикорезистентности опосредованы процессами, включающими нейтрализацию действия антибиотика посредством:

- его модификации (гидролиз, фосфорилирование, ацетилирование, гликозилирование);
- активного удаления антибиотика из клетки (эффлюкс);
- изменения свойств мишени воздействия антибиотика и изменение проницаемости [136, 144, 168, 170, 356].

Резистентность в условиях животноводческих комплексах может развиваться в результате:

- спонтанных мутаций: одноступенчатых по стрептомициновому типу или в результате серий небольших многоступенчатых мутаций, в течение нескольких дней (последующая селективная мультипликация резистентных клонов приводит к их доминированию);
- селекции естественно, первично устойчивых изолятов: во время лечения антибиотиком или обработки антисептиком чувствительные клоны погибают, а естественно устойчивые размножаются и занимают биологическое пространство, созданное для них антимикробным препаратом;
- передачи генов от других микроорганизмов в результате генетических рекомбинаций, когда гены резистентности передаются вследствие конъюгации, трансдукции или трансформации.

Конъюгация - передача генетической информации с помощью плазмид.

Интегративные элементы (NBU) имеют небольшие размеры, вырезаются из хромосомы в присутствии конъюгативных транспозонов. NBU после освобождения из бактериальной хромосомы мобилизуется в ковалентно замкнутую кольцевую нереплицирующую форму. Попадая к реципиенту NBU,

которые обнаружены только у *Bacteroides spp.*, интегрируются в его геном и могут переносить гены антибиотикорезистентности.

Трансдукция - передача генетической информации с помощью умеренных, трансдуцирующих бактериофагов генов резистентности, особенно часто при стафилококковой инфекции.

Трансформация - непосредственная передача генов резистентности (фрагмента ДНК) от донора реципиенту (зависит от степени гомологичности ДНК).

Конъюгация и трансдукция представляют собой наиболее распространённые механизмы передачи генетического материала у бактерий. Наиболее благоприятные условия для передачи генов у микроорганизмов создаются в местах их наибольшего скопления в толстом отделе кишечника [136].

В качестве векторов для передачи генов выступают бактериофаги и плазмиды, которые в виде транспозонов встраиваются в геном донора. Возможна передача сразу целого набора генов резистентности к наиболее часто используемым антибактериальным препаратам. Множественная устойчивость обеспечивает бактериям преимущества при условии широкого применения антибиотиков и антисептиков. Формирование возбудителями БП приводит к развитию резистентности в клинических условиях благодаря нарушению проникновения антибиотиков через матрикс биоплёнки, экспрессии генов стрессового ответа, вариации фаз роста, персистирующим микроорганизмам, недостатку питательных веществ в толще биопленки [59, 113, 136, 193].

Таким образом, факторами, способствующими селекции и распространению антибиотикорезистентных изолятов микроорганизмов являются: нерациональное и бесконтрольное применение антибиотиков и антисептиков с лечебно-профилактическими целями; использование пищевых продуктов, содержащих антибиотики. Применение антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и ветеринарии создает условия для селекции устойчивых изолятов микроорганизмов. Проблему могут также создавать антибиотики в почве в относительно низких концентрациях за счет своих естественных продуцентов.

1.3 Критерии этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов и современные методы идентификации

1.3.1 Критерии этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов

При постановке диагноза смешанной инфекции надо иметь в виду, что не каждый присутствующий в патологическом очаге микроб является его возбудителем. При определении этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов при гнойно-воспалительных болезнях животных и осложнениях пользуются рядом критериев, но они условны и, как правило, мало надежны [59, 86, 87, 114, 116, 173, 289, 354].

Лабораторные методы:

Бактериологические методы:

1. Основной критерий - выделение возбудителя из исследуемого материала. При выделении культуры из стерильных в норме биологических жидкостей организма: внутрисуставной жидкости, крови, спинномозговой жидкости данный критерий приобретает практически решающее значение. Если микроорганизм выделен из других нестерильных источников, большее значение приобретают другие критерии. При отрицательном ответе также нельзя судить о стерильности исследуемой пробы, т.к. возможны причины методического характера (недостаточное оснащение лаборатории) и возможно присутствие в клиническом материале антибиотиков, антисептиков и др. В таком случае необходимо ориентироваться на данные клинических и др. лабораторных исследований.

2. Второй по важности критерий - численность микроорганизмов в исследуемом материале, или так называемое «критическое число» (рассчитывают на 1 мл или 1 г). Принято считать для бактерий «критическое число» $> 10^5$ в 1 мл, в некоторых случаях $> 10^4$; для грибов, анаэробов и простейших оно $> 10^3-10^4$. Этот критерий считается решающим в диагностике условно-патогенных микроорганизмов. На практике вопрос намного сложнее и всегда следует учитывать все указанные критерии в комплексе; особое внимание обратить на то,

как взят исследуемый материал (например, при взятии мочи катетером с соблюдением всех правил число ниже 10 тоже расценивают как значимое).

В сомнительных случаях, например, при подозрении на микробную контаминацию исследуемого материала (крови, мочи, спинномозговой жидкости, пунктата), внести ясность может повторное, в течение 12-24 час, исследование этого же материала: повторное выделение того же вида и варианта микроорганизмов и в этот раз подтверждает вывод о его этиологической роли.

При проведении антибактериальной терапии и использовании антисептиков ввиду снижения микробной популяции ориентироваться на критическое число не представляется целесообразным.

Численность микроорганизмов может варьировать от условий и скорости культивирования, температурного режима и вида питательной среды.

Например, в случаях наличия в культуре таких микроорганизмов как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, процент обнаружения *Campylobacter fetus* в исследуемом материале значительно снижается, что связано с антагонистическими отношениями между возбудителем кампилобактериоза и другими бактериями [174, 176].

3. К следующему критерию прибегают в сомнительных случаях, например, при выделении микроорганизма в исследуемом материале ниже критического числа, при подозрении на микробную контаминацию исследуемого материала. Повторное, многократное выделение одного и того же вида микроорганизма из одного и того же материала от больного животного проводят в течение суток или через 1-2 сут. Выделение того же вида микроорганизмов (более точно - варианта) подтверждает вывод об этиологической роли данного возбудителя.

4. Выделение идентичных культур микроорганизмов от группы животных со сходными клиническими или патологоанатомическими признаками, при совместном содержании.

5. Обнаружение идентичных микроорганизмов в разных образцах материала (например, в пробах корма, фекалиях и др.).

6. Обнаружение у выделенной культуры факторов патогенности и вирулентности, в том числе микроорганизмов, формирующих мукоидные фенотипы, биопленки, антибиотикорезистентность этиологически более значимы.

7. Совпадение данных лабораторного определения чувствительности к антибиотикам выделенных микроорганизмов с эффективностью антимикробной терапии в условиях животноводческих хозяйств, что сопровождается улучшением состояния больного животного и уменьшением количества или отсутствием соответствующих микроорганизмов при повторном исследовании [86, 87, 134, 174, 176].

Иммунологические методы:

Серологический критерий - рост в 4 и более раз в сыворотке крови титра антител (к аутокультуре при заболеваниях, вызванных условно-патогенными микроорганизмами) в динамике болезней (для более современных и чувствительных методов, например ИФА, достаточно достоверного нарастания титра антител по сравнению с контролем). Более значимым является определение класса иммуноглобулинов. Наличие в крови пациента антител класса М характерно только для первичного иммунного ответа и подтверждает этиологию инфекционного заболевания. Определение антител к компонентам биопленки.

Клинические методы:

1. Прямая корреляция между чувствительностью выделенной культуры микроорганизма от пациента к антибиотикам и антисептикам и эффективностью проводимой антимикробной терапии.

2. Наличие высокой положительной корреляции между клиническим улучшением при рациональной антибиотикотерапии и уменьшением количества микроорганизмов при посеве [133, 134, 135, 166, 167].

3. Длительное течение болезни, тяжелая и хроническая форма инфекционного процесса.

Эпизоотологические методы:

1. Принадлежность выделенной культуры к нозокомиальным изолятам или эковарам.

2. Установление идентичности выделенных культур (биоваров, сероваров, фаговаров) от группы животных при вспышке болезней в одном или нескольких отделениях животноводческого комплекса [33].

Статистические методы:

Процент встречаемости возбудителя в качестве этиологического агента той или иной нозологической формы согласно литературным данным. Появление возбудителей, которые реже встречались раньше *Stenotrophomonas maltophilia*, *Histophilus somni*, *Actinobacillus ureae*, *Acinetobacter baumannii* complex, *Pantoea agglomerans*, главным образом оппортунистические микроорганизмы, которые вызывают болезни у ослабленных животных (при врожденном и приобретенном дефиците иммунитета, инфицировании вирусом, в неонатальный период) [68, 69, 86, 87, 134, 174, 176].

Таким образом, при выделении условно-патогенных бактерий и для правильной интерпретации результатов исследований необходимо учитывать критерии этиологической значимости. Именно от этого зависит выбор эффективных средств лечения, а также разработка профилактических мероприятий.

1.3.2 Показания к проведению идентификации возбудителей инфекций животных протеометрическим и молекулярно-генетическим методами

Методы видовой идентификации и внутривидового типирования микроорганизмов, проводимые с эпизоотологическими целями, подразделяют на фенотипические (также называемые традиционными или немолекулярными) и молекулярно-генетические (генотипические) [33].

К фенотипическим методам внутривидового типирования относят методы, позволяющие устанавливать различия между штаммами микроорганизмов по способности утилизировать или использовать в качестве субстрата те или иные питательные вещества (биотипирование), особенности антигенной структуры (серотипирование, иммунный блоттинг), чувствительность к бактериофагам (фаготипирование), бактериоцинам (бактериоцинотипирование) или АМП (антибиотикотипирование) [33].

Следует отметить, что фенотипические методы видовой идентификации и типирования штаммов микроорганизмов не всегда обеспечивают получение достоверной информации вследствие следующих причин:

1. Невысокая информативная способность фенотипических методов типирования и идентификации микроорганизмов с измененными биологическими свойствами. Штаммы микроорганизмов, имеющие различное происхождение, могут обладать одинаковыми фенотипическими свойствами в силу единообразия условий окружающей среды. Например, в разных отделениях одного животноводческого или птицеводческого комплекса, в которых используют одни и те же АМП, могут обнаруживаться штаммы возбудителей с идентичным профилем устойчивости к АМП. Поэтому «антибиотикотипирование» не может быть использовано в качестве метода при доказательстве эпизоотического распространения возбудителей из одного животноводческого хозяйства в другое.

2. Недостаточная воспроизводимость результатов фенотипических методов типирования и идентификации микроорганизмов с измененными свойствами. В процессе культивирования на различных питательных средах могут происходить изменения биологических свойств микроорганизмов, таких как мукоидный фенотип, способность к продукции пигмента, бактериоцинов и токсинов, чувствительность к АМП, включая бактериофаги и др.

В целом, фенотипические методы типирования считают слишком вариабельными, трудоемкими и медленными для успешного применения в эпизоотологическом мониторинге за возбудителями редко встречаемыми и с новыми биологическими свойствами [33].

Микробиологический мониторинг необходимо проводить с целью изучения биологических свойств штаммов возбудителей инфекционных болезней животных, выделенных на территории Российской Федерации - прогнозирование эпизоотологической и эпидемической ситуации: возбудители способны покидать природные биотопы, преодолевать межвидовые барьеры, распространение антимикробной резистентности [61].

Видовую дифференциацию микроорганизмов с измененными биологическими свойствами (морфологическими и культурально-биохимическими) сложнее провести с использованием стандартных микробиологических тестов. Оптимизация бактериологических исследований позволяет обнаруживать и идентифицировать возбудителей с измененными свойствами, редкими фенотипами микроорганизмов с целью расширения возможностей видовой расшифровки возбудителей.

Молекулярно-генетический метод. Проведение молекулярно-генетического типирования обязательно при оценке идентичности изолятов микроорганизмов, выявленных из различных источников, и нерезультативном применении при этом комплекса традиционных (фенотипических) методов.

В последнее время для выявления бактерий в любой форме существования широко применяются молекулярно-генетические методы, и, в первую очередь, полимеразная цепная реакция (ПЦР) [358, 359, 366, 370].

Методический подход на основе ПЦР позволяет обойти основную трудность, связанную с тестированием бактерий, находящихся в некультивируемом состоянии (НС), так как дает возможность заменить размножение бактерий как таковых, амплификацией видоспецифичного для данной бактерии фрагмента ДНК [33].

Цели использования молекулярно-генетических методов для видовой идентификации культивируемых бактерий:

- идентификация изолятов с нетипичными свойствами, дифференциация фенотипически неразличимых видов;
- идентификация некультивируемых и медленно растущих бактерий;
- идентификация бактерий без предварительного культивирования, непосредственно в клиническом материале;
- идентификация новых видов бактерий.

При необходимости проведения диагностики болезни методом ПЦР ветеринарный врач всегда должен помнить [180]:

1. Нельзя отбирать образцы материала от животного, если после вакцинации прошло менее 2-х нед (недавняя вакцинация может быть причиной ложноположительного результата на соответствующие болезни животных).

2. Если уже осуществлялось лечение, результат может быть ложноотрицательным, так как некоторые лечебные препараты ингибируют ПЦР.

3. Перед отбором материала лучше проконсультироваться с сотрудниками ветеринарной лаборатории, так как при использовании тест-систем разных производителей могут существовать определенные особенности.

4. Весь материал для исследования методом ПЦР должен поступать в лабораторию с хладореагентом, либо в термосе со льдом.

5. Особое значение в использовании метода ПЦР имеет отбор и хранение клинического материала.

6. Для ПЦР-исследования пригоден любой потенциально инфицированный материал; окончательный выбор материала для анализа должен определяться наиболее вероятным местом локализации возбудителя инфекции в конкретной стадии болезни.

Для исследования методом ПЦР используют кровь, молоко, фекалии, сперму, материал от абортированных плодов (содержимое брюшной полости и желудка), плаценту, плодные оболочки и паренхиматозные органы от абортировавших животных, корма (продукты) животного происхождения.

Развитие молекулярно-генетических методов индикации и идентификации микроорганизмов:

- привело к созданию автоматизированной системы оценки специфичности нуклеотидных последовательностей бактериальных ДНК гена 16S рРНК на основе амплификации с применением специфических праймеров;

- позволило различить близкородственные штаммы и даже внутриштаммовые вариации/в том числе биохимически инертных и плохо растущих бактерий, что дает возможность типирования некоторых возбудителей без выделения чистых культур и экспрессного выявления микроорганизмов в условиях клинической лаборатории.

Однако, при всех достоинствах бактериологического подхода определения микроорганизмов существуют проблемы их культивирования с использованием питательных сред со сложным компонентным составом, трудности создания адекватных условий первичной изоляции и доставки клинического материала, а также трудоемкость и длительность классического микробиологического исследования затрудняют возможность скрининга большого числа проб. Сроки выполнения бактериологического исследования в большинстве случаев являются основным препятствием для назначения первичной этиотропной терапии.

В связи с этим, одним из приоритетных направлений развития лабораторной диагностики оппортунистических инфекций является внедрение в практику новых молекулярно-генетических методов и усовершенствование имеющихся тест-наборов, с целью повышения чувствительности, специфичности и быстроты исполнения анализа.

Протеометрический метод с применением MALDI TOF МАСС-Спектрометрии. Метод MALDI–TOF–MS анализа рекомендуется для применения в рутинной практике микробиологических лабораторий при видовой идентификации УПМ и достоверно повышает качество видовой идентификации труднодиагностируемых микроорганизмов: неферментирующих бактерий, коринебактерий и дрожжевых грибов. Метод выявляет уникальный набор белков микроорганизмов - своеобразный «отпечаток пальца» - «протеомная дактилоскопия», позволяет проводить и субтипирование микроорганизмов [62, 146, 209].

Для своевременной и надежной диагностики оппортунистических инфекций оптимальным представляется комплексный подход, основанный на сочетании традиционных культуральных и более современных иммунологических и молекулярно-генетических и протеометрических (MALDI-TOF) экспресс-методов [146, 209].

Таким образом, внедрение современных лабораторных методов создало принципиально новые возможности для диагностики, контроля лечения и

прогнозирования инфекций. Необходимо применять комплексный подход, который дает возможность:

- установить диагноз с учетом атипичных возбудителей;
- определить антибиотикорезистентность и особенности иммунного ответа к возбудителю;
- оценить тяжесть течения болезни;
- подобрать схему лечения и провести его с учетом особенностей иммунного ответа у каждого животного;
- осуществить контроль эффективности лечения.

Обязательным условием диагностики хронических рецидивирующих форм инфекционных болезней является установление наличия иммунодефицита, оценка состояния гуморального и клеточного звеньев иммунитета, что обосновывает назначение иммуномодуляторов больному животному.

1.4 Антибиотикорезистентность микроорганизмов как основа выбора рационального антимикробного лечения

1.4.1 Фенотипическая и генотипическая резистентность к антимикробным препаратам

Природная чувствительность микробов к антибиотикам связана с наличием в их составе определенных структур, мишеней, синтез которых антибиотики нарушают, или звеньев метаболизма, которые они блокируют, а природная устойчивость (резистентность) - с отсутствием у бактерий таких мишеней [66, 111].

Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика либо недоступностью мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной инактивации. К наиболее хорошо изученным мишеням действия антибиотиков относят клеточную стенку (пептидогликан), цитоплазматическую мембрану, рибосомы, митохондрии, генетические структуры (ДНК нуклеоида) или отдельные этапы синтеза нуклеиновых кислот, белка, липидов, энергетического метаболизма. Следовательно, природная резистентность есть генетически обусловленное отсутствие чувствительности бактерий к антибактериальным средствам, например, микоплазмы не имеют клеточной стенки и резистентны к пенициллинам [136, 144, 168, 170].

При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны.

Приобретенная устойчивость связана с изменением фенотипа или генотипа микроба. Изменение мишеней действия антибиотиков приводит к развитию устойчивости к ним бактерий, в этом случае может возникать полная или частичная перекрестная устойчивость для антибиотиков с аналогичным или близким механизмом действия [57, 153, 168, 169, 176, 177].

Приобретенная резистентность формируется либо в результате мутации в хромосомной ДНК, либо в результате получения микробной клеткой мобильных генетических элементов (плазмид, интегронов) от других бактерий

(горизонтальный перенос генов). Мобильные генетические элементы представляют большую опасность, так как они быстро передаются в популяции микроорганизмов и могут содержать как один ген резистентности, так и несколько генов, кодирующих устойчивость к нескольким препаратам одного класса (перекрестная резистентность), или группы генов, обуславливающие устойчивость к нескольким классам АМП (ассоциированная резистентность).

Благодаря усилиям ученых и фармацевтической индустрии в распоряжении врачей сегодня имеется несколько классов антибактериальных препаратов с различными механизмами действия. Однако патогенные бактерии способны выработать механизмы резистентности к применяемым антибиотикам (рис. 1.4.1.1).

Биохимические механизмы развития лекарственной устойчивости возбудителей универсальны. Всего существует 5 биохимических механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам:

1. Модификация мишени действия.
2. Инактивация антибиотика.
3. Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс).
4. Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки.
5. Формирование метаболического «шунта» [136, 144, 168, 170, 356].

Приобретенная устойчивость может возникать и при синтезе ферментов, разрушающих антибиотики, например, β -лактамаз, разрушающих бета-лактамы препараты. При синтезе β -лактамаз широкого спектра действия возможна также перекрестная устойчивость.

При фенотипической устойчивости происходит повышение резистентности к антибиотикам у большинства особей популяции, без изменения генотипа (вызвана феноменом репрессии-депрессии генов хромосомы или плазмид). Данная устойчивость носит временный и адаптивный характер.

Генотипическая устойчивость может возникать в результате одно- или многоступенчатой мутации в хромосоме или R-плазмидах, а также путем передачи R-плазмиды или участка хромосомы, ответственного за устойчивость,

путем конъюгации, трансдукции или трансформации от устойчивой особи к чувствительной, селекции устойчивых клонов микроорганизмов. При передаче R-плазмиды возможно формирование устойчивости ко многим антимикробным веществам, и к появлению изолятов с множественной резистентностью. В чувствительной к антибиотикам популяции первоначально возникают устойчивые единичные рекомбинанты или мутанты. В неселективной среде, несодержащей антибиотик, микроорганизмы обычно элиминируются, так как не имеют преимуществ; в селективной среде, наоборот, микроорганизмы быстро становятся доминирующими.

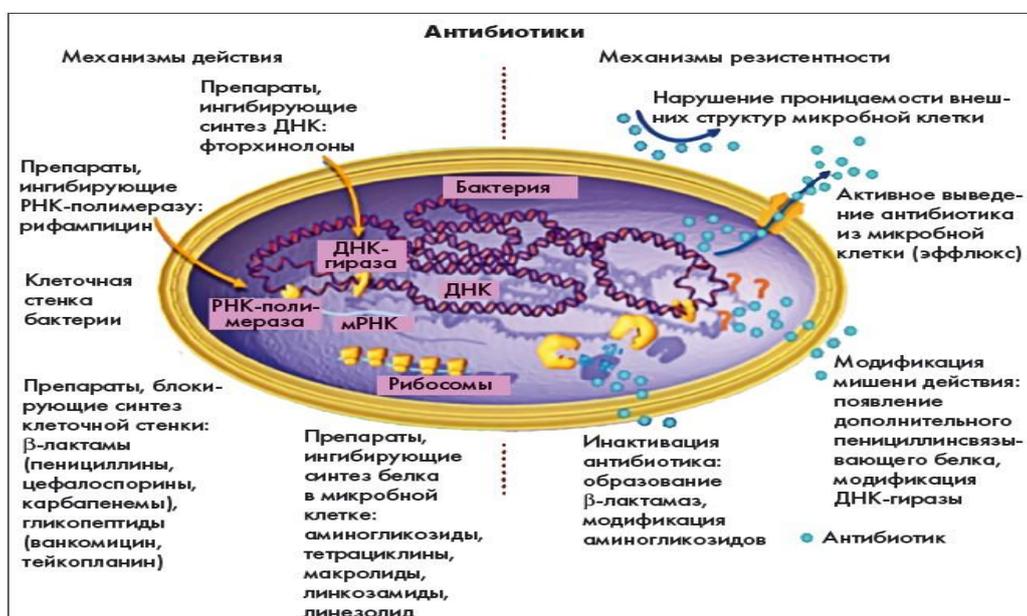


Рисунок 1.4.1.1 - Механизмы действия антибиотиков и механизмы формирования резистентности к ним

Выделяют два типа приобретенной вторичная, между которыми не существует резистентности бактерий: первичная и строгих различий.

Первичная резистентность бактерий имеет место до начала лечения антибиотиками (например, устойчивость некоторых изолятов протей к полимиксину).

Вторичная резистентность бактерий возникает или возрастает в процессе применения антибактериальных препаратов.

С точки зрения генетики частота резистентности обусловлена двумя процессами: распространением генов, детерминирующих устойчивость, и распространением резистентных клонов микроорганизмов.

Таким образом, знание механизмов развития резистентности микроорганизмов к основным антимикробным препаратам, широко применяемым в современной ветеринарной практике, в сочетании со строгим соблюдением принципов рациональной антибиотикотерапии, позволит практикующим ветеринарным врачам существенно повысить качество и сократить сроки лечения животных с бактериальными болезнями.

1.4.2 Характеристика антибиотикорезистентных условно-патогенных возбудителей бактериальных болезней животных и лабораторные методы выявления фенотипов и маркеров антибиотикорезистентности

Проблема резистентности возбудителей болезней животных и человека к антибактериальным препаратам в нашей стране приобрела особую актуальность в связи с утверждением Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года (Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р) [143].

В России создана система мониторинга резистентности на платформе AMRcloud, которая позволяет анализировать и визуализировать данные о чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов. На платформе предусмотрены различные фильтры и функции для ввода данных в виде графиков, таблиц и географических карт. Любой пользователь платформы может получить интересующую выборку данных об антибиотикорезистентности. Платформа AMRcloud упрощает и ускоряет международный обмен данными по антибиотикорезистентности [110].

Открытый обмен информацией является одним из принципов противодействия резистентности микроорганизмов, поддерживаемых международными организациями: ВОЗ (Всемирной организацией здравоохранения), ФАО (Всемирной продовольственной и сельскохозяйственной организации) и МЭБ (Всемирной организации по охране и здоровья животных),

которые призывают страны организовывать совместный мониторинг антибиотикорезистентности в медицинской и ветеринарной сферах и обмениваться результатами.

Для обоснования мероприятий по сдерживанию распространения множественно устойчивых патогенов, являющихся наиболее важными возбудителями трудно поддающихся лечению оппортунистических инфекций, необходима информация об источниках и путях распространения этих бактерий. Соответственно, задачей лаборатории является обнаружение патогена в организме животного с признаками инфекций или без них, а также в объектах внешней среды. В научно-исследовательских лабораториях проводится поиск генетических детерминант резистентности методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), масс-спектрометрии, секвенированием [18, 59, 113, 177, 297, 378].

Неотъемлемой частью эпизоотологического мониторинга является лабораторный контроль как за фенотипами резистентности возбудителей к АМП, так и за механизмами резистентности, имеющими клиническое и эпидемиологическое значение. Европейская система надзора за резистентностью к АМП (EARS-Net) включает мониторинг циркуляции выделенных из крови и ликвора штаммов *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *S.pneumoniae*, *S. aureus*, *E.faecalis*, *E.faecium*, устойчивых к клинически важным антибиотикам: цефалоспорином, карбапенемам, гликопептидам, фторхинолонам и аминогликозидам (табл. 1.4.2.1) [119, 147, 153].

Для лечения животных с инфекциями, вызванными полирезистентными возбудителями, необходимо применение дорогостоящих схем антимикробной терапии. *Важность проблемы ферментной инактивации антимикробных препаратов микроорганизмами:*

- ограничивают применение важнейших и наиболее безопасных антибиотиков;
- их продукция часто сочетается с резистентностью к препаратам других классов;

- гены резистентности быстро распространяются среди микроорганизмов различных родов и семейств;
- неэффективное лечение утяжеляет течение инфекции, приводит к росту летальности, снижением продуктивности сельскохозяйственных животных;
- наносят экономический ущерб, связанный с дополнительной микробиологической диагностикой, проведением инфекционного контроля, затратами на дорогостоящие препараты.

Таблица 1.4.2.1 - Классы АМП, резистентность возбудителей к которым является клинически и эпидемиологически значимой и подлежит молекулярно-генетическому мониторингу [119]

<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis/ faecium</i>
Аминопенициллины ЦРС ¹ Карбапенемы Фторхинолоны Аминогликозиды	ЦРС ¹ Карбапенемы Фторхинолоны Аминогликозиды	ЦРС ¹ Карбапенемы Фторхинолоны Аминогликозиды	Бета-лактамы Фторхинолоны Рифампицин Линезолид Ванкомицин	Ампициллин Гликопептиды Аминогликозиды
Полирезистентность - устойчивость к препаратам нескольких классов ¹ ЦРС- цефалоспорины расширенного спектра				

Выбор критерий для интерпретации результатов антибиотикочувствительности микроорганизмов в ветеринарных лабораториях

В ветеринарных лабораториях не существует единых критериев оценки определения чувствительности к АМП микроорганизмов и оценки результатов, выделенных у животных. Формирование стратегии и тактики использования антимикробных средств в животноводческих комплексах и лечебных ветеринарных учреждениях основывается на анализе результатов идентификации и оценки антибиотикочувствительности возбудителей инфекций, выделенных за определенный временной период [232, 242, 243, 244, 245].

Выбор интерпретационных критериев зависит от целей: для выявления эффективности АМП для лечения животных; для оценки распространенности

биологической резистентности; для микроорганизмов, способных вызывать болезни у людей (*Salmonella enterica*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *E.coli O157: H7* и дргие). Эпидемиологические точки отсечения (EcoFF) позволяют дифференцировать две популяции в соответствии со значениями МПК на «дикий тип» и «недикий тип».

Фенотип «дикого типа» или с первичной резистентностью (или природной) относится к видам бактерий в естественном состоянии. Изоляты «недикого типа» обладают приоритенной резистентностью и поэтому характеризуются сниженной чувствительностью к АМП.

Существуют международные системы критериев, разработанные Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility) и Институтом по клиническим и лабораторным стандартам США CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), которые отличаются между собой. Эти клинические рекомендации для рациональной фармакотерапии человека, разработанные согласно антибиотикочувствительности микроорганизмов и фармакокинетики /фармакодинамики. Руководства регулярно пополняются наиболее современной информацией о выборе лекарственных средств для соответствующих бактерий, содержат совокупность накопленных современных и всесторонних знаний о природной резистентности, необычных фенотипах и интерпретации результатов, контроле качества с использованием стандартных процедур. Эти клинические рекомендации содержат правила интерпритации результатов определения чувствительности, дозирование и предполагаемое применение лекарственных средств для рациональной фармакотерапии человека в медицине.

Клинические рекомендации, разрабатываемые EUCAST, регулярно обновляются, их оригиналы свободно доступны в Интернете (www.eucast.org). Переведённые на русский язык документы находятся на сайте Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (<https://iacmac.ru/ru/info/eucast.shtml>) [242, 243, 244, 245].

Рекомендации EUCAST по выявлению специфических механизмов резистентности, имеющих особое клиническое и эпидемиологическое значение. В правилах представлена интерпретация антибиотикограммы штамма; содержится описание чувствительности к антибиотикам, основанное на современных данных, в ответ на результаты тестирования.

Выявление механизмов резистентности представлены в рекомендациях EUCAST по выявлению специфических механизмов резистентности, имеющих особое клиническое и эпидемиологическое значение:

- выявление известных механизмов устойчивости среди изолятов (У/Р к отдельным АМП, в т. ч. индикаторным);
- выявление редких / не описанных ранее механизмов устойчивости.

Утвержден VetCAST в качестве подкомитета на конгрессе европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным болезням (ESCMID) в 2015 году.

Стандарты эффективности тестов на чувствительность к антимикробным дискам и разведениям для бактерий, выделенных от животных приведены в CLSI VET01.

Сопроводительный документ к VET01- это Vet08, который включает самые современные таблицы для тестирования, с применением антимикробных дисков и чувствительности к разведению для бактерий, выделенных от животных. Целью его является изучение аспектов определения чувствительности к АМП штаммов, выделенных от разных видов животных. Результатом постаналитического этапа лабораторного исследования является оценка клинической значимости выделенных бактерий и интерпретация данных оценки антибиотикочувствительности.

Таким образом, на современном этапе сдерживание распространения устойчивости, преодоление резистентности к АМП, управление этими процессами возможны только при комплексном подходе к решению этой проблемы.

1.4.2.1 Представители *Enterobacteriaceae*, продуцирующие карбапенемазы (CPE)

Новой проблемой стало распространение карбапеземазопродуцирующих штаммов среди животных [239, 339, 283].

Бактериальные ферменты карбапенемазы способны расщеплять все типы β -лактамовых антибиотиков, в том числе карбапенемы. Карбапенемы являются антибиотиками резерва, применяемыми в случае неэффективности лечения, например, цефалоспорины младших поколений.

Бактерии-продуценты карбапенемаз, выделенные от животных, могут быстро распространять гены резистентности среди микроорганизмов различных родов и семейств и быть фактором риска для человека [218].

Продукция карбапенемаз является основным и наиболее эффективным механизмом резистентности к карбапенемам у энтеробактерий [119, 228, 240, 241, 259, 278, 368].

Основными типами карбапенемаз у энтеробактерий являются сериновые β -лактамазы групп KPC и OXA-48 и металло- β -лактамазы (MBL) группы NDM. Дифференциация сериновых и металло-карбапенемаз является значимой не только для эпизоотологии, эпидемиологии, но и для выбора рациональной антибактериальной терапии ввиду различной чувствительности к антибиотикам продуцентов этих ферментов. Поэтому для установления случая инфекции, вызванной CPE, необходимо как подтверждение наличия карбапенемаз, так и их дифференциация на сериновые и MBL одним из нижеперечисленных методов [119, 228].

Метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method - CIM/eCIM) представляет собой тест для выявления продукции карбапенемаз у грамотрицательных бактерий. Принцип метода - выявление ферментативного гидролиза при инкубации карбапенема с суспензией исследуемой бактериальной культуры. В качестве источника карбапенема используется диск с меропенемом (10 мкг) для определения чувствительности дискодиффузионным методом. Оценка результатов проводится на основании наличия или отсутствия зоны

подавления роста чувствительного контрольного штамма *Escherichia coli* ATCC 25922 вокруг диска с меропенемом, предварительно инкубированного с исследуемой бактериальной культурой [119, 339, 369].

Иммунохроматографические тесты по своей специфичности практически не уступают молекулярно-генетическим методам. Данные тесты обладают возможностью определения типа фермента и высокой чувствительностью, скоростью получения результата [119, 153, 262].

Молекулярно-генетические методы, включая наиболее часто используемую ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), применяются для выявления и идентификации генов наиболее распространенных карбапенемаз как непосредственно в образцах биоматериала, так и у микробных изолятов выделенных в чистой культуре. При выделении генов антибиотикорезистентности из стерильных в норме биологических жидкостей организма: внутрисуставной жидкости, крови, спинномозговой жидкости данный критерий приобретает практически решающее значение. Если маркеры антибиотикорезистентности выделены из других нестерильных источников, то они могут продуцироваться транзиторной (сапрофитной, почвенной) микрофлорой, которая не имеет важного этиологического значения [119, 153, 262].

Молекулярно-генетические методы применяют для определения резистентности к антибиотикам с целью оценки генетического разнообразия. Разработаны коммерческие тест-системы для ПЦР-РВ для выявления генов карбапенемаз отечественного производства ЦНИИЭ, ДНК-технологии, Литех и др.

В настоящее время существуют комбинированные тесты для одновременной детекции карбапенемаз, относящихся к группам KPC, OXA-48, VIM, IMP и NDM [119].

Таким образом, доступные в РФ в настоящее время тесты на основе ПЦР в режиме реального времени позволяют надежно выявлять у энтеробактерий гены карбапенемаз, относящихся к группам KPC, OXA-48, VIM, IMP и NDM. Ограничением этих методов, однако, является невозможность обнаружения

редких типов карбапенемаз, не входящих в используемую тест-систему, а также невозможность оценки фенотипической экспрессии выявляемых генов. Поэтому использование молекулярно-генетических методов полностью не заменяет фенотипические методы определения чувствительности.

1.4.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивые к карбапенемам

Pseudomonas aeruginosa характеризуется политропностью, что определяет разнообразие клинических проявлений инфекций в зависимости от путей проникновения возбудителя в организм и особенностей организма животных [344].

Грамотрицательные неферментирующие микроорганизмы *Pseudomonas aeruginosa*, нетребовательны к условиям существования, может вызывать инфекции, тяжело поддающиеся лечению. *Pseudomonas aeruginosa* может вызывать гнойно-септические болезни как продуктивных, так и непродуктивных животных. Данный микроорганизм обладает множеством факторов патогенности, устойчива к целому ряду широко применяемых антибиотиков (например, к пенициллинам без антисинегнойной активности, макролидам, тетрациклинам, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу и т.д.) [271].

Обнаружены *Pseudomonas aeruginosa*, продуцирующие карбапенемазы VIM-2, выделенные от крупного рогатого скота [218].

В настоящее время наблюдается крайне высокий уровень устойчивости синегнойной палочки к фторхинолонам, поэтому в монотерапии данная группа препаратов может использоваться только после подтверждения *in vitro* чувствительности к ним изолятов *P.aeruginosa*.

Применение аминогликозидов в виде монотерапии возможно лишь для лечения неосложненной синегнойной инфекции мочевыводящих путей при подтвержденной чувствительности к данной группе препаратов *in vitro* (в связи с высокой частотой приобретенной устойчивости). Учитывая разный субстратный профиль аминогликозид-модифицирующих ферментов, продуцируемых возбудителем, рекомендуется определять чувствительность *P.aeruginosa* к каждому из аминогликозидов одновременно [144].

Благодаря своему широкому распространению в окружающей среде и постоянному воздействию антибиотиков и дезинфектантов («селективный прессинг») изоляты синегнойной палочки демонстрируют практически все известные механизмы устойчивости к антиинфекционным препаратам. Это создает значительные трудности при выборе адекватной эмпирической терапии полирезистентной синегнойной инфекции, приводя к росту летальности, увеличению длительности терапии и экономическим потерям [72].

Карбапенемы, как и все другие бета-лактамы антибиотики, оказывают бактерицидное действие, нарушая синтез клеточной стенки бактерий путем формирования ковалентной связи с пенициллинсвязывающими белками (ПСБ) – транспептидазами - ферментами, которые участвуют в сшивке пептидогликанового слоя грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [119, 153].

Фенотипическое определение чувствительности - рекомендуется определять чувствительность *P. aeruginosa* к следующим препаратам группы карбапенемов: меропенему (обязательно), имипенему (обязательно), дорипенему (активность дорипенема может быть косвенно оценена на основании результатов определения чувствительности к меропенему). Случаи формирования резистентности *P. aeruginosa* к одному из карбапенемов (имипенему или меропенему) при сохранении чувствительности ко второму препарату не являются редкими [119, 153].

Выявление продукции карбапенемаз у P. aeruginosa. Продукция карбапенемаз приводит к формированию перекрестной устойчивости ко всем карбапенемам у *P. aeruginosa* и часто сочетается с наличием других механизмов резистентности к антибиотикам разных групп. Однако резистентность ко всем карбапенемам может также являться следствием сочетания различных механизмов (изменения проницаемости и эффлюкса). Наиболее распространенным типом карбапенемаз у *P. aeruginosa* в РФ являются MBL группы VIM. Реже встречаются сериновые карбапенемазы группы GES (GES-5-подобные ферменты) и MBL группы IMP. Как и в случае энтеробактерий,

выявление и дифференциация MBL и сериновых карбапенемаз у *P. aeruginosa* имеет важное эпизоотологическое, эпидемиологическое и клиническое значение, в том числе для выбора эффективной терапии. Для выявления карбапенемаз могут быть использованы описанные выше для *Enterobacteriaceae* фенотипические методы (СИМ и eСИМ) и молекулярно-генетические методы (ПЦР-РВ). Тестирование может проводиться после выявления устойчивости к карбапенемам выделенных в чистой культуре изолятов или до получения результатов определения чувствительности к антибиотикам (при наличии локальных эпизоотологических данных о высокой частоте встречаемости карбапенемаз). Молекулярно-генетические методы могут дополнительно использоваться для быстрой детекции генов карбапенемаз в клиническом материале до выделения возбудителя в чистой культуре [119, 153, 221, 222].

Таким образом, только использование всего комплекса подходов к рациональной антибактериальной терапии животных с множественно устойчивыми инфекциями, вызванными *P. aeruginosa*, может помочь не допустить дальнейшего роста антибиотикоустойчивости патогена и сохранить активными оставшиеся антипсевдомонадные препараты.

1.4.2.3 *Stenotrophomonas maltophilia*, обладающие множественной лекарственной устойчивостью

Stenotrophomonas maltophilia – оппортунистический патоген с множественной лекарственной резистентностью, который может вызывать инфекционные поражения различных органов и тканей: пневмонии, менингиты, остеомиелиты, эндокардиты, глазные инфекции, инфекции урогенитального тракта, а также осложнение раневых инфекций. Бактерия распространена повсеместно в окружающей среде, включая растения, животных, продукты питания и источники воды. Низкая проницаемость мембран *S. maltophilia* способствует устойчивости к β -лактамам. Описана резистентность этой бактерии к макролидам, цефалоспорином, фторхинолонам, аминогликозидам, карбапенемам, хлорамфениколу, тетрациклинам и полимиксинам. Предполагается, что приобретение генов резистентности происходит в

окружающей среде, а после попадания в организм животного и человека, штаммы *S. maltophilia* сохраняют эти гены, поэтому такая устойчивость обусловлена не только использованием антибиотиков [318, 367, 371, 363, 384].

Биохимические процессы у бактерий могут позволить использовать антибиотики в качестве источников питания. Механизмы лекарственной устойчивости приобретаются путем горизонтальной передачи резистентности через плазмиды, транспозоны, интегроны, интегроноподобные элементы и биопленки. Из бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL) *S. maltophilia* имеет металло-бета-лактамазу L1 класса B, которая гидролизует пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы (ингибируется ЭДТА) и сериновую цефалоспориназу L2 класса A, которая также гидролизует пенициллины, цефалоспорины и азтреонам (ингибируется клавулановой кислотой) [236, 273, 279].

В современных исследованиях изучаются различия между экологическими и клиническими изолятами, чтобы попытаться определить, какие механизмы ответственны за патогенность этой бактерии у людей. *S. maltophilia* – оппортунистический микроорганизм, однако результаты исследований подтверждают роль этой полирезистентной бактерии в развитии патологий также у животных [236, 273, 279, 318, 363, 380, 384].

S. maltophilia выделена от коз с лимфаденитом в Омане, от лошадей, собак и коров с хроническим кашлем и другими респираторными патологиями в Германии; из маститного молока коров в Японии; из мазков с носовой полости и смывов из трахеи свиней, поражённых гриппом А в Китае [85, 112, 236, 253, 282, 363, 384].

Stenotrophomonas maltophilia, колонизируя биотопы животных, попадает в стрессовые условия, такие как высокая температура тела, иммунологический ответ, воздействие антибиотиков, в результате проявляет более высокую фенотипическую адаптационную способность. Внеклеточные ферменты *Stenotrophomonas maltophilia*: ДНКаза, желатиназа, гемолизины, липазы, протеиназы - могут выполнять существенную роль в патогенезе инфекции.

Фосфолипазы расщепляют фосфолипиды жирных кислот и участвуют в разрушении клеточных мембран. Количество липополисахарида (ЛПС) микроба влияет на антимикробную резистентность и вирулентность *Stenotrophomonas maltophilia* [85, 112, 236].

Увеличение восприимчивости *Stenotrophomonas maltophilia* к некоторым антимикробным препаратам, за счет уменьшения производства ЛПС, делая их полностью авирулентными в живой биологической модели, легко погибая от факторов иммунной защиты хозяина. Существуют мутационные стабильные механизмы и фенотипические обратимые адаптации после удаления селективного давления. Главный из них – модификация липидного компонента внешней мембраны *Stenotrophomonas maltophilia* [85, 112, 236, 367].

Интегроны, гиперэкспрессия эффлюксных систем, формирование меланинподобного пигмента, защищающего клетки от воздействия окружающей среды, и биоплёнки чаще встречаются у изолятов *S. maltophilia* чувствительных к антибиотикам штаммов, что делает их своеобразными маркерами полирезистентности [85, 112, 315].

Таким образом, необходимо проводить мониторинг чувствительности к антибиотикам клинических изолятов *S. maltophilia*, выделенных от животных, потому что микроорганизм обладает способностью к приобретению генов резистентности из окружающей среды (в том числе и от грамположительных бактерий). Мониторинг обеспечивает представление об генах резистентности к антибиотикам у микроорганизмов в окружающей среде, их распространении среди клинических изолятов, что позволяет предложить стратегии профилактики для снижения уровня устойчивости к антимикробным препаратам.

1.4.2.4 *Acinetobacter spp.*, устойчивые к карбапенемам

Важно изучать не только распространенные патогены, но и редко встречающиеся микроорганизмы *Acinetobacter spp.*, устойчивые к карбапенемам поскольку это также может быть проблемой, связанной с качеством молока коров, и соответственно со здоровьем населения [391].

Анализируя литературные данные, полученная информация относительно ограничена по изолятам *A. baumannii*, выделенных от животных. У продуктивных животных (крупный рогатый скот, свиньи) микроорганизмы *A. baumannii* были установлены как этиологически значимые при маститах, пневмонии и сепсисах [391, 394].

Штаммы *Acinetobacter* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) стали серьезной клинической проблемой во всем мире [270].

Сообщалось, что у лошадей развиваются раневые инфекции, сепсис и бронхопневмония, а также неонатальная энцефалопатия и глазные инфекции.

В самой последней опубликованной работе В. Walther, K.S. Klein, A.K. Barton и др. (2018) по изучению *E. coli*, продуцирующей β -лактамазу расширенного спектра (ESBL), сообщается, что у лошадей, поступивших в ветеринарную клинику в период с 2014 г. по 2015 г., было обнаружено девять изолятов *A. baumannii* [374].

У этих изолятов не наблюдалось активности карбапенемазы, один изолят показал фенотип МЛУ (цефтиофур, гентамицин, тетрациклин, тобрамицин, триметоприм / сульфаметазол), тогда как остальные восемь были устойчивы к цефтиофуру.

Пока не ясно, действительно ли животные представляют опасность как резервуар для *A. baumannii* и могут ли люди заразить своих домашних животных [248, 373].

Практически отсутствуют какие-либо данные о присутствии устойчивых к антимикробным препаратам *A. baumannii* в продуктах питания и у сельскохозяйственных животных.

По данным М. Gurung, Н.М. Nam, М.Д. Tamang, М.Н. Chae et al. (2013), *A. baumannii* регулярно обнаруживается в образцах молока, однако большинство выявленных микроорганизмов по чувствительности к противомикробным препаратам не относится к клинически значимым антибиотикам [270].

В недавнем исследовании С. Ewers, Р. Klotz, U. Leidner et al. (2017), изолировали устойчивые к карбапенемам *Acinetobacter indicus*. Несмотря на

предполагаемую низкую патогенность *A.indicus*, они могут способствовать распространению гена *bla*_{оха-23} среди других восприимчивых видов бактерий и их распространению в окружающей среде [249].

Фенотипическое определение чувствительности Acinetobacter spp. Определение чувствительности *Acinetobacter spp.* к карбапенемам и другим antimicrobialным препаратам, проведенное фенотипическими методами показало, что карбапенемы, к которым следует определять чувствительность *Acinetobacter spp.* относятся меропенем и имипенем [119].

Детекция продукции карбапенемаз у Acinetobacter spp. В РФ продукция приобретенных карбапенемаз является основным механизмом резистентности *Acinetobacter spp.* к карбапенемам [119].

Наиболее распространенными типами карбапенемаз являются ферменты группы ОХА-24/40 и ОХА-23, реже встречаются карбапенемазы группы ОХА-58, продукция MBL групп VIM, IMP и NDM отмечается крайне редко. Доступные в настоящее время фенотипические методы, включая СИМ, обладают относительно низкой эффективностью выявления карбапенемаз у *Acinetobacter spp.* и поэтому не могут быть рекомендованы для рутинного использования [112, 119, 153].

Таким образом, существует необходимость в усилении лабораторного мониторинга за *A. baumannii* среди домашних животных, сельскохозяйственных животных и дикой природы.

1.4.2.5 Энтеробактерии, продуцирующие β-лактамазы расширенного спектра

Термин бета-лактамазы расширенного спектра (от англ. «extended-spectrum β-lactamases- ESBL») объединяет большое количество ферментов бактерий, способных расщеплять пенициллины и цефалоспорины, в том числе цефалоспорины III и IV поколений, а также монобактамы (азтреонам), но не гидролизующие цефамицины и карбапенемы. Большинство ESBL относятся к классу А сериновых β-лактамаз и подавляются «классическими» ингибиторами (клавулановой кислотой, сульбактамом, тазобактамом), а также авибактамом.

Проявляют чувствительность к ингибиторам (клавулановой кислоте, сульбактаму, тазобактаму) [119].

Распространенность ESBL-продуцирующих изолятов зависит от ряда факторов, таких как биологический вид, географическое расположение, группа животных и тип инфекции, в результате чего в разных исследованиях были зарегистрированы достаточно широкие вариации. Наиболее частыми продуцентами ESBL являются *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, однако продукция ESBL встречается и у всех других клинически значимых видов энтеробактерий [57, 235].

Длительное применение антибиотиков для лечения инфекционных болезней животных (пневмоний, маститов и других) приводит к развитию антибиотикорезистентности [57, 91, 92, 381].

Реже продукция β -лактамаз расширенного спектра (ESBL) отмечается у других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, у некоторых неферментирующих грамотрицательных палочек, включая *Pseudomonas aeruginosa*.

Большинство β -лактамаз расширенного спектра (ESBL) являются производными широко распространенных плазмидно кодируемых пенициллиназ TEM-1, TEM-2, SHV-1 и отличаются от них единичными аминокислотными заменами, расширяющими спектр ферментативной активности. Ферменты этого типа относятся к функциональной группе 2be. Характерную для БЛРС активность могут проявить и некоторые другие плазмидные β -лактамазы, например, ферменты CTX-M и OXA-типа (последние в меньшей степени подавляются клавулановой кислотой), а также видоспецифические хромосомные β -лактамазы *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter diversum* [119, 144, 153].

Вариации в уровне экспрессии и свойствах различных ESBL (эффективности гидролиза разных оксиимино- β -лактамов: цефотаксима, цефтазидима, цефепима и азтреонама), а также наличие дополнительных механизмов резистентности (других β -лактамаз, нарушения проницаемости) обуславливают существенные различия в уровнях устойчивости ESBL-

продуцирующих изолятов, а также являются причиной недостаточной воспроизводимости и точности определения чувствительности к оксимино-β-лактамам при проведении *in vitro* тестирования продуцентов ESBL с помощью любых стандартных (ручных и автоматизированных) методов [260, 375].

Значения МПК ESBL-продуцентов могут быть ниже установленных клинических пограничных значений для резистентных штаммов. Тем не менее в ряде случаев отмечается клиническая неэффективность цефалоспоринов и азтреонама при терапии инфекций, вызванных формально «чувствительными» продуцентами ESBL. Поэтому монотерапия этими препаратами в стандартных режимах дозирования не может считаться адекватной при обнаружении продукции ESBL [119].

С другой стороны, резистентность к цефалоспорином III поколения и азтреонаму может быть вызвана альтернативными механизмами, например продукцией цефалоспориноаз класса C (AmpC). При этом большинство продуцентов AmpC сохраняют чувствительность к цефепиму [119, 147, 153].

Для эффективного скрининга в рутинное исследование необходимо включить 3 цефалоспорином III поколения - цефотаксим, цефтриаксон и цефтазидим [119, 245].

Методы выявления БЛРС (ESBL) у *Enterobacteriaceae* апробированы в клинической микробиологии, гуманной медицине и желателно внедрять в практику ветеринарных лабораторий:

- метод «двойных дисков»;
- метод комбинированных дисков;
- метод градиентной диффузии;
- автоматизированные системы;
- коммерческие ручные панели МПК;
- метод амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР-РВ) [119, 144, 153].

Метод «двойных дисков» представляет собой вариант классического диск-диффузионного метода определения чувствительности, который позволяет обнаружить продукцию ESBL по наличию расширенной зоны подавления роста

между дисками с оксимино-бета-лактамами (цефтазидимом, цефотаксимомом, цефепимомом, азтреонамомом), и диском, содержащим клавулановую кислоту (в виде стандартной комбинации с амоксициллином). Наибольшую чувствительность и специфичность детекции ESBL у различных видов энтеробактерий обеспечивает использование дисков с цефепимом (в том числе у видов с природной продукцией AmpC) и азтреонамом (в том числе у изолятов, одновременно продуцирующих MBL). Данный метод является наиболее универсальным и может быть использован для обнаружения ESBL у всех видов *Enterobacteriales*, однако визуальная оценка синергизма по расширению зоны подавления роста между дисками является относительно субъективной и требует наличия опыта при учете результатов [119, 144, 147, 153].

Метод «комбинированных дисков» представляет собой вариант классического диск-диффузионного метода определения чувствительности, в котором используются диски, содержащие комбинации цефалоспоринов с одним из классических ингибиторов (цефотаксим/клавулановая кислота, цефтазидим/клавулановая кислота или цефподоксим/сульбактам). Результат теста учитывается на основании сравнения зон задержки роста вокруг дисков с ингибиторозащищенными цефалоспоринами и зон задержки роста вокруг дисков с соответствующими незащищенными цефалоспоринами. Различие в зонах подавления роста на > 5 мм свидетельствует о наличии ESBL. Данный тест является наиболее простым в исполнении, однако позволяет выявлять продукцию ESBL только у отдельных видов энтеробактерий: *E. coli*, *K.pneumoniae*, *P. mirabilis*, и является недостаточно эффективным для других видов, а также для штаммов, ко-продуцирующих другие ферменты, гидролизующие цефалоспорины [119, 144, 147, 153].

Ручные и автоматизированные методы определения МПК оксимино-цефалоспоринов и их комбинаций с клавулановой кислотой. При определении МПК любым доступным в микробиологической лаборатории методом (градиентной диффузии, с помощью автоматизированных систем и ручных панелей) и определение продукции ESBL проводится на основании сравнения

МПК оксимино-цефалоспоринов и их комбинаций с клавулановой кислотой. Снижение МПК хотя бы одного из цефалоспоринов в присутствии ингибитора в 8 раз и более (на 3 последовательных двукратных разведения) свидетельствует о наличии ESBL. Тесты на наличие ESBL интегрированы в стандартные панели для определения чувствительности *Enterobacteriales* большинства производителей автоматизированных систем и, таким образом, позволяют проводить обнаружение данного механизма резистентности одновременно с оценкой чувствительности к антибиотикам [119, 144, 147, 153].

Определение ESBL с помощью автоматизированных систем, ручных панелей МПК и градиентных полосок (E-test) обычно является эффективным для таких видов, как *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, но может быть недостаточно чувствительным для видов с природной продукцией AmpC (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*). Затруднения также может вызывать выявление ESBL у штаммов любых видов с экстремально высоким и низким уровнем устойчивости к цефалоспорином, а также у изолятов, ко-продуцирующих другие цефалоспорин-гидролизующие ферменты (особенно при использовании автоматизированных систем и панелей с ограниченным числом тестируемых разведений антибиотиков). При выявлении сниженной чувствительности к оксимино-цефалоспорином (МПК >1 мг/л) сомнительные результаты выявления ESBL рекомендуется проверять с помощью дополнительных фенотипических тестов (например, методом «двойных дисков») [119, 144, 147, 153].

Молекулярно-генетические методы выявления ESBL. ESBL представляют собой генетически разнообразную группу ферментов, которая объединяет множество генетических типов (семейств). Наиболее распространенными в настоящее время являются ферменты CTX-M-группы (> 90% всех ESBL). Реже встречаются ESBL SHV-типа, которые представляют собой мутантные производные SHV пенициллиназ. ESBL TEM-типа - производные TEM пенициллиназ - встречаются в РФ крайне редко, несмотря на широкое

распространение пенициллин-гидролизующих ферментов этой группы. В настоящее время доступные в РФ для диагностического использования молекулярно-генетические тест-системы позволяют выявлять только гены наиболее распространенных ESBL (группы CTX-M-1, CTX-M-2- и CTX-M-9-родственных ферментов), но не позволяют дифференцировать мутантные варианты SHV и TEM с расширенным спектром активности. Поэтому использование молекулярно-генетических методов не заменяет фенотипическое тестирование для обнаружения ESBL. Методы амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР-РВ, могут применяться для быстрой детекции генов CTX-M β -лактамаз [119, 144, 147, 153].

Таким образом, учитывая высокую частоту встречаемости ESBL у возбудителей и растущую распространенность ферментов этой группы среди возбудителей в РФ, определение продукции ESBL рекомендуется проводить одновременно с определением чувствительности к антибиотикам в ветеринарных лабораториях.

1.4.2.6 *Staphylococcus spp.*, устойчивые к β -лактамным антибиотикам

В основе выбора антимикробного препарата, согласно антибиотикорезистентности микроорганизмов, в настоящее время выделяют пять типов стафилококков (в первую очередь это относится к *S.aureus*) [152]:

1-й тип – стафилококки с естественной резистентностью или чувствительностью к АМП, в частности чувствительностью к пенициллинам (PSS, PSSA);

2-й тип – пенициллинрезистентный, но метициллинчувствительный стафилококк (MSS/PRS, MSSA/PRSA), пенициллинрезистентность связана с выработкой фермента пенициллиназы, которая подавляется полусинтетическими пенициллинами (метициллином/оксациллином);

3-й тип – стафилококки, устойчивые к полусинтетическим пенициллинам, в том числе метициллину и оксациллину (MRS, MRSA);

4-й тип – стафилококки с промежуточной резистентностью к ванкомицину (VIS, VISA);

5-й тип – ванкомицинрезистентные стафилококки (VRS, VRSA).

Резистентность стафилококков к оксациллину (метициллину) может быть обусловлена тремя основными механизмами [111, 223]:

1. Продукцией дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ)- ПСБ-2а (фермента, участвующего в синтезе клеточной стенки), кодируемого хромосомальным геном *mec A* – классическая, или истинная резистентность к метициллину (оксациллину);
2. Инактивацией вследствие продукцией β -лактамаз;
3. Модификацией нормальных ПСБ.

С клинической точки зрения важно дифференцировать штаммы с классической (*mecA* – обусловленной) резистентностью от штаммов с двумя другими редко встречающимися механизмами резистентности, обуславливающими низкий или пограничный уровень устойчивости. Это связано с тем, что при инфекции, связанной со штаммами с *mecA* – обусловленной резистентностью, терапия бета-лактамами антибиотиками (пенициллинами, цефалоспоридами, карбапенемами) неэффективна. Кроме того, эти штаммы часто резистентны практически ко всем другим классам антибиотиков, за исключением гликопептидов (ванкомицин, тейкопланин).

Метициллинрезистентные коагулазонегативные стафилококки Staphylococcus spp. (MRSP). Еще недавно коагулазоотрицательные стафилококки (CoNS) рассматривались исключительно как микроорганизмы, колонизирующие кожу и слизистые оболочки животных и человека, но в процессе накопления клинических данных, а также данных о физиологии КОС, например, способности образовывать биопленку, на сегодняшний день не вызывает сомнений клиническая значимость CoNS.

Коагулазоотрицательные стафилококки (CoNS) относят к возбудителям оппортунистических инфекций, возникающих на фоне иммунодефицитного состояния животных. В медицинском контексте слово «оппортунистический» указывает на готовность действовать, как только складываются определенные условия. При этом возбудителей оппортунистических инфекций характеризуют

как микроорганизмы со слабовыраженной патогенностью, другими словами у них отсутствует «главный фактор патогенности»- токсин и другие биологически активные молекулы, определяющие патогенез инфекции. Отсутствие основного этиологически значимого микроорганизма, определяющего ход инфекционного процесса, сильно затрудняет объяснение механизмов патогенности CoNS. Как показали результаты различных исследований, наибольший клинический интерес представляют изучение механизмов патогенности видов *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, так как эти виды наиболее часто вызывают коагулазоотрицательные стафилококковые ассоциированные инфекции [70, 77, 319].

Множественной лекарственной устойчивостью и основными факторами патогенности характеризуются изоляты CoNS, определяющие сложность протекания инфекции. Клинически значимыми являются коагулазонегативные стафилококки (КНС) - *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S.saprophyticus* и другие [70, 77, 319].

Широкое распространение бактериальных болезней животных, вызываемых коагулазонегативными стафилококками CoNS, делает актуальной проблему их лечения.

Сложности лечения животных с инфекциями, вызываемыми CoNS, связаны с высокой частотой распространения среди CoNS устойчивости к большинству β -лактамных антибиотиков, а также ассоциированной устойчивости к антибиотикам других групп и некоторые из них приобрели гены метициллин-резистентности.

Метициллинрезистентные стафилококки резистентны ко всем бета-лактамным препаратам и к цефалоспорином. Кроме того, нередко метициллинрезистентные коагулазонегативные стафилококки *Staphylococcus spp.(MRSP)* также демонстрируют резистентность к некоторым другим группам антибиотиков.

Для коагулазоотрицательных стафилококков (CoNS, КОС) характерен довольно большой спектр секретируемых ферментов, таких как липазы, протеазы и других экзоферментов. Наиболее хорошо изучены липазы *S.epidermidis*. Еще

одним важным ФВП стафилококков являются различные гемолизины. Для коагулазоположительного стафилококка *S. aureus* описаны α -, β -, δ -, γ -гемолизины. Гемолизины относятся к мембраноповреждающим токсинам [70, 319].

Важно отметить, что коагулаза-отрицательные стафилококки (CoNS, КОС) обладают широким спектром устойчивости к различным антибиотикам. Среди КОС наиболее часто выделяют устойчивые к метициллину изоляты видов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* [70, 319].

Одним из важнейших факторов патогенности и вирулентности КОС является способность формировать биопленки. Бактериальная биопленка представляет собой сложную систему, состоящую из собственно бактерий и связанного с ними внеклеточного матрикса. В составе внеклеточного матрикса можно выделить несколько составляющих: экзополисахариды, белки, а также внеклеточные ДНК и липиды. Бактерии в составе биопленки обладают повышенной толерантностью к эффекторам иммунной системы и к антибактериальным препаратам, что ведет к снижению эффективности антибактериальной терапии [254].

Детекция метициллинрезистентных Staphylococcus aureus (MRSA). Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA) - *S. aureus*, устойчивые к оксациллину (метициллину). Метициллин – первый пеницилиназоустойчивый пенициллин. Снят с производства ввиду отсутствия преимущества перед оксациллином, но термин MRSA сохраняется. MRSA были впервые выделены от коров в 1972 г. [216].

MSSA (метициллинчувствительные стафилококки) - *S. aureus*, чувствительные к оксациллину (метициллину) [10, 201, 261, 375].

MRSA представляют собой неоднородную группу, в которой принято выделять три подгруппы – внутрибольничные MRSA (hospital-associated MRSA, HA-MRSA), внебольничные MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA) и MRSA, ассоциированные с сельскохозяйственными животными (livestock-associated MRSA, LA-MRSA) [201, 207, 309, 353, 361, 362, 363].

Стафилококки зоонозного происхождения (LA-MRSA) чаще колонизируют организм животных, не вызывая болезней, однако они могут приводить к развитию гнойно-воспалительных инфекций у лошадей, маститов у коров, абортов и системных болезней у свиней [222, 283, 292, 295].

В последние годы отмечается способность LA-MRSA передаваться не только от животных к человеку, но и между людьми, а также вызывать серьёзные, угрожающие жизни болезни человека, что обуславливает необходимость изучения закономерностей его распространения, особенно в регионах с развитым животноводством. Поскольку до 86% работников животноводческих комплексов, находящихся в непосредственном и длительном контакте с сельскохозяйственными животными, которые могут быть носителями LA-MRSA, следует изучать распространение LA-MRSA, особенно в условиях лечебно-профилактических учреждений [237, 386, 264].

LA-MRSA часто выявляются у крупного рогатого скота, при этом доля инфицированных животных может достигать 30–60% поголовья скота [208, 220].

Отмечено, что распространённость LA-MRSA на молочных предприятиях значительно возрастает при наличии свиноферм в радиусе 3 км от них [292, 295].

Индустриализация животноводства обуславливает возникновение инфекций, вызванных антибиотикорезистентной условно-патогенной микрофлорой. Селекция LA-MRSA в этих условиях привела к преобладанию в данной группе штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA) – изоляты *S. aureus*, имеющие дополнительный пенициллин-связывающий белок (PBP2a или недавно открытый альтернативным PBP2, кодируемый геном *mecC*), к которым β -лактамы (за исключением цефтаролина) имеют низкую степень сродства. Для выявления резистентности к метицилину/оксациллину могут использоваться как фенотипические – определение МПК, дискодиффузионный метод или серологические – латексная агглютинация для выявления белка PBP2a, так и генотипические методы исследования (ПЦР) [119, 147, 153].

Детекция метициллинрезистентности методом микроразведений или дискодиффузионным методом. Препаратом выбора для определения чувствительности к β -лактамам (кроме цефтаролина) дискодиффузионным методом служит цефокситин ввиду того, что он является наиболее чувствительным и специфичным маркером *mecA/mecC*-опосредованной резистентности. Для подтверждения наличия генов *mecA* или *mecC*, особенно в случае сомнительных результатов фенотипических тестов, рекомендуется проводить молекулярно-генетическое исследование с целью выявления генов *mecA* или *mecC* [119].

Детекция метициллинрезистентности молекулярно-генетическими методами. Для выявления гена *mecA* могут использоваться как коммерческие наборы реагентов и оборудование, так и тесты, разработанные в лаборатории. Вместе с тем следует помнить, что ген *mecC* в настоящее время может не обнаруживаться коммерчески доступными молекулярно-генетическими методами. Важной характеристикой молекулярно-генетических методов детекции метициллинрезистентности является существенное ускорение получения результата за счет возможности выполнения исследования непосредственно клинического материала [119].

Интерпретация результатов определения чувствительности MRSA (метициллинрезистентные стафилококки) - нечувствительны ко всем β -лактамным антибиотикам: пенициллинам, в том числе ингибиторозащищенным, цефалоспорином I-IV поколений и карбапенемам. Кроме того, MRSA обычно резистентны к антибиотикам других классов (макролидам, линкозамидам, тетрациклинам, аминогликозидам и др.) [119, 144, 147, 153, 261].

Таким образом, развитие резистентности микроорганизмов к антибиотикам во многом определяет результативность ветеринарных мероприятий. Изучение антибиотикорезистентности, мониторинга механизмов резистентности возбудителей болезней животных и правильно разработанные схемы лечения — меры, уменьшающие риск распространения полирезистентных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

1.4.2.7 *Enterococcus spp.*, устойчивые к ванкомицину

Применение гликопептидов (ванкомицина, телаванцина, даптомицина) при инфекциях, вызванных энтерококками, устойчивыми к ванкомицину (VRE), малоэффективно [119].

Фенотипические методы детекции устойчивости Enterococcus spp. к гликопептидам (ванкомицину). Определение чувствительности энтерококков к гликопептидам фенотипическими методами (дискдиффузионный метод, метод микроразведения в бульоне, метод разведения в агаре, метод E-тестов). В качестве индикаторного значения используется чувствительность к ванкомицину [119].

Молекулярно-генетические методы выявления устойчивости к гликопептидам (ванкомицину). Определение генов устойчивости к ванкомицину *vanA* и *vanB* с помощью ПЦР может выполняться с использованием коммерческих тест-систем и тест-систем собственной разработки [119, 256].

Появляющиеся на фермах резистентные микроорганизмы могут заражать человека тремя основными способами: через продукты питания, при контактах с животными и через окружающую среду. Активное заражение людей может осуществляться в хозяйствах эмерджентными патогенными микроорганизмами с бета-лактамазами расширенного спектра [121].

Отечественные и зарубежные авторы подтверждают наличие механизмов резистентности к АМП в популяции микроорганизмов, которые вызывают болезни у сельскохозяйственных животных [111, 221, 222, 223].

Важно изучать механизмы резистентности к антимикробным препаратам, проводить систему надзора и лабораторного контроля за антимикробной резистентностью. Оценка механизмов резистентности позволит сократить необоснованное использование антибактериальных препаратов в ветеринарной медицине.

Таким образом, профили чувствительности микроорганизмов и выводы о механизмах резистентности, исходя из результатов тестирования в ветеринарных лабораториях, позволят дать рекомендации ветеринарным врачам – клиницистам для рационального применения АМП.

1.5 Принципы рационального применения антимикробных препаратов (АМП) в ветеринарной практике

Антибиотики, используемые для животных, необходимо выбирать с учетом антибиотикограмм и с учетом тех, которые, согласно классификации ВОЗ, являются «наименее важными» для здоровья людей и не входят в число «высокоприоритетных критически важных» антибиотиков. Антибиотики из категории резерва часто являются препаратами последней линии или входят в число ограниченных препаратов, доступных для лечения тяжелых бактериальных инфекций у людей.

Главное назначение антибиотиков - вылечить больное животное. Чтобы снижение использования антибиотиков не привело к массовым болезням животных и колоссальным убыткам, необходимо провести тщательную подготовку, выявить все факторы, приводящие к болезни. В здоровой благоприятной среде с соблюдением всех норм содержания болезнь не возникает сама по себе. Необходимо разработать программу, которая обеспечит биобезопасность на всех этапах выращивания животных.

При отказе от применения антибиотиков с целью профилактики, стимуляции роста и продуктивности нужно заменить их другими препаратами, направленными на оздоровление микрофлоры кишечника и непосредственное влияние на организм животного [28, 83].

Проведение эпизоотологического надзора за антимикробной резистентностью микроорганизмов необходимо для получения информации для разработки и внедрения более эффективных и рациональных подходов к лечению животных, предотвращения возникновения и распространения антимикробной резистентности на локальном, региональном, национальном и международном уровнях.

Оптимизация применения антибиотиков в ветеринарной практике включает:

– учет информации о механизмах резистентности и распространении резистентных возбудителей инфекции;

- учет антибактериальной терапии (АБТ), которую животное получало в предшествующие 2-3 мес, т.к. повышается риск носительства резистентной микрофлоры;

- дифференцированный подход к стартовому выбору антибиотика при бактериальных инфекциях у животных в зависимости от локализации патологического процесса;

- проведение коррекции стартовой АБТ: при отсутствии клинических признаков улучшения в течение 48-72 ч от начала терапии; в более ранние сроки при нарастании тяжести болезни; при развитии тяжелых нежелательных реакций; при уточнении возбудителя инфекции и его чувствительности к антибиотикам по результатам микробиологического исследования;

- отмена АМП при появлении данных о том, что инфекция не является бактериальной, не ожидая завершения первоначально намеченного курса терапии;

- Отмена назначения АМП вместе с антигистаминными или противогрибковыми препаратами, иммуномодуляторами при проведении коротких курсов АБТ, из-за отсутствия доказательств преимуществ их совместного назначения;

- оценку стратегии и контроль использования антибиотиков в продукции животноводства;

- разработку научно обоснованного подхода к рациональной фармакотерапии животных с проведением системного анализа и оценкой экономической эффективности отбираемых антибиотиков.

Существующие подходы к коррекции проводимой антибиотикотерапии описываются двумя схемами [14, 24]:

1. Схема «деэскалации» (понижения): старт с использования АНТ широкого спектра и затем переход к использованию АНТ более узконаправленного спектра действия после получения результатов антибиотикочувствительности возбудителя.

2. Схема «эскалации» (нарастания): когда при неэффективности проводимой терапии приходится переходить к использованию АНТ (или комбинации АНТ) с более широким спектром действия.

Реализация этих принципов является единственным действенным механизмом ограничения использования АМП, поскольку обеспечивает основу для исключения неэффективного назначения антибиотиков.

Ошибки при назначении антибиотиков [195]:

1. Применение антибиотиков при лихорадке, причина которой неясна.
2. Выбор для лечения антибиотика, который в данном случае неэффективен.
3. Малые или высокие дозы антибиотика.
4. Применение антибиотика при инфекциях, при которых заранее нельзя ожидать эффективности.
5. Неподходящая форма применения.
6. Продолжение лечения препаратом, в отношении которого развилась устойчивость.
7. Продолжение лечения, несмотря на появление токсических или аллергических реакций.
8. Длительное применение в качестве профилактики возможных инфекций.
9. Совместное (комбинированное) применение антибиотиков - антагонистов.
10. Антибиотикотерапия или антибиотикопрофилактика вместо показанного хирургического вмешательства.

Принципы рациональной антибиотикотерапии

Микробиологический принцип. Антибиотики следует применять только по показаниям, когда болезни вызваны микроорганизмами, в отношении которых существуют эффективные препараты. Для их подбора необходимо до назначения лечения взять у больного животного материал для исследования, выделить чистую культуру возбудителя и определить его чувствительность к антибиотикам.

Чувствительность к антибиотикам, или антибиотикограмму, определяют с помощью методов серийного разведения и диск-диффузионным. Методы серийного разведения являются более чувствительными: с их помощью выясняют, какой антибиотик эффективен по отношению к данному микроорганизму, и определяют его необходимое количество – минимальную подавляющую концентрацию (МПК). Низкое значение МПК указывает на высокую чувствительность к АМП. Высокое значение МПК указывает на низкую чувствительность и вероятную резистентность к АМП [119].

Важно изучать механизмы резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам в ветеринарных лабораториях, проводить систему контроля за антимикробной резистентностью. Результаты оценки механизмов резистентности микроорганизмов позволят сократить необоснованное использование антибактериальных препаратов в ветеринарной медицине.

Фармакологический принцип. При назначении антибиотика необходимо соблюдать правильную дозировку препарата, необходимые интервалы между введением лекарственного средства, продолжительность антибиотикотерапии, методы введения. Следует знать фармакокинетику препарата, возможности сочетания различных лекарственных средств. Лечение животных с инфекционными болезнями производится с помощью одного антибиотика (моноантибиотикотерапия). При болезнях с длительным и хроническим течением для предупреждения формирования антибиотикорезистентности применяют комбинированную антибиотикотерапию.

Клинический принцип. При назначении антибиотиков учитывают общее состояние больных, возраст, пол, вид животного, состояние иммунной системы, сопутствующие заболевания, наличие стельности.

Эпизоотологический принцип. При подборе антибиотика необходимо знать, к каким антибиотикам устойчивы микроорганизмы (в конкретном животноводческом комплексе, географическом регионе). Распространенность устойчивости к данному антибиотику не остается постоянной, а изменяется в зависимости от того, насколько широко используется антибиотик.

Фармацевтический принцип. Необходимо учитывать срок годности и условия хранения препарата, так как при его длительном и неправильном хранении образуются токсичные продукты деградации.

Констатация развития инфекции Антибактериальная терапия не должна проводиться без клинико-лабораторных признаков бактериальной инфекции [325].

Появление у животных клинических, лабораторных и/или инструментальных признаков инфекции тоже не всегда должно становиться достаточным основанием для назначения АМП, потому что любой из этих симптомов не является патогномоничным для бактериальной инфекции. АМП не предназначены для устранения этих симптомов, действие антибиотиков должно быть максимально избирательным и направленным преимущественно на подавление жизнедеятельности возбудителей инфекционных болезней. Поэтому перед тем как назначить АМП, ветеринарный врач должен оценить вероятность инфекционной этиологии симптомов, объединить их в синдром, установить диагноз инфекции.

Идентификация возбудителя инфекции с определением его чувствительности к АМП

Значение видовой идентификации для:

- микробиолога заключается в оценке клинического значения, выборе АБ препарата для тестирования и интерпретации результатов определения чувствительности;
- лечащего ветеринарного врача - в оценке клинического значения, выборе АБ препарата для тестирования, выборе режима и длительности терапии;
- эпизоотолога и эпидемиолога – в накоплении и анализе информации, выявлении и прогнозировании эпизоотических вспышек.

Определение мер инфекционного контроля: диско-диффузионный метод (ДДМ) не даёт надёжных результатов при определении чувствительности микроорганизмов к плохо диффундирующим в питательную среду полипептидным антибиотикам (полимиксины, гликопептиды), поэтому для

назначения терапии этими АМП следует определять чувствительность методом серийных разведений.

Невозможно определить чувствительность к бета-лактамам АМП (пенициллину, аминопенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам) с помощью ДДМ. Вначале проводят скрининг с 1 мкг диском оксациллина, при отрицательном результате необходимо определение МИК всех бета-лактамных антибиотиков (пенициллина, аминопенициллинов, цефалоспоринов II - IV поколений, карбапенемов) методами серийных разведений в бульоне или с помощью E-тестов.

Необходимость определения МПК антимикробных препаратов:

- β-лактамы: *S.pneumoniae*
- Ванкомицин: *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.faecium* (и другие гликопептиды)
- Колистин: *Enterobacterales*, *Acinetobacter spp.*, *P.aeruginosa*
- Карбапенемы: *Enterobacterales*
- Ципрофлоксацин: *Salmonella spp.*

В соответствии с этим правилом до первого введения АМП следует произвести отбор биоматериала для молекулярно-генетического и бактериологического исследований [341, 103].

В ветеринарных лабораториях для определения чувствительности микроорганизмов к АМП могут применяться автоматические приборы типа MicroScan WalkAway 40 plus («Siemens», Германия), VITEK, Sensititre («Trek Diagnostic Systems», Великобритания) и др., которые определяют пороговые значения минимальной ингибирующей концентрации АМП (МИК или МПК). Интерпретация результатов зависит от критериев оценки, заложенных в базу прибора.

Выбор оптимального АМП. В зависимости от того, идентифицирован ли возбудитель инфекции, АМТ делят на целенаправленную (направленную против установленного возбудителя инфекции) и эмпирическую, при которой возбудитель неизвестен [119].

При эмпирическом выборе назначение АМП проводят с учетом наиболее вероятных возбудителей данной инфекции и их предполагаемой чувствительности с учетом данных локального микробиологического мониторинга. При эмпирическом назначении антибиотика всегда сохраняется вероятность избыточности или неэффективности, поэтому период ее проведения должен быть максимально коротким, а при правильной организации работы и использовании современных методов лабораторных исследований не превышать 48 ч. После получения результатов исследований необходимо оценить возможность и целесообразность коррекции терапии (продолжить без изменения, провести деэскалацию, дополнить и пр.), но в любом случае с этого момента терапия должна стать этиотропной и проводиться в полном соответствии с принципами А. Флеминга [119, 140, 369].

При проведении целенаправленной терапии учитывают следующие аспекты.

Антимикробную активность препарата в отношении установленного возбудителя или возбудителей. Используемый АМП должен обладать специфическим антибиотическим действием на возбудителя при узком спектре активности. Если установлено несколько возбудителей, то следует назначать монотерапию препаратом, но спектр активности должен соответствовать, либо рациональную комбинацию препаратов.

Способность проникать и создавать терапевтические концентрации в различных тканях и жидкостях организма при назначении в дозах, соответствующих официальной инструкции к препарату.

Применение АМП в дозах ниже терапевтических недопустимо.

При повышении минимальной подавляющей концентрации (МПК) у проблемных условно-патогенных микроорганизмов для получения клинического эффекта антибиотика необходимо увеличить его концентрацию в крови и очаге воспаления (для концентрационно-зависимых антимикробных препаратов) или увеличить кратность и/или продолжительность его введения (для антибиотиков с время зависимым действием). В ряде случаев у животных с инфекционными

осложнениями показано назначение комбинации АМП, обладающих синергическим эффектом в отношении устойчивых к большинству антибиотиков микроорганизм [88, 94, 217].

При проведении эмпирической и этиотропной терапии необходимо учитывать вероятность возможных нежелательных реакций, связанных с особенностями животного (возраст, масса тела, функция почек и печени, стельность, прием других лекарственных средств).

Предложены ингибиторы бета-лактамаз для противодействия ферментативной активности бактерий. В настоящее время клиническое значение имеют три таких ингибитора: клавулановая кислота (клавуланат) и два производных пенициллиновой кислоты — сульбактам и тазобактам. Они представляют собой бета-лактамные структуры, которые необратимо связываются с ферментами, при этом сами разрушаясь. Вследствие чего они получили название суицидных ингибиторов [184].

Они входят в состав комбинированных препаратов, содержащих пенициллиновый антибиотик (ампициллин, амоксициллин, пиперациллин, тикарциллин) и один из ингибиторов β -лактамаз. Такие препараты получили название ингибиторозащищенных пенициллинов (амоксициллин/клавуланат (Ко-амоксиклав), Аугментин, Амоксиклав и др.).

Путь введения препарата. Основными путями введения АМП являются внутривенный, внутримышечный, пероральный, ингаляционный. Альтернативные пути введения (эндолимфатический, внутрибрюшной) имеют недостатки и ограничены к применению. Выбор пути введения определяется тяжестью состояния животных, а также параметрами фармакокинетики и фармакодинамики препарата. Возможен пероральный прием препарата больным животным в удовлетворительном и среднетяжелом состоянии. При тяжелом течении болезни животные должны получать АМП внутривенно, внутримышечно [119].

Оценка эффективности антимикробной терапии (АМТ). Клинический эффект от проводимой антибактериальной терапии у животных необходимо оценивать ежедневно. На основании динамики клинических и лабораторных

показателей, маркеров бактериального воспаления, выраженности органических нарушений решается вопрос о продолжении, усилении и окончании проводимой терапии. Отсутствие эффекта не должно автоматически вести к смене АМТ. В первую очередь следует исключить наличие гнойно-воспалительных процессов (абсцесс, раневая инфекция и т. д.), оценить вероятность неинфекционного генеза сохраняющихся симптомов, рассмотреть наличие небактериальной инфекции (микоз, вирусная инфекция). Коррекцию эмпирического режима антибактериальной терапии следует проводить через 48-72 ч после начала лечения при отсутствии клинического улучшения и/или выделения резистентного к проводимой терапии возбудителя. Исключение составляют случаи стремительного ухудшения состояния животных или получение результатов микробиологического исследования, требующие коррекции антибактериальной терапии [119].

Длительность АМТ. В большинстве случаев длительность эффективной АМТ составляет 5-7 сут, этого времени достаточно для уменьшения микробной массы ниже критического уровня. Исключение составляют инфекции, вызванные неферментирующими полирезистентными грамотрицательными микроорганизмами, бактериемия, вызванные *S. aureus*, инвазивный кандидоз (ИК) у животных с иммунологическим дефицитом. При решении вопроса об отмене АМТ следует ориентироваться прежде всего на отсутствие клинических проявлений инфекционного процесса, остальные признаки являются косвенными. Необоснованно длительное применение антибиотиков приводит к появлению и распространению резистентных микроорганизмов, развитию у больных животных новых нозокомиальных «суперинфекций», аллергических и/или токсических реакций. В конечном итоге это ухудшает состояние животных и снижает эффективность лечения [119].

Алгоритм назначения АМП с учетом механизмов антибиотикорезистентности микроорганизмов. Адекватная АМТ предполагает эффективное действие в отношении всех этиологически значимых возбудителей

инфекции данной локализации в достаточной дозе с учетом риска инфицирования полирезистентными возбудителями [119].

В современных условиях выбор АМТ должен быть основан на знании ряда факторов, определяющих особенности этиологической структуры возбудителей инфекции. К ним относятся:

- локализация инфекции (определение приоритетных возбудителей инфекции, выбор АМП с учетом фармакокинетических особенностей);
- факторы риска наличия полирезистентных микроорганизмов [119].

Схемы антибактериальной терапии инфекций, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов. Целенаправленная АМТ должна начинаться с момента микробиологической идентификации возбудителя инфекции и быть основана на знании чувствительности микроорганизма к АМП и механизмов антибиотикорезистентности. При выборе схемы АМТ необходимо учитывать клиническую картину, способ применения и дозы, указанные в официальной инструкции к препарату [119].

При проведении целенаправленной АМТ инфекций, вызванных грамотрицательными и грамположительными бактериями, являющихся классическими продуцентами ESBL, в большинстве случаев возможно проведение монотерапии. При лечении инфекций, вызванных карбапенемустойчивыми штаммами, как правило, рекомендовано использование комбинаций АМП с различными механизмами действия в зависимости от характера возбудителя и значений МПК.

При разработке схем эмпирической антибиотикотерапии необходимо учитывать следующее:

1. Результаты микробиологических исследований и определение этиологически важного возбудителя. Учет антибиотикограмм, выполненные в динамике с периодичностью 5-10 сут в зависимости от нозологии. Необходимо помнить, что санация антибиотиками носителей оппортунистических микроорганизмов недопустима. Микробиологические исследования

чувствительности и резистентности микроорганизмов, контроль за механизмами антибиотикорезистентности - основа рациональной фармакотерапии.

2. Антибиотики, используемые для животных, необходимо выбирать, учитывая антибиотикограммы и механизмы устойчивости среди тех, которые, согласно классификации ВОЗ, являются «наименее важными» для здоровья людей и не входят в число препаратов резерва. Такие антибиотики из категории резерва часто являются препаратами последней линии или входят в число ограниченных препаратов, доступных для лечения тяжелых бактериальных инфекций только у людей.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует прекратить регулярное использование антибиотиков в животноводстве с целью стимулирования роста при получении продуктов животноводства и профилактики болезней среди здоровых животных.

В целях реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации и систематизации контроля за назначением антимикробных препаратов (АМП) лекарственные препараты разделены на группы по следующему принципу ВОЗ [29, 143]:

I. Препараты из категории резерва, которые запрещено использовать в ветеринарной медицине: для всех видов животных фторхинолоны и цефалоспорины 4-го поколения, рифамицины, карбопенемы, монобактамы, пенемы, гликопептиды (ванкомицин), производные фосфоновой кислоты (фосфомицин), препараты для лечения туберкулеза, аминогликозиды (амикацин, тобрамицин), и дополнительно для продуктивных животных хлорамфеникол, нитрофураны, ниромидазолы, хиноксалины.

II. Препараты, применяемые для предотвращения вспышек болезней в определенные периоды выращивания паразитарной этиологии кокцидиостатики (ионоформные антибиотики: мадурамицин, салиномицин и т.д.) и противопаразитарные (макроциклические лактоны: авермектин, ивермектин, мильбемицин и др.).

III. Препараты выбора по назначению ветеринарного врача на основании диагноза:

Препараты первого выбора:

- пенициллины природные (бензилпенициллин, феноксиметилпенициллин и их соли и т.д.), синтетические аминопенициллины (амоксициллин, ампициллин) и устойчивые к бета лактамазам (оксациллин, клоксациллин и др.);
- тетрациклины (тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин, метациклин);
- макролиды (эритромицин, тилозин, тилмикозин) и плевромутилины (тиамулин, вальнемулин);
- сульфаниламиды и диаминоспиримидины (триметоприм, сульфаниламиды);
- амфениколы (хлорамфеникол только непродуктивным животным, тиамфеникол);
- другие препараты: спектиномизин, полипептиды (бацитрацин, энрамицин, флорофосфолипол), ортозомицины/олигосахариды (авиламицин).

Препараты второго выбора:

Препараты на основе действующих веществ, которые применяются в ветеринарии и медицине, можно использовать для лечения животных в том случае, если неэффективны препараты из категории препараты первого выбора – по результатам определения чувствительности возбудителей к антибиотикам, если начатая терапия препаратами первого выбора оказалась не эффективна.

Беталактамы, пенициллины в комбинации с аминогликозидами, ингибиторами бета-лактомаз, аминогликозиды (гентамицин, стрептомицин, неомицин, клинамицин), макролиды (спирамицин, гамитромицин), азалиды (азитромицин), линкозамиды (линкомицин, клиндамицин), цефалоспорины 1-го, 2-го и 3-го (только ветеринарные) поколения и цефамицины, фторхинолоны 1-го, 2-го и 3-го поколения (энрофлоксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, дифлоксацин), полипептиды (полимиксин В).

3. Фармакокинетика и фармакодинамика:

- принимать во внимание, что антибактериальный препарат должен достигать места локализации инфекции в концентрациях, превышающих МПК, в том числе и при внутриклеточной локализации возбудителя. В связи с этим отдают предпочтение антибиотикам, которые легко проникают в ткани даже при нарушении микроциркуляции;

- доказано, что биопленки являются механизмом защиты от большинства антибактериальных препаратов. Поэтому, несмотря на то, что по критериям назначения антибиотикотерапии большинство обследованных животных нуждаются в системной химиотерапии, её эффективность сомнительна в отношении бактерий в составе биопленки;

- подбирать оптимальную дозировку и интервал между введением препарата, изменение способа введения (дозы, пути, частоты и скорости введения) позволяет получить максимальный антимикробный эффект и свести к минимуму токсические эффекты;

- при длительной терапии, по возможности, минимизировать побочные эффекты (выбирать препараты с минимально выраженными побочными эффектами по данным литературы);

- у животных с иммунными нарушениями включать антибиотики только с бактериостатическим действием;

- при наличии в спектре возбудителей грамотрицательных микроорганизмов выбор делать в пользу антибиотиков, которые разрушают бактерии без высвобождения эндотоксина;

- в случае невозможности обеспечить эффективную антибактериальную терапию при ассоциированных инфекциях использовать комбинацию антибиотиков, избегая, по возможности, усиления токсического эффекта.

Согласно фармакологическому принципу необходимо учитывать достижение препаратом концентрации, превышающей МИК, в инфицированных тканях.

4. При широком использовании антибиотиков наблюдается распространение устойчивости к ним в животноводческих комплексах и

формирование изолятов, имеющих значительную эпизоотологическую и эпидемиологическую опасность, отсюда при проведении антимикробной терапии необходимо учитывать уровень резистентности циркулирующих изолятов. Поэтому отдают предпочтение антибиотикам, которые редко используются в данном хозяйстве, поскольку распространение устойчивости к антибиотикам не постоянно, а меняется в зависимости от того, как широко используется препарат. Обязательно учитывать этиологию болезни и динамику изменения чувствительности к антибиотикам. В животноводческих хозяйствах необходимо разрабатывать схемы ротации антибиотиков.

5. Экономические и социальные аспекты. Принимать во внимание доступность препаратов и стоимость лечения, а также доступность в аптечной сети.

Фармацевтический принцип. Учитывать срок годности препарата, условия его хранения, так как могут образовываться токсичные продукты деградации [153].

Таким образом, использование современных принципов рациональной антибиотикотерапии в ветеринарии, а именно:

- мониторинг бактериальной микрофлоры в критических точках технологического цикла;
- определение чувствительности к АМП для ветеринарного применения;
- мониторинг и ретроспективная диагностика чувствительности на производственных единицах предприятия (площадка, птичник, двор);
- учет наличия остаточных количеств АМП периода ожидания, указанного в инструкции к препарату.

Регулярный качественный мониторинг чувствительности микроорганизмов к АМП на всех этапах производственного цикла позволяет назначить препараты с высокой терапевтической эффективностью, избежать дополнительных расходов на лечение, потери продуктивности и трудозатрат специалистов.

1.6 Монотерапия и комбинированное назначение антибактериальных препаратов

Высокая стоимость многих новых антибиотиков является сдерживающим фактором. Преимущества антимикробной монотерапии особенно очевидны при генерализованных, тяжело протекающих инфекциях: снижается риск побочных реакций, токсических реакций [77, 132, 171].

Ветеринарный врач должен соблюдать принципы дозирования АМП, чтобы уничтожить патогенных бактерий в месте воспаления. В случае тяжелых течений инфекций воспалительные процессы приводят к органным дисфункциям. По этой причине раннее назначение антимикробной терапии имеет важное значение для снижения бактериальной нагрузки, стимулирующей воспалительный ответ.

Характеристики фармакокинетики (ФК) АМП. Вариации ФК могут быть вызваны гидрофильной (бета-лактамы, аминогликозиды, гликопептиды, колистин, линезолид) или липофильной природой АМП (фторхинолоны, макролиды, линкозамиды), а также недостаточностью органов, вызванной тяжелыми инфекциями [325].

Как в случае гидрофильных и липофильных лекарственных средств, изменения в функции почек и /или печени могут оказывать влияние на клиренс (CL) АМП.

Уникальным среди антибиотиков является азитромицин, который обладает тканевой фармакокинетикой. Азитромицин быстро покидает кровотока и концентрируется в фагоцитах, которые выполняют транспортную функцию и доставляют антибиотик к месту воспаления. Внутритканевая циркуляция антибиотика может продолжаться до 10 дн и не требует введения новых доз препарата в организм извне, что предопределяет возможность 3-дневных коротких курсов антибактериальной терапии [94].

Классификация фармакодинамики (ФД) АМП. Различные профили АМП в интервале дозирования (или в 24-часовом период) связаны с максимальными ФД-эффектами.

Описание трех различных классификаций фармакодинамики АМП [325]:

- *эффекты, зависимые от времени АМП* (бета-лактамы, карбапенемы, линезолид, эритромицин, кларитромицин, линкозамид) имеют максимальный микробиологический эффект, когда их концентрация поддерживается на уровне выше *МИК* как можно дольше на протяжении всего интервала дозирования;

- *эффекты, зависимые от концентрации АМП* (аминогликозиды, фторхинолоны, метронидазол) имеют максимальный микробиологический эффект, обусловленный величиной пиковой концентрации АМП относительно *МИК* патогена;

- *эффекты, зависимые от комбинации времени и концентрации АМП* (фторхинолоны, аминогликозиды, азитромицин, гликопептиды, линезолид).

Вместе с тем возможность развития суперинфекции в случаях длительного использования антибиотиков ограничивает возможность их широкого применения. Выбор препаратов для антимикробной терапии в ветеринарной практике затруднен, так как этиологическим фактором является не один возбудитель, а их ассоциация [77, 132, 171].

Одновременное назначение двух и более антимикробных препаратов приводит к:

- усилению антимикробного эффекта;
- расширение спектра антимикробного действия;
- снижению риска возникновения антибиотикоустойчивых изолятов микроорганизмов.

Показанием к одновременному применению двух или более антибактериальных препаратов является:

- смешанная полимикробная аэробно-анаэробная инфекция, отсутствие средств, охватывающих весь спектр микроорганизмов, когда монотерапия неэффективна (интраабдоминальная инфекция, ожоги);

- тяжелые, генерализованные формы инфекции, когда возбудитель не установлен;

- инфекция у животных на фоне иммунодефицита при неустановленном возбудителе;

- усиление бактерицидного эффекта при наличии слабо чувствительных изолятов микроорганизмов за счет разного механизма действия антибактериальных препаратов;

- для потенцирования действия или защиты одного компонента препарата другим, например, комплексный препарат ко-тримоксазол (триметоприм и сульфаметоксазол) - потенцирование эффекта; или сульбактам и ампициллин - сульбактам блокирует фермент бета-лактазу микроорганизмов, защищая ампициллин, и тем самым значительно увеличивает его бактерицидный эффект;

- для уменьшения тяжести и частоты развития побочных реакций (микроорганизм сохраняет чувствительность к каждому из препаратов, если они применяются только в высоких дозах). В этом случае используют комбинацию препаратов в дозах ниже терапевтических;

- наличие биопленки.

Следует избегать необоснованного одновременного назначения двух и более антибактериальных средств.

Недостатки комбинированного лечения:

- подавление обычной флоры, увеличение риска колонизации устойчивыми микроорганизмами и развитие оппортунистических инфекций;

- увеличение частоты побочных эффектов;

- ослабление эффекта одного препарата другим или антагонизм между препаратами;

- увеличение стоимости лечения.

Комбинированное использование антибактериальных препаратов предполагает, прежде всего учитывать их сочетаемость. Необходимо использовать такие комбинации, которые приводят к синергизму или суммированию антибактериального действия (табл.1.6.1) [184].

Отмечается синергизм действия цефалоспоринов с аминогликозидами, но при их комбинации появляется риск побочных явлений, например, увеличивается поражения почек, печени.

Таблица 1.6.1 - Фармакодинамическое взаимодействие различных комбинаций антибиотиков

Антибиотик	Пенициллины	Цефалоспорины	Карбапенемы	Аминогликозиды	Макролиды	Тетрациклины	Линкосамиды	Фторхинолоны	Нитрофураны	Имидазолы
Пенициллины	+	+	-	++	-	-	-	++		++
Цефалоспорины	+/0	+	-	++	++	-	-	++	+	++
Карбапенемы	-	-			++			++	+	++
Аминогликозиды	++	-/0	-		-	+	+	++	+	+
Макролиды	+	++	+	+	+	++		+	++	++
Тетрациклины	-	-	-	+	++		++	+	++	
Линкосамиды	-	-	-	-		++		++	++	0
Фторхинолоны	++	++	++	++	+	+	+	+	+	++
Нитрофураны	+	+	+	+	+	+	+	+		-
Имидазолы	++	++	++	++	++		0	++	-	

Примечание: обозначения эффектов различных комбинаций антибиотиков: «-» – антагонистическое действие; «0» – *индифферентное*; «+» – *аддитивное*; «++» – *синергидное*.

Синергизм между антимикробными препаратами (например, ципрофлоксацином) и макролидами можно объяснить тем, что вследствие антиальгинатного действия 14/15-членных макролидов возрастает проникновение ципрофлоксацина внутрь биопленки.

Макролиды проявляют синергизм с тетрациклиновыми антибиотиками. Эти комбинации – пример фармакодинамического синергизма: два разных антибиотика действуют на две разные мишени в бактериальной клетке, увеличивая суммарную эффективность.

Фармакокинетический синергизм наблюдается при комбинировании антибиотиков с одинаковым механизмом действия, но разным распределением в организме. Например, макролиды и аминогликозиды действуют на одну и ту же мишень (синтез белка в микробной клетке), поэтому синергизма *in vitro* они не проявляют.

Наиболее оптимальной является комбинация двух бактерицидных или двух бактериостатических препаратов. Нельзя комбинировать бактерицидные и

бактериостатические антибактериальные препараты, так как бактерицидные наиболее эффективны в отношении размножающихся микроорганизмов, а бактериостатические, подавляя размножение, защищают микроорганизмы от действия бактерицидных средств.

Комбинацию различных антибактериальных препаратов необходимо применять с осторожностью, поскольку они могут оказывать неблагоприятное воздействие на кровь, печень, почки и другие органы [77, 144].

Комбинации антибиотиков против грамотрицательных бактерий.

В большинстве случаев при MDR-инфекции и практически во всех случаях XDR- и PDR-инфекции необходимо применять комбинированную антибиотикотерапию. Комбинации антибиотиков с недостаточной чувствительностью *in vitro* являются последним шансом, хотя эффективность этих режимов все же должна быть подтверждена клиническими исследованиями [36, 37].

Комбинации антибиотиков против грамположительных бактерий. Часто для эрадикации полирезистентных грамположительных микроорганизмов необходимо применять сочетание антибиотиков, в частности, препаратов для MRSA-инфекции с промежуточной или отсутствием чувствительности к гликопептидам.

Совместное влияние двух или трех антибиотиков, в зависимости от механизмов их действия, может оказать суммарным (аддитивным), ниже суммарного (антагонистический) или выше суммарного (синергидный) эффекты [171].

Возможны следующие варианты взаимодействия антибиотиков при их одновременном назначении:

- *индифферентное* – изменение эффекта каждого из препаратов не отмечается;
- *аддитивное (суммация)* -полученный антибактериальный эффект равен сумме действия каждого препарата в отдельности;

- *синергидное* – полученный эффект превышает сумму действия каждого препарата;
- *антагонистическое* – полученный эффект ниже, чем эффект каждого препарата по отдельности.

Антагонистическое действие часто возникает при совместном назначении антибиотиков с бактериостатическим и бактерицидным действием, т.к. бактерицидные действуют на микробную клетку в стадии деления, а бактериостатические препараты процесс деления нарушают.

В клинической практике нередко приходится прибегать к комбинированной терапии – использование двух и более антимикробных средств, дополняющих друг друга по эффективности. При выборе комбинации необходимо стремиться к усилению антимикробной активности, расширению спектра антимикробного действия, снижению тяжести побочных эффектов.

1.7 Борьба с лекарственно устойчивыми бактериями в ветеринарной практике и профилактика их распространения

Меры борьбы с лекарственно устойчивыми бактериями разрабатываются сразу в нескольких направлениях:

- получение новых химиотерапевтических препаратов, которые отличаются от существующих по механизму действия;
- создание моноклональных антител к липиду А (структурный компонент эндотоксина) грамотрицательных бактерий, ингибирующих активацию рецепторов на макрофагах;
- разработка и испытание препаратов, препятствующих адгезии бактерий на клетках макроорганизма.

Химическая модификация известных антибиотиков с защищенными активными группами, устойчивыми к бактериальным ферментам: совместное использование с известными антибиотиками - ингибиторами бактериальных ферментов (например, сульбактам необратимый ингибитор бета-лактамаз и ампициллин).

Воздействие на биопленки микроорганизмов (предотвращение ее образования и ее разрушение) [134].

Ограничение развития устойчивости к противобактериальным препаратам может быть достигнуто следующим образом:

- следует избегать нерационального использования антибиотиков: применять только при наличии показаний, в определенных дозах (небольшие дозы антибиотиков способствуют селекции устойчивых клонов микроорганизмов), соблюдать интервалы между введениями, применять в течение определенного времени;
- комбинировать препараты только по показаниям, например, при смешанной полимикробной инфекции, тяжелых состояниях и т. п.;
- постоянно контролировать уровень резистентности микроорганизмов у животных на животноводческих комплексах;

- ограничивать использования антибиотиков в клинической практике, животноводстве и т.п.;
- ограничить использование нового препарата до тех пор, пока проявляют эффективность уже используемые средства.
- искать методы предотвращения формирования мукоидных фенотипов, биопленки, антибиотикорезистентных микроорганизмов в очаге инфекции.
- проводить непрерывные образовательные мероприятия.

Профилактика и лечение бактериальных инфекций в скотоводстве сводятся к следующим принципам:

- наиболее важна текущая профилактика в критические моменты выращивания телят и поросят (отъём, перегруппировка, смена корма и т.д.);
- при возникновении болезни её необходимо быстро купировать и эффективно лечить животных с помощью соответствующих водорастворимых антибиотиков;
- при тяжёлом и осложнённом течении болезни возможно применение инъекционных антибиотиков.

Распространение резистентных грамотрицательных бактерий и отсутствие новых соединений для лечения вызванных ими инфекций актуализирует поиск новых антимикробных веществ и новых терапевтических подходов в профилактике повышенной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам [36, 37].

Комбинирование антибактериальных препаратов. Синергетическое действие двух антибиотиков в комбинации более эффективно подавляет рост микроорганизмов. С другой стороны, проявляется их способность быстрее сформировать резистентность у микроорганизмов к антибиотикам, способствуя выживанию резистентных форм. Комбинации антагонистических препаратов являются менее эффективными в отношении чувствительных патогенов, при этом селективное преимущество одного из препаратов может уменьшиться, в результате антагонистической пары антибиотиков, способных предотвратить МЛУ [119, 36, 37].

Комплексное применение антибиотика и пробиотика является эффективным в терапии бактериальных болезней, но необходимо учитывать и определять природную резистентность пробиотического штамма к АМП. Пероральный прием антимикробного препарата дает возможность использования временного интервала, что в свою очередь позволяет назначать пробиотический препарат после снижения концентрации антибиотика в просвете кишечника до минимальных значений. Помимо этого, возможно использование сведений о резистентности пробиотических штаммов к АМП [83, 160].

Несмотря на эффективность применения пробиотиков, к сожалению, отказаться от антибактериальных средств, сложно. Поэтому наилучшим выходом, по нашему мнению, является применение такого комплексного препарата, который бы содержал в своем составе одновременно антибактериальный препарат и пробиотик, устойчивый к сочетанному антибактериальному компоненту.

Разработан комбинированный препарат, содержащий ацидофильную симбиотическую культуру микроорганизмов (ТУ 9197–001–0047941-97), антибиотик энрофлоксацин и наполнитель масло твин – 80, на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» и апробирован в производственных условиях. При конструировании препарата учитывались положительные результаты, полученные в НИИ особо чистых биопрепаратов (Санкт-Петербург) [28, 83, 141].

В отличие от моноштаммов, бикультура живых молочнокислых бактерии *Lactobacillus acidophilus* штаммов Д-75 и Д-76 образуют симбиоз, характеризуются расширенным спектром и высоким уровнем антагонистической активности, устойчивостью ко многим антибиотикам, высоким содержанием жизнеспособных клеток и длительным сроком хранения [28, 37, 83].

Бактерии проявляют антагонистические свойства не только *in vitro*, но и *in vivo* в отношении микроорганизмов рода *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Proteus*, которых относят к патогенной и условно - патогенной микрофлоре, в то

же время проявляют слабое действие или полное отсутствие антагонизма в отношении нормального кишечного микробиоценоза здоровых телят.

Применение пробиотиков на основе молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* штаммов Д-75 и Д-76 позволяет повысить сохранность молодняка крупного рогатого скота, увеличить среднесуточный прирост массы тела, сократить количество патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в организме телят, улучшить физиологические и биохимические показатели, скорректировать состояние естественного микробиоценоза. Одновременно с перечисленными характеристиками пробиотика, наблюдается снижение побочных действий антибиотиков на организм телят при их сочетанном применении [28, 37, 83].

Пробиотические препараты. Основным средством коррекции кишечной микрофлоры и лечения дисбактериоза кишечника являются пробиотические препараты. Для предотвращения болезней, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, созданы пробиотические препараты. Метод их использования связан с антагонистической активностью авирулентных штаммов микроорганизмов по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. Подобные препараты выпускают под разными торговыми марками [95, 127].

Ингибирование мутаций. Мутации, придающие устойчивость к антимикробным агентам, являются неизбежным следствием ошибок ДНК-полимеразы. Ингибирование белков бактерий, выполняющих активную роль в мутациях собственных геномов, или подавление их дерепрессии может представлять собой принципиально новый подход в борьбе с развитием резистентности. В сочетании с ошибками ДНК-полимераз у бактерий возможны повреждения ДНК, возникающие от регидратации, воздействия антибиотиков, химических окислителей, теплового шока, ультрафиолетового излучения, дезинфицирующих веществ, включения чужеродной ДНК в свой геном [272].

Химиосенсибилизация. Химиосенсибилизаторы ослабляют различные механизмы устойчивости или усовершенствуют конструкцию молекулы антибиотика, чтобы уменьшить его восприимчивость к инаktivации бактериями.

S. Alibert-Franco, A. Mahamoud, J. M. Bolla (2010) была разработана новая группа антибактериальных молекул EPI (*efflux pump inhibitor*), которые блокируют экспрессию генов, отвечающих за активное выведение антибиотиков из клетки, и восстанавливают их нормальную внутриклеточную концентрацию, оказывают влияние на энергетические процессы активного транспорта, подавляя поток молекул внутри канала путём конкурентного выведения или его блокирования. Они могут действовать совместно с обычными антибиотиками, восстанавливая их активность. Несколько производных хинолина считаются EPI-веществами широкого спектра для *K.pneumoniae* и демонстрируют увеличение внутриклеточной концентрации норфлоксацина, хлорамфеникола, тетрациклина [210].

Вакцинация. Одним из способов борьбы с АМР является иммунизация. Вакцинация способна снизить распространённость резистентности путём снижения общего числа случаев инфекционных болезней. В РФ принята стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года, где отмечено, что особая роль в борьбе с устойчивостью микроорганизмов принадлежит вакцинопрофилактике, которая обеспечивает формирование специфического иммунитета, что приводит к снижению потребности в применении противомикробных препаратов. Наряду с лечением оппортунистических инфекций антибактериальными препаратами и средствами воздействия на специфические и неспецифические факторы защиты, возможно создание вакцин из аутоштаммов или штаммов, циркулирующих в конкретном животноводческом комплексе.

Специфическая профилактика является одним из механизмов видовой смены возбудителей болезни. Под действием вакцин и вырабатываемого специфического иммунитета угнетаются возбудители профилактируемых болезней, и происходит освобождение ниши для других возбудителей, обладающих сходным тропизмом. В настоящее время вакцинация - обязательное мероприятие, без которого не обходится ни одно хозяйство. Проведение вакцинаций привело к формированию атипичных и скрытых форм течения

болезней. Характерный инфекционный процесс с классическими клиническими признаками постепенно переходит в скрытое, бессимптомное течение и распространение болезни, но при этом создается обманчивая ситуация благополучия [84].

В очаге воспаления присутствует ассоциация условно-патогенных микроорганизмов. Вследствие этого вакцина также должна быть поликомпонентной. Имеются и моновакцины, применяемые при особенно часто встречающихся возбудителях оппортунистических инфекций, в частности, стафилококков (в структуре болезней, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, около половины занимают стафилококковые инфекции) [84].

При инфекциях, вызываемых микоплазмами *M. bovis*, отмечаются высокие сывороточные титры специфических IgG1, а также развитие локального иммунного ответа, опосредованного IgG и IgA. Однако вакцин, обеспечивающих эффективную защиту от заболеваний, вызываемых *M. bovis*, в настоящее время не существует. Применяемые в США вакцины (Мусо-В, Pulmo-Guard™ МрВ, Мусоплаз Cattle Vaccine), в состав которой входят антигены *M. bovis*, защищает от артрита и респираторных форм заболевания, а также против микоплазменных маститов.

Эффективных подходов к вакцинопрофилактике артритов и маститов, вызываемых *M. bovis* в настоящее время не разработано [333].

Иммунный ответ на уреоплазмы *U. diversum* опосредуется в первую очередь секреторными иммуноглобулинами класса А. В то же время у *U. diversum* выявлена специфическая протеолитическая активность, направленная против данных иммуноглобулинов. Протеазы уреоплазм вносят разрывы в цепи иммуноглобулинов, в результате которых происходит разделение антиген-связывающих и консервативных доменов в их составе [24,25,333].

Использование вакцин позволит сократить до минимума применение антибиотиков и сульфаниламидов в животноводстве. Однако при этом необходимо соблюдать ряд условий. Полный курс вакцинации следует повторять при каждой стельности животного. При этом существует три стратегии:

вакцинация нетелей, вакцинация больших стад, вакцинация малых и средних стад. Запрещено использовать вакцины с другими иммунобиологическими средствами, а также вакцинировать животных другими препаратами в течение 14 сут после очередной иммунизации. Вакцины способны профилактировать возникновение эндометрита и желудочно-кишечных болезней у телят с формированием приобретенного иммунитета сроком 3–6 мес. Однако, вакцины способны обострять течение субклинических маститов и переводить их в клиническую форму, которая поддается воздействию антибиотиков.

Бактериофаги. Одним из актуальных направлений исследований является изучение различных фаговых ферментов, участвующих в стадии адсорбции литических фагов на бактериальных клетках. Как известно, в основе адсорбционного процесса лежит распознавание фагом специфических рецепторов, расположенных на поверхности бактериальной клетки. Некоторые бактерии синтезируют различные вещества, которые позволяют им экранировать структуры клеточной стенки, делая адсорбцию невозможной. Примером таких веществ могут служить капсульные полисахариды, часто играющие роль важного фактора вирулентности бактерии. Для того чтобы преодолеть барьер, образованный капсульными полисахаридами, бактериофаги синтезируют специальные ферменты (полисахарид-деполимеразы, ПС-деполимеразы), расщепляющие подобные поверхностные образования. Бактериофаги специфичны и не влияют на эукариотические клетки, индуцируют бактериолиз с помощью механизмов, отличных от антибиотиков [112].

Возможно применение бактериофагов для обработки биоплёнок, поражая микробные клетки. Фаги реплицируются, создавая высокую концентрацию, постепенно разрушая биоплёнки; инфицируют персистентные клетки и остаются в них, пока они не станут метаболически активными, после чего уничтожают их. Ослабление или уничтожение биоплёнки фагами может способствовать проникновению антибиотиков, что увеличивает возможность их синергетической комбинации [135].

Использование антимикробных пептидов (AMP). АМП — это разнообразная группа молекул, которые производятся многими тканями и типами клеток различных беспозвоночных, растений и животных [112].

Механизм действия АМП заключается в уничтожении бактерии путём формирования пор в клеточных мембранах, некоторые из пептидов ингибируют функции внутриклеточных биополимеров. Связываясь с анионными участками липополисахарида, поликатионы ослабляют межмолекулярные взаимодействия липополисахарида, разрушая мостики из двухвалентных катионов, делая его проницаемым для лекарственных средств. Потенциал АМП был оценен в отношении многих УПМ отдельно и в сочетании с антибиотиками. Кроме того, наблюдался синергизм между пептидами и полимиксином Е, меропенемом, цефтазидимом, пиперациллином и кларитромицином [11, 313].

Воздействие на плазмиды. Уникальная стратегия исключения плазмид, несущих гены резистентности, из бактериальной клетки заключается в ингибирование конъюгации при помощи некоторых веществ: дегидрокрепениновой, линолевой и линоленовой кислот [112].

В естественных условиях в дочерних бактериальных клетках, которые не унаследовали плазмиду, кодирующую систему бактериальный токсин-антитоксин (БТА), антитоксин разрушается клеточными протеазами и не реплицируется, освобождая скрытый токсин, который способен убить клетки, и, таким образом, уменьшить популяцию микробных клеток, не содержащих плазмиды. Подавление репликации плазмиды и искусственная активация токсина в этой системе имеет потенциал новой антибактериальной стратегии, что и было продемонстрировано в отношении клинических изолятов *P.aeruginosa* [112, 119, 377].

Влияние на механизмы патогенности. Показана возможность подавления протеаз *Stenotrophomonas maltophilia*, способствующих вторжению в ткани и их разрушению. Такие вещества-ингибиторы не влияют на подобные ферменты хозяина, так как существует немного структурных взаимосвязей между прокариотическими и эукариотическими протеазами, несмотря на схожие механизмы действия, что и определяет разработку ингибиторов с требуемой

специфичностью. На примере *P.aeruginosa* было показано, что химический элемент галлий (Ga) может заменить во многих биологических системах железо (Fe) и ингибировать Fe-зависимые процессы, такие как синтез ферментов: рибонуклеотидредуктазы, супероксиддисмутазы, каталазы, цитохромов, а также подавлять рост и образование биоплёнок [119].

Нанотехнологии. Неорганические вещества в виде наночастиц имеют перспективное направление в качестве антимикробных агентов. Нанораз-мерные материалы имеют большую площадь поверхности по отношению к объёму, что приводит к повышенной реактивности. Показана бактерицидная активность наночастиц серебра против штаммов *P.aeruginosa* и способность препятствовать образованию биоплёнок [135].

Широкое распространение полирезистентных микроорганизмов может привести к отсутствию эффективных антибиотиков, что значительно ухудшит результаты лечения инфекционных болезней. Профилактикой MDR-инфекции является упорядоченное назначение антибиотиков и отказ от их применения, если в этом нет необходимости [35, 36].

Таким образом, отечественные и зарубежные ученые в области гуманной и ветеринарной медицины должны предпринимать больше усилий, чтобы уменьшить частоту образования генов резистентности у экологических бактерий, снизить поступление резистентных бактерий в организм человека и животных через продукты питания, окружающую среду и воду, минимизировать уровни антибиотиков и антибиотикоустойчивых бактерий, попадающих в окружающую среду. Снижение этого риска должно включать оптимизированную стратегию применения антибиотиков.

1.8 Заключение по обзору литературы

Множество факторов влияют на появление и распространение антибиотикоустойчивых бактерий:

- селективное давление, возникающее из-за широкого использования в клинической медицинской и ветеринарной практике антибиотиков и пробиотических штаммов микроорганизмов с естественно приобретенной или
- движение генов устойчивости к антибиотикам в биосфере, происходящее в условиях влияния на микрофлору животных ксенобиотиков внешней среды, находящихся в почве и воде, антибиотиков, поступающих в результате ветеринарной помощи, применяемых при различных болезнях.

УПМ могут стать источником эндогенных инфекций в результате активации или проникновения УПМ нормальной микрофлоры соответствующих биотопов полостей животных во внутреннюю среду организма. Особенностью эндогенных оппортунистических инфекций является отсутствие инкубационного периода. Кроме того, развиваются аутоинфекции, относящиеся к эндогенным инфекциям, которые возникают в результате самозаражения при переносе возбудителя (чаще самим больным) из его собственного биотопа в чужой [2, 9].

В проблеме антибиотикорезистентности не последнее место занимают и экономические вопросы, которые в условиях рыночной экономики и ограниченного бюджета во многом определяют возможности применения АМП.

Во многих регионах нашей страны распространённость устойчивости среди обычных патогенных микроорганизмов к готовым и дешёвым противомикробным препаратам настолько высока, что эти препараты считаются теперь имеющими клинически ограниченную эффективность.

В настоящее время среди сельскохозяйственных животных отмечается устойчивая тенденция к смене микробного пейзажа возбудителей гнойно-воспалительных болезней с возрастанием этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов и распространение лекарственной устойчивости этих возбудителей. В современной инфекционной патологии продуктивных животных характерно увеличение удельного веса возбудителей с измененными

свойствами: метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA), метициллинорезистентных *Staphylococcus spp.* (MRSP), например *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, распространение энтеробактерий с β -лактамазами расширенного спектра (БЛРС) (ESBL) у *Enterobacteraceae* [171, 194, 224, 226].

Это связано с тем, что повышается чувствительность и специфичность новых методов в результате внедрения в лабораторную диагностику современных экспресс-методов и разработки тест-систем для диагностики.

Среди тяжелых бактериальных инфекций животных особую опасность и наибольшую актуальность представляют инфекционные маститы, репродуктивные патологии у коров и респираторные симптомокомплексы у телят, ассоциированные с полирезистентными, не культивируемыми и персистентными микроорганизмами.

Роль микроорганизмов в развитии инфекционной патологии животных ассоциируется, в основном, с важными биологическими феноменами: полигостальностью, вирулентностью и антибиотикорезистентностью.

У большинства условно-патогенных микробов в отличие от облигатно-патогенных микроорганизмов отсутствуют активные механизмы для инвазии. Поэтому для развития инфекции необходимы высокая инфицирующая доза патогена и дефицит элиминирующих механизмов иммунной системы.

Повреждение клеток и тканей организма хозяина условно-патогенные микробы вызывают с помощью эндотоксинов и ферментов-токсинов.

Эндотоксин грамотрицательных бактерий является универсальным фактором патогенности условно-патогенных бактерий. Мишенью для него являются поверхности клеток почти всех органов животных, что определяет многогранность и идентичность или близость вызванных ими поражений. Поскольку токсичность данного эндотоксина невелика, то только его высокие концентрации могут вызвать клинически выявляемые поражения, которые образуются при одновременной гибели и лизисе больших количеств бактерий.

Условно-патогенные микробы выделяют большое количество экзо-ферментов (гиалуронидаза, эластаза, коагулаза, фибринолизин, нейраминидаза,

лецитиназа, нуклеазы, дезаминазы, декарбоксилазы и др.), оказывающих деполимеризующее или конформационное действие на молекулы свободные или входящие в состав клеток и волокон. Повреждающее действие микробных экзоферментов обусловлено не только разрушением структур, но и токсическим действием продуктов ферментативного распада (мочевина, сероводород, амины и др.).

Таким образом, условно-патогенные микробы обладает почти тем же набором факторов патогенности, как и облигатно-патогенные. Однако следует иметь в виду, что если у облигатно-патогенных микробов набор факторов патогенности специфичен и универсален для вида микроорганизмов, то у условно-патогенных он вариабелен и мало специфичен.

При диагностике оппортунистических инфекций следует учитывать возраст животных, сроки возникновения заболевания, факторы риска возникновения инфекции и дефекты иммунной системы.

Необходимо использовать комплексный подход к диагностике оппортунистических инфекций, который раскрывает степень активности и форму инфекционного процесса, позволяет идентифицировать возбудителя болезни и особенности иммунного ответа макроорганизма, дает представление о прогнозе развития и исхода болезни.

При выборе методов лабораторной диагностики предпочтение следует отдавать наиболее информативным и доступным: бактериологическим, серологическим и молекулярно-генетическим методам.

Важно учитывать информативность прямых и непрямых методов лабораторной диагностики в зависимости от нозологии и возраста животных.

Разнообразие фенотипических вариантов адапционных стратегий бактерий (L-форм; жизнеспособных, но некультивируемых бактерий; клеток-персистеров) открывает широкие перспективы для разработки новых методов диагностики и схем фармакотерапии с учетом их лекарственной устойчивости.

Устойчивость возбудителей оппортунистических инфекций к антибиотикам связана с неэффективностью антибактериальной терапии

животных, риском неблагоприятного исхода болезни и экономическими затратами, проводимыми в животноводческих хозяйствах.

Для своевременной диагностики, эффективных лечебно-профилактических мероприятий в животноводстве необходимо проводить комплексные лабораторные исследования, которые включают молекулярно-генетические, протеомные и бактериологические методы, что позволяет наиболее достоверно идентифицировать возбудителей и определить их чувствительность к препаратам антибактериального действия, а также осуществлять регулярный серологический и биохимический мониторинг поголовья основного стада для исключения нарушений обмена веществ и развития иммуносупрессии, что может усугубить воспалительный процесс и затруднить лечение животных.

После установления диагноза конкретной оппортунистической инфекции необходимо установить ее форму и степень тяжести, чтобы оценить целесообразность этиотропной терапии. Необходима рациональная фармакотерапия этиотропными, патогенетическими и иммунотропными препаратами, достаточная для прекращения прогрессирования патологического и инфекционного процесса, но не превышающая допустимое количество повторных курсов.

Вышеизложенные факты показывают важность проблемы бактериальных инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами в ветеринарной медицине и микробиологической практике.

Наряду с необходимостью дальнейшего изучения патогенеза бактериальных инфекции, факторов вирулентности УПМ, четко вырисовывается целесообразность разработки и совершенствования лабораторных методов контроля антибиотикочувствительности и механизмов резистентности, а также специфических и антибактериальных средств при лечебно-профилактических мероприятиях.

Анализ литературных данных показывает, что до настоящего времени нет универсальных способов профилактики и лечения животных с бактериальными инфекциями, а существующие АМП требуют дальнейшего изучения и

усовершенствования. В этой связи представляется актуальным разработка и оптимизация методов диагностики, биологических основ получения и практического применения специфических лечебно-профилактических средств при оппортунистических инфекциях, в том числе вакциннопрофилактики и антибиотикотерапии коров и телят.

ГЛАВА 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследования

2.1.1 Материалы исследования

Работа выполнена в период с 2010 года по 2020 год на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Работу проводили в соответствии с тематическим планом-заданием на выполнение научно-исследовательских работ по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за счет средств федерального бюджета по теме: в 2016 году «Разработка методических рекомендаций по профилактике и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц»; в 2017 году «Разработка системы мероприятий по профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота с использованием усовершенствованной вакцины»; в 2020 году «Изучение биологических свойств возбудителей инфекционных болезней животных, выделяемых на территории Российской Федерации, и сравнение их с находящимися в коллекциях возбудителей болезней, в том числе, общих для человека и животных с целью оценки изменчивости их культуральных и морфологических свойств, патогенности, а также изучения их устойчивости к факторам внешней среды и дезинфекционным средствам. Изыскание новых эффективных средств и методов дезинфекции».

Объекты исследования. Объектами бактериологического мониторинга являлись изоляты (n=956), из них грамположительных (n=264) и грамотрицательных (n=490) бактерий, выделенных от крупного рогатого скота и телят с признаками или подозрением на респираторные, урогенитальные и маститные инфекции.

Биологический материал, полученный из разных биотопов крупного рогатого скота, представлял собой секрет слизистых оболочек дыхательных путей

(n=186) и репродуктивных органов (n=726), секрет молочной железы при маститах коров (n=289), абортированные плоды (n=146).

В хозяйствах Северо-Западного региона РФ из 14 хозяйств Волосовского района и одного хозяйства Волховского района Ленинградской области, из 5 хозяйств Псковской области в период с 2012 г. по 2019 г. при исследовании на урогенитальные инфекции исследовано 726 проб влагалищной слизи от абортировавших коров, 289 проб секрета вымени. Для оценки различных методов микробиологической диагностики и выделения атипичных возбудителей, проведено комплексное обследование 128 телят.

По результатам бактериологических исследований получено 956 изолятов, взятых у крупного рогатого скота. Из них у коров при инфекциях репродуктивного тракта идентифицировано - 220, при маститах - 380 положительных результатов, у телят идентифицировано 356 изолятов УПМ.

Грамотрицательные (n=246) и грамположительные (n=51) микроорганизмы с факторами патогенности выделены со слизистых оболочек (ЖКТ и респираторного тракта) телят.

Грамотрицательные (n=172) и грамположительные (n=39) микроорганизмы с факторами патогенности изолированы со слизистых оболочек коров при репродуктивной патологии.

Грамотрицательные (n=72) и грамположительные (n=174) микроорганизмы с факторами патогенности обнаружены в секрете молочных желез у коров при инфекционных маститах.

Экспериментальные исследования для решения поставленных задач были проведены на 3-х видах лабораторных животных. Подопытные и контрольные группы животных формировали по принципу аналогов.

При взятии и подготовке для исследований клинических образцов соблюдали меры, предупреждающие контаминацию патогенами объектов внешней среды, руководствуясь соответствующими правилами и инструкциями.

В течение экспериментов постоянно вели наблюдения за состоянием здоровья животных, выраженностью их аппетита. При помощи общих методов

исследования, а именно осмотра, пальпации, перкуссии, аускультации и термометрии исследовали пульс, состояние слизистых оболочек, лимфатической и пищеварительной систем. Обращали внимание на состояние кожи, полости рта, глотки, пищевода.

Пальпацию применяли с целью определения болезненности, а также изучения физических свойств тканей и органов дыхания, топографических соотношений между ними, количества и качества пульса.

По характеру получаемого звука при перкуссии судили о границах и физических свойствах органов и тканей под перкутируемой поверхностью, определяли увеличение или уменьшение области печеночного притупления, болезненность печени.

При аускультации исследовали звуки, образующиеся в функционирующих органах.

Температуру измеряли в прямой кишке 10 мин. Показатели термометрии позволили следить за ходом болезни и результатами лечения.

При клиническом наблюдении учитывали сроки клинического выздоровления, количество павших, вынужденно убитых и выздоровевших животных.

Эффективность лечения оценивали как разницу между выздоровевшими и павшими/выбракованными животными, выраженную в процентах.

Доклинические испытания лекарственных препаратов проводили согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [155, 156].

В ходе исследования все работы с лабораторными животными выполняли в соответствии с директивой №2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, используемых для научных целей», а также на основании Приказа МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г «О правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» [47, 176].

2.1.2 Методы исследования

2.1.2.1 Бактериологические методы

2.1.2.1.1 Микроскопический метод

Мазки для микроскопии готовили из биоматериала и микробных культур, фиксировали физическим или химическим способом, окрашивали по Граму и по Михину (1% водным раствором метиленовой сини).

2.1.2.1.2 Метод культивирования микроорганизмов

Посевы биологического материала (кровь, плазма, сыворотка крови, мазки со слизистой оболочки носоглотки, влагалища и молоко, пробы паренхиматозных органов проводили на колумбийский агар с кровью барана, МПБ, МПБ 6,5% соли, среду Кода, среду Эндо, 5% кровяной агар, агар Сабуро (ФГУН «ГНЦ ПМБ» г. Оболенск), энтерококкагар, среду Эндо (ЗАО НИЦФ «Научно-Исследовательский Центр Фармакотерапии» г. Санкт-Петербург).

Дифференциально-диагностические среды (ЗАО НИЦФ «Научно-Исследовательский Центр Фармакотерапии»), УРЕАПЛАЗМА-СРЕДА и МИКОПЛАЗМА-СРЕДА (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера г. Санкт-Петербург), среда Фрисс и Хейфлик, ПЖА и фабричная питательная среда, ростовые добавки Himedia применяли для поддержки и культивирования возбудителей кампилобактериоза.

Типирование культур микроорганизмов, изолированных от животных, проводили согласно определителя микробов Берджи на основе изучения их морфологических и культурально-биохимических свойств [133].

2.1.2.1.3 Метод идентификации микроорганизмов с учетом биохимических свойств

Идентификацию микроорганизмов также проводили при помощи тест-систем Api 20E, Api 20 Strep («Bio Merieux», Франция).

Тест-система Api 20E предназначена для биохимической идентификации энтеробактерий в течение 18-24 ч.

Тест-система Api 20 Strep ориентирована для последующей идентификации стрептококков и энтерококков до вида.

Тест-система *Ari Camru* разработана для проведения видовой идентификации бактерий рода *Campylobacter*. Указанная тест-система представляет собой расширенный цветной ряд, состоящий из комплекса биохимических микротестов. Стрип тест-системы состоит из 20 лунок, заполненных дегидрированными субстратами. После внесения в лунки бактериальной суспензии происходит регидратация субстратов.

После заполнения лунок испытуемой культурой стрипы помещали в термостат и инкубировали в микроаэрофильных или аэробных условиях 18-24 ч. В результате накопления метаболических продуктов в процессе инкубации изменяется цвет лунок. Учёт полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения *Ari Web*.

Посевы культивировали в условиях термостата, CO_2 инкубатора и анаэроштата при $t 36 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч.

Определение чувствительности бактериальной культуры к антибактериальным препаратам проводили методом диффузии в агар с применением дисков ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.

В работе использовали 152 изолята УПМ с атипичными биохимическими свойствами, выделенных при культуральном исследовании: родовую и видовую идентификацию проводили методом *MALDI-TOF-MS* анализа на масс-спектрометре *AutoflexIII* (Bruker Daltonics, Германия).

Идентификацию также проводили по биохимическим свойствам с помощью автоматического бактериологического анализатора *VITEK2Compact 30* (BioMerieux, Франция) согласно инструкции производителя.

Параллельно изучали биохимические УПМ при помощи тест-систем *Ari* («Bio Merieux», Франция).

Для последующей идентификации стрептококков и энтерококков до вида применяли две тест-системы: *STREPTOtest 24* («Erba Lachema», Чешская Республика) и *Ari 20 Strep* («BIOMERIEUX», Франция), для идентификации стафилококков *Ari 20 Staph* («BIOMERIEUX», Франция), для идентификации энтеробактерий использовали *Enterotest 24 N*, *Enterorapid 24* («Erba Lachema»,

Чешская Республика), для идентификации грамотрицательных неферментирующих бактерий использовали Nefermtest 24 («Erba Lachema», Чешская Республика).

2.1.2.1.4 Определение гипермукоидного фенотипа у микроорганизмов

Принадлежность культур *Klebsiella pneumoniae* и других микроорганизмов к гипермукоидному фенотипу определяли при постановке string-теста по методике, описанной A.S.Shon (2013) [286]. Культуры культивировали в течение 16-18 ч. на плотных средах. Тест считали положительным, если за бактериологической петлей вертикально тянулся слизистый тяж из культуры длиной 5 мм и более.

2.1.2.1.5 Определение вирулентных свойств культур микроорганизмов для лабораторных животных

Вирулентные свойства выделенных культур определяли постановкой биопробы на белых мышах при введении им подкожно смыва суточной агаровой культуры в дозе 0,2 мл, приготовленной по стандарту мутности (McFarland Standard, «BIOMERIEUX», Франция).

2.1.2.2 Видовая идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF-MS анализа выделенных чистых культур микроорганизмов

Для видовой идентификации выделенных микроорганизмов с атипичными биохимическими свойствами методом MALDI-TOF-MS использовали изолированные колонии, полученные на плотных питательных средах.

Для подтверждения этих результатов осуществленных традиционными культурально-биохимическими методами идентификация была проведена на MALDI-TOF масс спектрометре “Microflex LRF” (Bruker Daltonik, Германия) режиме реального времени при помощи программы Biotyper версии 3.0, согласно инструкции производителя, который позволяет идентифицировать культуру микроорганизма менее чем за 2 мин.

Подготовку материала для идентификации энтеробактерий масс-спектрометрическим анализом осуществляли с помощью экстракции белка, сущность которой заключалась в последовательной обработке микробной взвеси этиловым спиртом, 70% муравьиной кислотой с последующим добавлением

ацетонитрила. По окончании экстракции по 1 мкл супернатанта анализируемых образцов переносили в лунки MSP-чипа. Полученные образцы подсушивали на воздухе, сверху наносили 1 мкл матрицы.

Видоспецифичные белковые образцы, которые получались в процессе анализа, сравнивали с базой данных масс-спектрометра и таким образом, определяли видовую принадлежность исследуемого микроорганизма. Спектры микроорганизмов регистрировали на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-TOF («Bruker Daltonics», Германия) в автоматическом режиме при помощи программы Biotyper версии 3.0.

Расчет коэффициента достоверности (*score*) выполнялся автоматически ссылкой на *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* для каждого результата. Заключение о таксономической принадлежности микроорганизма осуществляли на основании значения индекса совпадения (параметр *score* - *S*). Значение *S* от 1,7 до 1,99 указывает на идентификацию до рода, а $S > 2$ указывает на идентификацию до вида и свидетельствует о точной видовой идентификации. Оценку $< 1,7$ рассматривали как недостоверную идентификацию.

2.1.2.3 Молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики

Выделение нуклеиновых кислот из образцов проводили сорбционным методом с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм Рибо-сорб», «АмплиПрайм Сорб-В», «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии), ДНК-сорбент-ИДС (ООО ИДС) в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР проводили наборами производства ООО ИДС (Россия) для выявления стафилококков «Стаф-ИДС» (*Staphylococcus spp.*), энтеропатогенной кишечной палочки «Коли-ИДС» (*E. coli*), стрептококков «Стреп-ИДС» (*Streptococcus spp.*), условно-патогенных энтеробактерий «Энтеробак-ИДС» (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*).

Для выявления фрагментов генома инфекционных агентов *Campylobacter spp.*, *C. jejuni* использовали наборы реагентов для ПЦР производства «Амплисенс» (Россия).

Этап амплификации ПЦР проводили с применением наборов ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Россия): «МИК-КОМ» для идентификации микоплазм (детекция в агарозном геле), «ХЛА-КОМ» для идентификации хламидий (детекция в агарозном геле).

Процесс амплификации ПЦР с электрофоретической детекцией проводили на приборе «Терцик» производства ООО «ДНК Технология» (Москва). Для проведения электрофоретической детекции применяли камеру для электрофоретических разделений ПЦР-продуктов в агарозном геле.

Одним из видов ПЦР в режиме реального времени «Real-time PCR» является мультиплексная микрочиповая система с иммобилизованными реактивами для молекулярно-генетического анализа с применением микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА» (ГК «Люмэкс», Санкт-Петербург).

На микрочип были внесены пробы ДНК гомологичных и гетерологичных микроорганизмов, дистиллированная деионизированная вода. Пробы ДНК вносили на микрочип используя стандартную методику (1,2 мкл, под герметизирующий слой) по заданной топологии. Контроль температурного режима реакции и детекция накопления флуоресцентного сигнала в ходе реакции ПЦР в реальном времени осуществляли в микрочиповом амплификаторе нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА» (производства ГК «Люмэкс», Санкт-Петербург). Программа термоциклирования была следующей:

1. Удержание — 94° С, 120 с.
2. Циклы амплификации ДНК
 - плавление ДНК — 94° С, 3с.
 - отжиг праймеров и элонгация — 60°С, 20 с., 45 циклов.

Амплификацию в режиме реального времени осуществляли в приборе «Rotor-Gene» (Corbett Research, Австралия), CFX 96 («Bio-Rad», США) , LightCycler 96(Roche).

Результаты ПЦР при электрофоретической детекции продуктов амплификации учитывали с помощью трансиллюминатора ультрафиолетового с фотокамерой (CANON).

Для генотипирования патогенов, на основе известных нуклеотидных последовательностей, доступных через базу данных GenBank, подбирали праймеры и зонды с помощью интернет ресурса «BLAST». Оптимизировали структуру олигонуклеотидов с использованием программ «Primer Premier 5.0», Oligo (www.oligo.net), и Vector NTI (<http://www.invitrogen.com>). Выбор оптимального режима амплификации, исходя из длины амплифицируемого фрагмента, рассчитывали с помощью олигокалькулятора (Oligo Calc:Oligonucleotide Properties Calculator).

Все ампликоны (по 10 мкл) анализировали с помощью электрофореза в 1,5-2,0 % агарозном (горизонтальный) геле с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия с концентрацией 1 мг/мл. В качестве маркера молекулярных масс использовали GeneRuler, фирмы «Thermo Scietic».

Молекулярное клонирование продуктов ПЦР проводили с использованием коммерческого набора InsTAclone PCR cloning kit («Fermentas», Латвия), процедуру осуществляли в соответствии с инструкцией изготовителя.

Секвенирование осуществляли с использованием праймеров представляющих участок гена 16s рРНК для идентификации *Mycoplasma bovis*, которые были синтезированы с использованием амидофосфитного метода на синтезаторе ДНК/РНК ASM-2000 (Biosset, РФ). Нами проведена оценка комплементарности и специфичности выбранных праймеров путем сравнения с базой нуклеотидных последовательностей NCBI с использованием BLAST алгоритма поиска родственных последовательностей. Был проведен ряд экспериментов по определению рабочих концентраций праймеров, обеспечивающих необходимую чувствительность анализа, оптимизированы условия проведения ПЦР. Использован олигокалькулятор (Oligo Calc:Oligonucleotide Properties Calculator), затем данные сравнивали с результатом

подсчетов по формуле: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$, выбирая оптимальный вариант.

ПЦР выполняли в конечном объеме 50 мкл. Реакционная смесь содержала 20 мкл выделенного ДНК, по 10 пмоль каждого праймера, 0,25 мМ каждого нуклеотида, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 1,5 мМ MgCl₂, 1XПЦР-буфера.

Использовали следующие температурные параметры:

95^oС-5 мин - 1цикл. Последующие 35 циклов 95^oС в течение 10 с., 55^oС - 20 с, 72^oС - 10 с., и заключительного удлинения при 72^oС в течение 3 мин.

Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, РФ).

Продукты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 1,8% - ом агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Филогенетический анализ. Для построения филогенетических деревьев применяли - Mega 4. Использовали также данные секвенирования из баз NCBI.

2.1.2.4 Определение и анализ результатов чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Антимикробные препараты были выбраны, исходя из сведений о регистрации и применении в животноводстве, а также с учетом списка ВОЗ критически важных АМП для медицинского применения [235] и МЭБ – для ветеринарии [314].

Ранжирование АМП. Основой для выбора антимикробных препаратов (АМП), подлежащих включению в исследование, являлись данные о природной резистентности отдельных видов микроорганизмов, а также о клинической эффективности АМП [248].

Ранжирование АМП с учетом антибиотиков, имеющих критическое значение в медицине согласно перечню ВОЗ. АМП разделены на несколько групп. В первую группу вошли антибиотики, которые обладают активностью в отношении широкого спектра распространенных чувствительных к ним бактериальных патогенов и с которыми связана минимальная вероятность

формирования резистентности к ним по сравнению с антибиотиками групп наблюдения и выбора [22, 235, 363].

В пределах некоторых групп АМП выделяли подгруппы препаратов, в отношении которых бактерии проявляют полную перекрестную резистентность. В этих случаях оценивали чувствительность к одному АМП данной группы. Такой препарат должен наилучшим образом выявлять механизмы, определяющие устойчивость возбудителя ко всем или большинству представителей этой группы, даже если он не применяется в терапевтических целях в ветеринарной медицине.

Определение чувствительности *in vivo* к другим представителям данной группы не требуется, и более того, в отдельных случаях может привести к получению недостоверных результатов. Это объясняется плохой воспроизводимостью результатов при исследовании некоторых препаратов *in vitro* и невозможностью провести надежную корреляцию между результатами определения чувствительности *in vitro* и клинической эффективности [66].

Выбирать АМП, активные в отношении выделенного этиологически важного микроорганизма-возбудителя. Определение чувствительности к антибиотикам, природно неактивным в отношении данного вида (группы) бактерий, не имеют терапевтического значения. Природная резистентность к АМП является свойством всех или почти всех изолятов бактериального вида. Подробная информация о природной устойчивости доступна в документе «Экспертные правила определения чувствительности к антибиотикам EUCAST» [248].

В связи с отсутствием нормативных документов по определению чувствительности к АМП микроорганизмов, выделенных от животных, бактериологи используют разные методики постановки исследования и критерии оценки результатов.

В зависимости от целей мониторинга (определение активности препаратов для лечения или выявления значимых маркеров резистентности) могут быть выбраны разные препараты и разные критерии чувствительности.

Для эпизоотологического мониторинга определение чувствительности бактерий к АМП проводили диско-диффузионным методом и методом серийных разведений в жидкой среде для определения минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков согласно стандартам ISO 20776-1:2019 [278], клиническим рекомендациям Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) [66], рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST) [9] и Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [232].

Эти клинические рекомендации разработаны с учетом биологической резистентности микроорганизмов, фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств для рациональной фармакотерапии человека в медицине.

Клинические рекомендации EUCAST в ветеринарных лабораториях могут использоваться только для эпизоотологического мониторинга антибиотикорезистентности, выявления механизмов резистентности и выбора маркерных препаратов (предикторов чувствительности), к которым необходимо определять чувствительность микроорганизмов. Результаты определения чувствительности к маркерным препаратам можно экстраполировать на другие антибиотики той же группы или других групп в соответствии с примечаниями в таблицах пограничных значений.

Для рациональной антибиотикотерапии инфицированных животных использовали критерии интерпретации результатов антибиотикочувствительности эпидемиологические точки отсечения (Epidemiological cut-off value, ECOFF): <https://mic.eucast.org/search/> (ECOFF) с учетом биологической резистентности микроорганизмов. На сайте указаны данные по распределению значений МИК и диаметров зон подавления роста.

Идентифицированные культуры тестировали на чувствительность к антимикробным препаратам методом серийных разведений и диско-диффузионным методом. Использовали диски, содержащие антибиотики следующих классов: макролиды – азитромицин, эритромицин; тетрациклины – доксициклин, тетрациклин; пенициллины; аминопенициллин – ампициллин,

карбокспенициллин- тикарциклин; ингибиторзащищенные бета-лактамы – амоксициллин/клавуланат; цефалоспорины II поколения – цефалексин, цефокситин; цефалоспорины III поколения –цефтазидим, цефатаксим, цефтриаксон, IV поколения – цефепим; карбопенымы – меропенем, имипенем, эртапенем; фторхинолоны – цiproфлоксацин; аминогликозиды –стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин; хлорамфеникол.

Учёт резистентности к АМП методом МПК проводили с помощью автоматического анализатора MicroScan WalkAway 40 plus («Siemens», Германия). Использовали планшеты GN3F (с цефокситином, цефподоксимом и тобрамицином для грамотрицательных микроорганизмов), RUNAF (с колистином, цефтазидим\авибактамом и цефтолозаном\тазобактамом для грамотрицательных микроорганизмов), GPALL1F (с левофлоксацином, моксифлоксацином и хлорамфениколом для грамположительных микроорганизмов), RUSTEF (с доксициклином и цеftarолином для стафилококков и энтерококков), NF (для определения чувствительности грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов) Sensititre («Trek Diagnostic Systems», Великобритания).

Также определяли чувствительность к антибиотикам и диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера-Хинтона без дополнительных добавок и с добавлением 5% дефибринированной лошадиной крови и β -НАД для микроорганизмов со сложными питательными потребностями.

Включение клинических образцов в экспериментальную выборку проводили согласно следующим критериям: присутствие в клиническом материале грамотрицательных бактерий в виде монокультуры; фенотипическая устойчивость выделенных бактерий к цефотаксиму, цефепиму и карбапенемам.

Наличие β -лактамаз у выделенных микроорганизмов устанавливали с помощью планшета ESB1F (с ампициллином, цефалоспорины I-III поколений и карбапенемами (имипенем, меропенем) для общей оценки профиля резистентности) Sensititre («Trek Diagnostic Systems», Великобритания).

Согласно рекомендациям CLSI M7 исследование МПК бета-лактамов проводили следующим образом. Готовили гомогенную суспензию плотностью 0.5

единиц Мак-Фарланда из чистой культуры микроорганизма. Переносили 10 μ л полученной суспензии в пробирку с 11 мл бульона Мюллера-Хинтона. Распределяли по 50 мкл суспензии на основе бульона Мюллера-Хинтона в лунки планшета с помощью моноканальной пипетки. Инокулированные планшеты инкубировали в течение 18–20 ч. при температуре 35–37°C. При учёте результатов сравнивали МПК, полученные для цефтазидима, цефотаксима и МПК, полученную для тех же антибиотиков в комбинации с клавулановой кислотой. Разницу МПК в 3 и более последовательных двукратных разведений считали свидетельством продукции изолятом БЛРС.

Выявление фенотипов бактерий, несущих детерминанты резистентности β -лактамазы расширенного спектра (ESBL), проводили методом синергизма двойных дисков с ингибиторами ферментов – клавулановой кислотой.

Класс бета-лактамаз устанавливали методом ПЦР с электрофоретической детекцией и в режиме реального времени с коммерческими тест-системами на выявление генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных (типы OXA-48 и OXA-162) и класса металло- β -лактамаз групп VIM, IMP, NDM методом ПЦР. В ходе работы использовали наборы реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора); детекцию наиболее распространенных генов β -лактамаз *bla*TEM и *bla*CTX-M проводили у изолятов с продукцией БЛРС.

Интерпретация результатов и выборочное репортирование. Интерпретация результатов оценки резистентности заключается в прогнозировании результата antimicrobial терапии на основе данных исследования возбудителя инфекционной болезни *in vitro*.

Выборочное репортирование АМП, осуществляли, анализируя антибиотикограммы, с учетом результатов чувствительности антибиотиков, имеющих критическое значение в медицине согласно перечню АМП ВОЗ, имеющих критическое значение в медицине [7].

Использование АМП из групп высокоприоритетных препаратов и резерва может быть разрешено, если недоступны никакие другие препараты из более

низкой категории/класса для лечения инфицированных животных или для предотвращения распространения клинически диагностированной болезни в группах животных.

Изоляты микроорганизмов подразделяли на чувствительные, промежуточной чувствительности и резистентные в соответствии с зоной подавления роста вокруг диска с антимикробным препаратом согласно нормативным документам EUCAST, ECOFF, CLSI [59, 232, 234, 245].

Интерпретацию полученных зон задержки роста бактерий и минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков проводили в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) и Clinical and Laboratory Standards Institute (CLI) каждого вида бактерий. Выбор интерпретационных критериев зависел от целей: выявление эффективности АМП для лечения животных, оценка распространенности биологической резистентности [59, 232, 234, 245].

Для выявления эффективности АМП для лечения животных использовали ECOFF (эпидемиологические точки отсечения) с учетом биологической активности микроорганизмов, или согласно стандартам Института клинических и лабораторных стандартов CLSI Vet01, Vet08.

Для тестирования антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных от животных, Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) разработаны рекомендации VET01S, которые представлены в свободном доступе по ссылке: <http://clsivet.org/Login.aspx>

В таблицах VET01S предложены препараты выбора с учётом фармакокинетики и фармакодинамики для разных видов животных: собак, кошек, лошадей, крупного рогатого скота, свиней и домашней птицы. Однако предложенные препараты не всегда совпадают с перечнем антибиотиков, рекомендованным для ветеринарного применения в Российской Федерации (в целях реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации).

Биологические критерии оценки чувствительности – анализ значений МПК антибиотика в популяции микроорганизмов «дикого типа» или обладающих факторами устойчивости.

Клинические критерии оценки чувствительности – оценка клинической эффективности АМП при определенном уровне резистентности возбудителя по данным клинических исследований.

Все микроорганизмы, в зависимости от полученных результатов, были разделены на три группы – чувствительные (S), резистентные (R) и промежуточной устойчивости (I), а в настоящее время согласно рекомендациям EUCAST с 2020 г. чувствительны к АМП при увеличенной экспозиции. Резистентные изоляты разделяли на следующие группы: устойчивые к одной и двум группам АМП, полирезистентные – устойчивые к трем и более группам АМП, и входящие в эту группу экстремально резистентные штаммы – чувствительные к одной или двум группам АМП.

2.1.2.5 Фармако-токсикологические свойства антимикробного препарата Азициклина

2.1.2.5.1 Изучение антимикробной активности препарата Азициклина

Для изучения антимикробной активности выбран новый антибактериальный препарат Азициклин, который включает в себя доксициклин, азитромицин и эмиданол. В исследованиях использовали опытный образец препарата Азициклин, предоставленный фирмы ООО НВЦ «Агроветзащита», Россия.

Антибактериальное действие препарата Азициклина определяли методом серийных разведений.

Целью работы являлось определение чувствительности микроорганизмов к комбинированному антимикробному препарату Азициклину с установлением его минимальной ингибирующей концентрации.

В качестве тестируемых микроорганизмов нами были взяты изоляты: *K.pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolytica*, выделенные из секрета молочных желез коров, больных маститом и изоляты *E.coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, изолированные из респираторного тракта телят,

больных бронхитами и бронхопневмониями. Изоляты обладали множественной устойчивостью к АМП, а некоторые - мукоидным и гипермукоидным фенотипом. Из микроорганизмов готовили взвесь в физиологическом растворе, содержащую 10^9 КОЕ/мл. В качестве контроля использовали взвесь тех же микроорганизмов с физиологическим раствором.

2.1.2.5.2 Определение острой и субхронической токсичности

Азициклина

Для проведения эксперимента по изучению острой токсичности препарата Азициклина использовали белых крыс, белых мышей опытных и контрольных групп (ГОСТ 12.1.007-76).

Каждая опытная группа мышей состояла из 10 животных. Азициклин вводили белым мышам в нативном виде без разведения однократно с помощью желудочного зонда в дозах 10000; 20000 и 30000 мг/кг массы животного.

Для эксперимента были отобраны белые крысы женского и мужского пола поровну. В опыте принимали участие здоровые животные, предварительно прошедшие двухнедельный карантин, в рационе для грызунов использовали неограниченное потребление воды. Животным подопытным группам, разделенным по 6 голов в каждой, вводили в желудок препарат в виде суспензии в следующих дозах 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 г/кг.

Животные контрольной группы находились в аналогичных условиях, получали дистиллированную воду для инъекций в тех же объемах. За животными вели наблюдение в течение 14 суток после введения препарата.

При изучении субхронической токсичности животным вводили препарат Азициклин в дозах: 1/10; 1/20 и 1/50 от LD_{50} (450, 225 и 90 мг/кг) в течение 21 сут. Группы формировали по 10 животных в каждой. Животные контрольной группы находились в аналогичных условиях, но получали дистиллированную воду.

Проводили гематологические исследования, определяли уровень гемоглобина, содержание эритроцитов, лейкоцитов и определяли лейкограмму.

Для оценки функционального состояния печени проводили исследование общего белка сыворотки крови, определяли уровень активности аспарат- и аланинаминотрансфераз, определяли уровень билирубина. Исследование уровня мочевины в сыворотке крови служило критерием функционального состояния почек.

2.1.2.5.3 Определение раздражающего и аллергического действия препарата Азициклина

Методом кожной и конъюнктивной проб изучали раздражающее и аллергическое действие препарата Азициклина на кроликах породы «Белый великан» [183].

В ходе экспериментального исследования проводили тестирование препарата Азициклина в разных концентрациях, нанося его на выстриженные участки боковой поверхности кожи кроликов 5 раз в неделю на протяжении 14 сут, используя ежедневную экспозицию - 4 ч, после чего препарат смывали водой. Реакцию кожи оценивали по шкале Суворова [16, 17, 183].

В другой серии эксперимента при отрицательном результате проводили повторное тестирование, опыт продолжили и увеличив число аппликаций до 20 на протяжении 20 сут.

Изучение раздражающего действия на слизистую оболочку глаз проводили с помощью «конъюнктивного теста» на тех же 10 кроликах. Животным в конъюнктивный мешок правого глаза закапывали по 1 капле препарата. Другой глаз был контрольным, в него закапывали стерильный изотонический раствор хлорида натрия. Наблюдение за животными вели в течение 7 сут. Оценку реакции учитывали по шкале: 4- гнойный офтальмит; 3 - сильное покраснение конъюнктивы и всей склеры; 2 - покраснение конъюнктивы и частично склеры; 1 - легкое покраснение конъюнктивы; 0 – видимая реакция отсутствует [183].

В ходе экспериментального исследования ежедневно учитывали клиническое состояние животных (осмотр, пальпация, аускультация, термометрия, перкуссия).

2.1.2.5.4 Исследование терапевтической эффективности препарата Азициклина при лечении телят с болезнями органов дыхания

Болезни органов дыхания телят диагностировали с учетом эпизоотической обстановки в хозяйстве, данных общего клинического (осмотр, пальпация, перкуссия, аускультация и термометрия) и бактериологического исследований. Материалом для бактериологических исследований служили истечения слизитые из носовых ходов телят больных острой и хронической бронхопневмонией.

Выбор препарата Азициклина основывался на результатах антибиотикограмм грамотрицательных и грамположительных микробов, оценки резистентности изолятов к АМП из более низкой категории, согласно перечня ВОЗ, учета результатов обнаружения в клинических образцах микоплазм и уреоплазм. Была установлена ориентировочная терапевтическая доза в экспериментальных исследованиях по фармакокинетике препарата, проведенной компанией ООО «НВЦ Агроветзащита».

На основании данных по распространению бактериальных инфекций, ассоциированных с атипичными возбудителями *U. diversum* и *M. bovis* среди молодняка крупного рогатого скота, а так же анализа механизмов патогенеза микоплазм и их чувствительности к противомикробным препаратам, была установлена целесообразность применения комплексного препарата Азициклина для антибактериальной терапии телят. Это обусловлено его низкой токсичностью и пролонгированным бактериостатическим эффектом. Иммуномодулирующий эффект Азициклина весьма востребован, особенно у новорожденных телят, когда иммунная система является несформированной, и иммунная защита организма осуществляется только за счёт колостральных (молозивных) иммуноглобулинов.

Лечебная эффективность препарата Азициклина при хронической бронхопневмонии и серозно – катаральной пневмонии. Опыт проводили на больных телятах с респираторными патологиями. Терапевтическую эффективность препарата при хронической бронхопневмонии и серозно – катаральной пневмонии. Азициклин вводили в дозе 0,25 г на 10 кг массы тела

один раз в день с интервалом 24 ч. пятикратно, предварительно перед его применением готовили водный раствор препарата 1 г Азициклина на 2 мл воды.

Изучение терапевтической эффективности при остром бронхите телят.

В эксперименте в хозяйствах Псковской области использовали телят черно-белой породы весом 55-100 кг с клиническими признаками бронхита (кашель, истечения из носовой полости, сухие хрипы в бронхах, учащенное дыхание и незначительное повышение температуры). Были сформированы группы животных: подопытная и контрольная группы по 10 телят в каждой.

Телята контрольной группы: клинически здоровые телята и телята, которых лечили по схеме, применяемой в хозяйстве. В течение 3 дн подкожно вводили 0,5%-й раствор препарата Энроксил в дозе 0,5 мл на 10 кг массы тела теленка; внутримышечно 2,5%-го раствор тетрациклин из расчета 0,5 г на 10 кг массы телят.

Телятам подопытной группы вводили антибиотик Азициклин индивидуально 0,25 г на 10 кг массы тела один раз в день, предварительно перед применением готовили водный раствор препарата в пропорции 1г Азициклина на 2 мл воды. Полученную эмульсию растворяли в воде и вводили перорально из шприца по беззубому краю на корень языка телят трехкратно.

За животными вели клиническое наблюдение. Учитывали общее состояние, падеж, прирост массы тела, наличие аппетита, ежедневно проводили термометрию, осмотр видимых слизистых оболочек, измерение пульса и частоту дыхательных движений, а также пальпацию, перкуссию и аускультацию области легких и трахеи.

Об эффективности разработанных способов лечения и профилактики судили по количеству заболевших и павших животных, продолжительности течения и наличию рецидивов болезни, по показателям иммунобиологического статуса опытной и контрольной групп телят.

Определение биохимических показателей крови проводили на анализаторе Biosystems A-15 (Испания), Clima MC -15, IDEXX VetTest. Основные показатели

периферической крови, их динамику уровня проводили общепринятыми методами в гематологии и на анализаторе MICROS60.

2.1.2.6 Статистический анализ

Статистическую обработку данных, полученных в ходе всех экспериментов, проводили методом вариационной статистики с помощью сравнения средних по двустороннему t- критерию Стьюдента в модификации Типпета [121].

При статистическом анализе результатов вычисляли уровень статистической значимости (p), который принимался равным 0,05 уровню значимости, при этом значения могли ранжироваться по 3 уровням достигнутых статистически значимых различий: $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$. Также высчитывали коэффициент вариации, который представляет собой отношение среднеквадратического отклонения к среднему арифметическому [35].

Статистический анализ выполняли также с использованием пакетов Statistica, Биостатистика и с помощью программы Microsoft Excel.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данном разделе изложены результаты собственных исследований, которые опубликованы в научных трудах, но дополнены новыми сведениями [20, 61, 85, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 115, 116, 117, 138, 139, 140, 141, 163, 166, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 302, 303, 358].

Индикация и идентификация микроорганизмов имеет важное значение, так как разные виды микроорганизмов имеют неодинаковые факторы патогенности, оказывают различное воздействие на организм животных, способны покидать природные биотопы и обладают многообразными иммуногенными свойствами, а так же имеют разную резистентность к лечебно-профилактическим препаратам. В связи с этим мы установили видовой состав возбудителей, и их механизмы антибиотикорезистентности в хозяйствах Северо-Западного региона РФ, а затем на основании полученных данных предложили научно-обоснованные рекомендации по профилактике и лечению крупного рогатого скота с бактериальными болезнями, ассоциированными полирезистентными возбудителями.

2.2.1 Результаты выявления и идентификации бактериологическим методом условно-патогенных микроорганизмов с атипичными свойствами, изолированных от крупного рогатого скота

Наиболее широко распространенными в качестве индикаторных микроорганизмов для лабораторного контроля за развитием резистентности к АМП в молочном животноводстве являются: *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Выявлены микроорганизмы с высоким уровнем невосприимчивости ко многим группам антибиотиков, например, так называемые «проблемные» индикаторные бактерии [90].

На их фоне широкое распространение приобретает новый эмерджентный микроорганизм *Stenotrophomonas maltophilia*, характеризующийся природной резистентностью ко многим антимикробным препаратам, успешно адаптировавшийся в окружающей среде, который представлен Всемирной

организацией здравоохранения (ВОЗ) одним из ведущих возбудителей оппортунистических инфекций.

Особенностью бактериологического метода является получение чистых культур микроорганизмов и изучение их фенотипических свойств .

Бактериологические исследования, проводимые при болезнях, вызванных микроорганизмами, включают: выделение возбудителя инфекционного процесса из исследуемого материала от животных, определение его этиологической значимости в развитии инфекционного процесса и способности формировать биопленку; определение спектра чувствительности выделенного микроорганизма (биопленки при ее формировании) к клинически важным антибиотикам и механизмов резистентности; разработка рациональной антимикробной терапии на основе результатов лабораторного анализа.

Выделенные за изучаемый период бактерии идентифицировали до вида по совокупности типичных биохимических реакций. Наблюдалось как сходство, так и различие в наборах химических субстратов, которые входят в коммерческие тест-системы и рекомендованы Определителем бактерий Берджи, 1997 (ОББ). Все изоляты идентифицировали по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам. Для некоторых видов изолятов были выявлены нетипичные и переменные культурально-биохимические свойства [133].

Для некоторых видов изолятов были выявлены нетипичные биологические свойства (гипермукоидный фенотип, β -лактамазы) как стратегия формирования антибиотикорезистентности в микробной популяции.

2.2.1.1 Фенотипическая характеристика выделенных грамположительных микроорганизмов

Изучены изоляты стафилококков различных видов: *S. aureus* и коагулазоотрицательные стафилококки *CoNS*: Видовой состав *CoNS* представлен 6 видами (*S. hemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. sciuri*), в том числе встречались *CoNS* с мукоидным фенотипом (М-колонии) (рис. 2.2.1.1.1).



Рисунок 2.2.1.1.1 - Рост *S. aureus*, коагулазо-отрицательных (CoNS) микроорганизмов на МПА, и *S. haemolyticus*, с мукоидным фенотипом (*M-колонии*)

Для изолятов *S. aureus* и *S. hemolyticus* были определены тесты, совпадающие с ОББ, а также выявлены нетипичные культурально-биохимические признаки.

На плотных питательных средах *S. aureus* чаще образовывали круглые колонии с ровным краем и гладкой поверхностью (S-формы). Встречали колонии с неровным краем и шероховатой поверхностью (R-форма) (рис. 2.2.1.1.2).



S- форма колоний

R-форма колоний

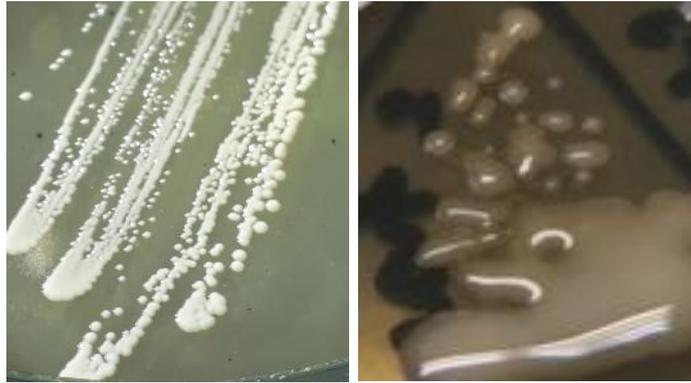
Рисунок 2.2.1.1.2 - Культуральные свойства *S. aureus*

Выделяли атипичные формы *Staphylococcus aureus* – small colony variants (SCV), в виде очень маленьких (менее 5 мм), непигментированных колоний. Изоляты часто демонстрировали слабо выраженную коагулазную активность, а так же ряд характеристик, не свойственных метаболическим нормальным клеткам: отсутствие лецитиназной, фосфатазной и гемолитической активности.

По нашим исследованиям SCV и R – формы колоний способны к реверсии. Следует обратить внимание на способность к реверсии при пассажах на 5% кровяном агаре. Через 2-3 пассажа на чашках вырастают ревертанты, что позволяет отнести выросшую субпопуляцию к стафилококкам.

На плотных питательных средах *S.haemolyticus* чаще образовывали круглые колонии с ровным краем и гладкой поверхностью (S-формы).

Мукоидные (напоминали капельку воды) характерны для вирулентных микроорганизмов, имеющих капсулу (M-форма) (рис. 2.2.1.1.3).



S - форма колоний

M- форма колоний

Рисунок 2.2.1.1.3 - Культуральные свойства *S.haemolyticus*

Учитывая, что в клинической ветеринарной практике наибольшую значимость имеют *S. agalactiae* и *S.disagalactiae*, для определения достоверности их идентификации параллельно проводили САМР-тест на скрытую гемолитическую активность (рис. 2.2.1.1.4).

Сущность САМР-теста заключается в том, что стрептококки группы В продуцируют белковоподобную внеклеточную субстанцию (САМР-фактор), которая способна синергично взаимодействовать с бета-токсином, продуцируемым некоторыми штаммами *S. aureus*. Если произвести посев микробов на кровяной агар перпендикулярно друг другу, чтобы они не соприкасались, то в точке их предполагаемого соединения образуется клиновидная зона нарастающего гемолиза эритроцитов.

Таблица 2.2.1.1.1 - Биохимическая идентификация *S.aureus*

Активные компоненты	Реакции/ферменты	Результат					
		ТР		ВР		АР	
		Р	%	Р	%	%	Р
D-глюкоза	Подкисление (D-глюкоза)	-	100,0				
D-фруктоза	Подкисление (D-фруктоза)	-	97,0	+	3,0		
D-манноза	Подкисление (D-манноза)	-	100,0				
D-мальтоза	Подкисление (D-мальтоза)	+	100,0				
D-лактоза	Подкисление (D-лактоза)	+	69,0	-	31,0		
D-трегалоза	Подкисление (D-трегалоза)	+	94,0	-	6,0		
D-маннит	Подкисление (D-маннит)	+	100,0				
Салицин	Подкисление салицина	-	100,0				
Ксилит	Подкисление ксилита	-	100,0				
Нитрат калия	Восстановление нитратов до нитритов	+	88,0			2,0	-
β-нафтилфосфат	Щелочная фосфатаза	+	97,0			3,0	-
D-раффиноза	Подкисление (D-раффиноза)	-	100,0				
D-ксилоза	Подкисление	-	100,0				
D-сахароза	Подкисление (D-сахароза)	+	100,0				
Метил-α-D-глюкопиранозид	Подкисление (Метил-α-D-глюкопиранозид)	+	100,0				
N-ацетил-D-глюкозамин	Подкисление (N-ацетилглюкозамин)	+	75,0	25,0	-		
L-аргинин	Аргининдигидролаза	+	55,0	44,0	-		
Мочевина	Уреаза	-	65,0			35,0	+
Тест							
Рост при 6,5% NaCl		+	100,0				
Устойчивость к бацитрацину		+	100,0				
Устойчивость к оптохину		+	100,0				

Примечание : «+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция, ТР – типичные реакции, ВР- вариабельные реакции, АР- атипичные реакции, Р- тип реакции, %- доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 2.2.1.1.2- Биохимическая идентификация *S.haemolyticus*

Активные компоненты	Реакции/ферменты	Результат					
		ТР		ВР		АР	
		Р	%	Р	%	%	Р
D-глюкоза	Подкисление (D-глюкоза)	-	100,0				
D-фруктоза	Подкисление (D-фруктоза)	-	96,0	+	4,0		
D-манноза	Подкисление (D-манноза)	-	100,0				
D-мальтоза	Подкисление (D-мальтоза)	+	100,0				
D-лактоза	Подкисление (D-лактоза)	+	100,0				
D-трегалоза	Подкисление (D-трегалоза)	+	82,0			18,0	-
D-маннит	Подкисление (D-маннит)	-	74,0	+	26,0		
Салицин	Подкисление салицина	-	100,0				
Ксилит	Подкисление (ксилит)	-	100,0				
Нитрат калия	Восстановление нитратов до нитритов	+	88,0			2,0	-
β-нафтилфосфат	Щелочная фосфатаза	-	100,0				
D-раффиноза	Подкисление (D-раффиноза)	-	100,0				
D-ксилоза	Подкисление	-	100,0				
D-сахароза	Подкисление (D-сахароза)	+	100,0				
Метил-α-D-глюкопиранозид	Подкисление (Метил-α-D-глюкопиранозид)	-	100,0				
N-ацетил-D-глюкозамин	Подкисление (N-ацетилглюкозамин)	+	70,6			29,4	-
L-аргинин	Аргининдигидролаза	+	100,0				
Мочевина	Уреаза	-	96,0			4,0	+
Тест							
Рост при 6,5% NaCl		+	92,0			8,0	-
Устойчивость к бацитрацину		+	86,0			14,	-
Устойчивость к оптохину		+	96,0			4,0	-

Примечание : «+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция, ТР – типичные реакции, ВР- вариабельные реакции, АР- атипичные реакции, Р- тип реакции, %-доля изолятов, проявляющих реакцию.

Для выделенных культур были характерны отрицательные и положительные результаты по САМР-тест (табл. 2.2.1.1.3).

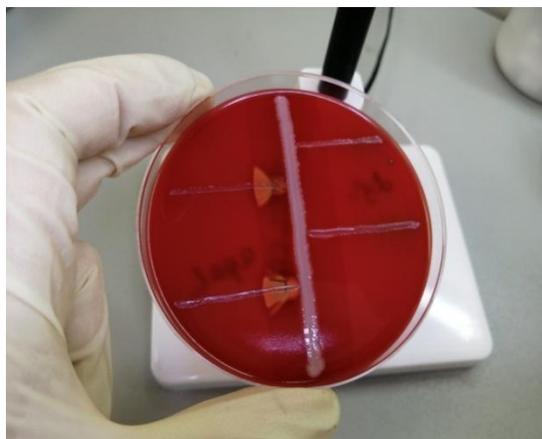


Рисунок 2.2.1.1.4 - САМР-тест на скрытую гемолитическую активность *S.agalactiae* и *S.disagalactiae*

Таблица 2.2.1.1.3 - Результаты САМР-теста стрептококков и их чувствительность к АМП (бацитрацину, оптохину)

Серогруппа стрептококков по Lancefield	Виды	Бацитрацин	Оптохин	САМР-тест
Группа А	<i>S. pyogenes</i>	-	-	-
Группа В	<i>S.agalactiae</i>	+	+	+
Группа С	<i>S.disagalactiae</i>	+	-	-

При идентификации стрептококков возникли трудности в связи с изоляцией культур, отклоняющихся по биохимическим свойствам от типичных (табл. 2.2.1.1.4).

Для выделенных культур стрептококков *S.disagalactiae* были характерны следующие редуцирующие свойства (редукция метиленового молока «-»), гемолитические свойства (тип гемолиза альфа), сахаролитические свойства (лактоза «+» ; манит «-» ; сахароза «-»; сорбит «-»; раффиноза «-»; салицин «-»), чувствительность к АМП (рост на среде с оптохином «+», рост на среде с бацитрацином «-»), окислительно-восстановительные (каталаза «-»).

При тестировании в микробиологическом анализаторе «VITEC COMPACT

2» они были отнесены к виду *S.agalactiae*.

Таблица 2.2.1.1.4 - Некоторые диагностически важные биохимические свойства наиболее часто встречающихся стрептококков

Серогруппа стрептококков по	Виды	Редукция метилового	Устойчивость к нагреванию при 56 ⁰ c	рост в МПБ с 6,5% NaCl	Ферментация сахаров								
					сахароза	лактоза	маннит	сорбит	салицин	треголоза	инулин	эскулин	раффаноза
Группа А	<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Группа В	<i>S.agalactiae</i>	-	-	-	+	+ /-	-	-	+	+	-	-	-
Группа С	<i>S.disagalactiae</i>	+	-	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-
Группа С	<i>S. equi subsp. zooepidermicus</i>	-	-	-	+/-	+	-	+	+	-	-	+/-	+/-
Группа D	<i>Enterococcus spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Идентификация исследуемых микроорганизмов протеометрическим методом в системе MALDI TOF позволила устранить имеющиеся противоречия в диагностике и окончательная диагностика определила вид *S.disagalactiae*.

Изучение биохимического профиля изолятов необходимо не только для идентификации, но и для оценки неоднородности видовых популяций возбудителей. Анализ биохимических характеристик каждого изолята отдельно включал не более 5% (2 или 3) нехарактерных тестов, что косвенно отражает степень неоднородности популяции бактерий.

2.2.1.2 Фенотипическая характеристика выделенных грамотрицательных микроорганизмов

Были идентифицированы полирезистентные *Klebsiella pneumoniae* (n=139), *Escherichia coli* (n=179), *Pseudomonas aeruginosa* (n=64) и *Stenotrophomonas maltophilia* (n=5). Для каждого вида изолята определены тесты, совпадающие с ОББ, а также выявлены атипичные биохимические признаки.

Видовая принадлежность изолятов *Pseudomonas aeruginosa* определена без использования дополнительных субстратов (рис. 2.2.1.2.1 , табл. 2.2.1.2.1).

На плотных средах микроорганизмы *Pseudomonas aeruginosa* образовывали плоские, мелкие и средние, сливающиеся между собой колонии с неровными краями, растущие в агар. Поверхность колоний серая, с ярким серебристым блеском.



А



Б

Рисунок 2.2.1.2.1 - Микроорганизмы *Pseudomonas aeruginosa*, обладающие пигментом пиоцианин на мясо-пептонном агаре (А) и тест с хлороформом (Б)

На среде Эндо колонии неправильной формы, средней величины, лактозоотрицательные.

Выделяли атипичные формы *Pseudomonas aeruginosa* – фенотип мелких колоний (SCV), отмечали отсутствие специфического запаха и пигмента, которого трудно идентифицировать.

На жидких средах при росте *Pseudomonas aeruginosa* отмечали помутнение, хлопьевидный осадок, нежную белая плёнку на поверхности и пристеночное кольцо. Присутствовал характерный запах «земляничного мыла». Водорастворимый пигмент образовывался на жидких, на плотных средах на 1-е, 2-е, 3- или - 4-е сут. культивирования. Учет цветной реакции с хлороформом необходимо проводить, учитывая время продуцирования пигмента.

Отмечали гемолитические свойства у *Pseudomonas aeruginosa* (бета тип гемолиза).

Полученные результаты, за исключением утилизации маннита, полностью соответствовали тестам, установленным в определителе ОББ.



Рисунок 2.2.1.2.2 -Культуральные свойства *Pseudomonas aeruginosa*

Изоляты *K.pneumoniae* были идентифицированы дополнительными тестами и характеризовались неоднородным биохимическим профилем. Клебсиеллы вида *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* представляли собой мелкие, неподвижные, грамотрицательные палочки, обладали хорошо заметной при микроскопии капсулой. При росте на ГРМ-бульоне они вызывали равномерное помутнение, тонкую слизистую плёнку на поверхности. После посева на агаризованную среду визуально рост колоний можно было наблюдать уже через 2-3 ч. На МПА через 18-24 ч вырастали серо-белые, сливающиеся слизистые колонии.

На среде Эндо изучаемые культуры *K.pneumoniae* образовывали очень крупные колонии, лактозовариабельные, пышные, приподнимающиеся над поверхностью среды.

Культуры продолжали активно расти при температуре 20-23 °С, через 48 ч. слой слизи становился настолько мощным, что часть колоний отрывалась от поверхности среды и образовывала сгустки на крышке в перевёрнутой чашке Петри. Через 2 дня после посева слизистая субстанция колоний уплотнялась в виде клейкой массы, образуя матрикс, защищающий их от внешних воздействий (рис. 2.2.1.2.3).



Рисунок 2.2.1.2.3 - *Klebsiella pneumoniae*, обладающая гипермукоидным фенотипом, образующая слизистые тяжи

В ходе исследований гипермукоидный фенотип *K. pneumoniae* выявлен у 20 изолятов с положительным результатом *string*-теста. После прикосновения бактериологической петлёй образуются слизистые тяжи длиной 10 см и более.

На кровяном агаре исследуемые культуры давали средние и крупные серые слизистые колонии, среда в чашке становилась тёмно-коричневой, непосредственно вокруг колоний появлялась узкая (1-2 мм) зона β-гемолиза.

При исследовании биохимических свойств выделенных культур *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* определили, что они не выделяют индол и сероводород, замедленно растут на цитратной среде Симмонса, не обладают фенилаланиндезаминазой, дают отрицательную реакцию с метиловым красным и

положительную (или сомнительную) реакцию Фогеса-Проскауэра (таблица 2.2.1.2.2).

Выделены гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*) и классические *Klebsiella pneumoniae* (*cKP classical K. pneumoniae*). При этом оба варианта показывали нетипичный результат дифференцирующего теста на уреазу, замедленно расщепляли уреазу и лизиндекарбоксилазу (-). Культуры гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*) замедленно расщепляли лактозу (рис. 2.2.1.2.4).

При этом наибольшую опасность представляют случаи болезней, вызванны *hv-KP*, обладающими еще и резистентностью к широкому спектру антибиотиков.

Культуры *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, выделенные из секрета молочной железы при мастите, были вирулентны для белых мышей и вызывали их гибель: классические *Klebsiella pneumoniae* (*cKP classical K. pneumoniae*) в течение 4-6 дн., а гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*) в течение 1-2 дн.



Рисунок 2.2.1.2.4 - Классические *Klebsiella pneumoniae* (*cKP classical K. pneumoniae*) и гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*)

Результаты идентификации *Escherichia coli* показали наибольшие отклонения от типичных результатов для двух ферментов. Количество изолятов на уреазу в 2,3 раза чаще регистрировались, как положительная реакция, а на лизиндекарбоксилазу в 2,5 раза чаще как отрицательная реакция по сравнению с данными ОББ (табл. 2.2.1.2.3).

Таблица 2.2.1.2.1 - Биохимическая идентификация *P. aeruginosa*.

Активные компоненты	Реакции/ ферменты	ТР		ВР		АР	
		Р	%	Р	%	Р	%
2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид	β-галактозидаза (орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид)	+	97,0	-	3,0	-	-
L-аргинин	Аргининдегидролаза	+	95,0	-	-	-	2,0
L-лизин	Лизиндекарбоксилаза	-	100,0	-	-	-	-
L-орнитин	Орнитиндекарбоксилаза	-	100,0	-	-	-	-
Цитрат тринатрия	Расщепление цитрата натрия	+	100,0	-	-	-	-
Тиосульфат натрия	Образование H ₂ S	-	100,0	-	-	-	-
Мочевина	Уреаза	-	77,0	-	-	+	23,0
L-триптофан	Образование индола	+	100,0	-	-	-	-
Пируват натрия	Образование ацетона (реакция Фогеса-Проскауэра)	-	100,0	-	-	-	-
Желатин (бычьего происхождения)	Желатиназа	-	77,0	-	-	+	23,0
D-глюкоза	Ферментация/окисление (глюкоза) (4)	+	100,0	-	-	-	-
D-маннит	Ферментация/окисление (маннит) (4)	+	100,0	-	-	-	-
Инозитол	Ферментация/окисление (инозитол) (4)	-	100,0	-	-	-	-
D-сорбит	Ферментация/окисление (сорбит) (4)	+	100,0	-	-	-	-
L-рамноза	Ферментация/окисление (рамноза) (4)	+	100,0	-	-	-	-
D-сахароза	Ферментация/окисление	+	71,0	-	29,0	-	-
D-мелибиоза	Ферментация/окисление (мелибиоза) (4)	+	100,0	-	-	-	-
Амигдалин	Ферментация/окисление (амигдалин) (4)	+	100,0	-	-	-	-
L-арабиноза	Ферментация/окисление (арабиноза) (4)	+	100,0	-	-	-	-

Примечание : «+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция, ТР – типичные реакции, ВР- вариабельные реакции, АР- атипичные реакции, Р- тип реакции, %- доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 2.2.1.2.2- Биохимические свойства *Klebsiella pneumoniae*

Активные компоненты	Реакции/ ферменты	ТР		ВР		АР	
		Р	%	Р	%	Р	%
2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид	β-галактозидаза (орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид)	+	100,0	-	-	-	-
L-аргинин	Аргининдегидролаза	-	95,0	+	5,0	-	-
L-лизин	Лизиндекарбоксилаза	+	98,0	-	-	-	2,0
L-орнитин	Орнитиндекарбоксилаза	-	87,0	-	-	+	3,0
Цитрат тринатрия	Расщепление цитрата натрия	+	100,0	-	-	-	-
Тиосульфат натрия	Образование H ₂ S	-	100,0	-	-	-	-
Мочевина	Уреаза	+	57,0	-	-	-	43,0
L-триптофан	Образование индола	-	100,0	-	-	-	-
Пируват натрия	Образование ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра)	-	100,0	-	-	-	-
Желатин (бычьего происхождения)	Желатиназа	-	77,0	-	-	+	23,0
D-глюкоза	Ферментация/окисление (глюкоза) (4)	+	100,0	-	-	-	-
D-маннит	Ферментация/окисление (маннит) (4)	+	100,0	-	-	-	-
Инозитол	Ферментация/окисление (инозитола) (4)	-	100,0	-	-	-	-
D-сорбит	Ферментация/окисление (сорбит) (4)	+	100,0	-	-	-	-
L-рамноза	Ферментация/окисление (рамноза) (4)	+	100,0	-	-	-	-
D-сахароза	Ферментация/окисление	+	100,0	-	-	-	-
D-мелибиоза	Ферментация/окисление (мелибиоза) (4)	+	100,0	-	-	-	-
Амигдалин	Ферментация/окисление (амигдалин) (4)	+	100,0	-	-	-	-
L-арабиноза	Ферментация/окисление (арабиноза) (4)	+	100,0	-	-	-	-
Устойчивость к АБП группы цефалоспоринов	Бета-лактамазы	-	93,0	-	-	+	7,0

Примечание : «+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция, ТР – типичные реакции, ВР- вариабельные реакции, АР- атипичные реакции, Р- тип реакции, %- доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 2.2.1.2.3 - Биохимические свойства *Escherichia coli*

Активные компоненты	Реакции/ ферменты	ТР		ВР		АР	
		Р	%	Р	%	Р	%
2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид	β-галактозидаза (орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид)	+	98,0	-	2,0	-	-
L-аргинин	Аргининдегидролаза	+	95,0	-	5,0	-	-
L-лизин	Лизиндекарбоксилаза	+	74,0	-	-	-	26,0
L-орнитин	Орнитиндекарбоксилаза	+	88,0	-	12,0	-	-
Цитрат тринатрия	Расщепление цитрата натрия	-	100,0	-	-	-	-
Тиосульфат натрия	Образование H ₂ S	-	100,0	-	-	-	-
Мочевина	Уреаза	-	77,0	-	-	+	23,0
L-триптофан	Образование индола	+	100,0	-	-	-	-
Пируват натрия	Образование ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра)	-	100,0	-	-	-	-
Желатин (бычьего происхождения)	Желатиназа	-	77,0	-	-	+	23,0
D-глюкоза	Ферментация/окисление (глюкоза)	+	100,0	-	-	-	-
D-маннит	Ферментация/окисление (маннит)	+	100,0	-	-	-	-
Инозитол	Ферментация/окисление (инозит)	-	100,0	-	-	-	-
D-сорбит	Ферментация/окисление (сорбит)	+	100,0	-	-	-	-
L-рамноза	Ферментация/окисление (рамноза)	+	100,0	-	-	-	-
D-сахароза	Ферментация/окисление	+	72,0	-	28,0	-	-
D-мелибиоза	Ферментация/окисление (мелибиоза)	+	100,0	-	-	-	-
Амигдалин	Ферментация/окисление (амигдалин)	+	100,0	-	-	-	-
L-арабиноза	Ферментация/окисление (арабиноза)	+	100,0	-	-	-	-
Устойчивость к АБП группы цефалоспоринов	Бета-лактамазы	-	89,0	-	-	+	11,0

Примечание : «+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция, ТР – типичные реакции, ВР- вариабельные реакции, АР- атипичные реакции, Р- тип реакции, %- доля изолятов, проявляющих реакцию.

Escherichia coli обладали способностью замедленно расщеплять лактозу на среде Гисса; на среде Эндо - образовывали мелкие розовые колонии с красным центром, без металлического блеска; на трёхсахарном агаре Олькеницкого через 24 ч. культивирования - формировали желтый столбик, розовый скос, разрывы среды, через 48 ч. инкубирования вся среда пожелтела.

Из 179 изолятов, выделенных от телят, тип О-антиген идентифицировали в 92 случаях (49,7%). Чаще всего выделяли серогруппы *Escherichia coli* O78 (9,5%), O26 (8,9%), O15 (6,7%), O20(6,7%), O18(6,1%), O9 (6,1%), O15(5,5%).

Escherichia coli представлены широким спектром серологических вариантов, которые с течением времени могут меняться, поэтому необходимо постоянно проводить мониторинговые исследования для лабораторного контроля смены серотипов и корректировки антигенного состава вакцин, выпускаемых биофабриками.

Также получены изоляты редко встречающихся возбудителей инфекций респираторного тракта животных, которые составляли менее 5% от общего числа выделенных микроорганизмов: *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia rettgeri* и *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoae agglomerans*.

Характер роста на питательных средах микроорганизмов *Stenotrophomonas maltophilia* представлены на рис. 2.2.1.2. 5, 2.2.1.2.6.

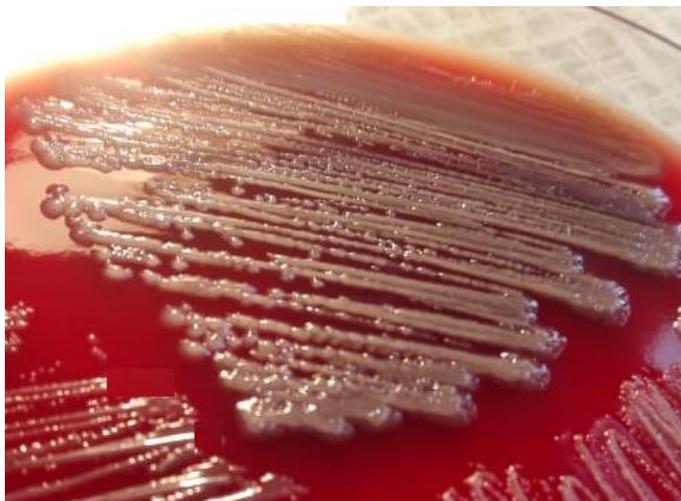


Рисунок 2.2.1.2.5 - Рост *S. maltophilia* на кровяном МПА

Даже при отсутствии ферментативной активности *S. maltophilia* на средах с углеводами, мы наблюдали обильный рост по уколу и наличие биоплёнки на поверхности сред.



Рисунок 2.2.1.2.6 - Рост *S. maltophilia* на поверхности сред Гисса с углеводами

Получение результатов культурально-биохимической идентификации *S. maltophilia* до вида не являлось затруднительным (табл. 2.2.1.2.4).

Атипичный результат наблюдали в двух тестах, из них *S. maltophilia* показывали нетипичный результат дифференцирующего теста на уреазу (+) и лизиндекарбоксилазу (-).

Большинство *Pantoea agglomerans* образовывали желтый нерастворимый в воде пигмент, H_2S не образовывали, не синтезировали лизиндекарбоксилазу. Катаболизировали глюкозу и другие сахара с образованием кислоты (табл.2.2.1.2.5).

Установлено, что диапазон изменений у условно-патогенных микроорганизмов разнообразен. В зависимости от температуры культивирования свойства бактерий меняются. Так, *Pantoea agglomerans* образовывали при температуре 20-25 °С большее количество полисахаридов, чем при температуре культивирования 37 °С (рис. 2.2.1.2.7).

Анализ биохимических характеристик изученных видов бактерий показал проявление нетипичных свойств, в среднем, в $12,5 \pm 4,65\%$ случаев, при этом

максимальные значения этого показателя отмечали у *Klebsiella pneumoniae*, а отсутствие их определены у *Stenotrophomonas maltophilia*.

Таблица 2.2.1.2. 4 - Результаты исследований, проведенные с *S.maltophilia*

Тест	Активные компоненты	Реакции/ферменты	Результат
			ТР
ONPG	2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид	β-галактозидаза (орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид)	+
ADH	L-аргинин	Аргининдигидролаза	+
LDC	L-лизин	Лизиндекарбоксилаза	+
ODC	L-орнитин	Орнитиндекарбоксилаза	-
CIT	Цитрат тринатрия	Расщепление цитрата	+
H ₂ S	Тиосульфат натрия	Образование H ₂ S	-
URE	Мочевина	Уреаза	-
TDA	L-триптофан	Триптофандеаминаза	-
IND	L-триптофан	Образование индола	-
VP	Пируват натрия	Образование ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра)	+
GEL	Желатин (бычьего происхождения)	Желатиназа	+
GLU	D-глюкоза	Ферментация/окисление (глюкоза)	-
MAN	D-маннит	Ферментация/окисление (маннит)	-
INO	Инозитол	Ферментация/окисление (инозитол)	-
SOR	D-сорбит	Ферментация/окисление (сорбит)	-
RHA	L-рамноза	Ферментация/окисление (рамноза)	-
SAC	D-сахароза	Ферментация/окисление	-
MEL	D-мелибиоза	Ферментация/окисление (мелибиоза)	-
AMY	Амигдалин	Ферментация/окисление (амигдалин)	-
ARA	L-арабиноза	Ферментация/окисление (арабиноза)	-

Примечание: «+» - положительная реакция, «-»- отрицательная реакция, ТР – типичные реакции.

Таблица 2.2.1.2.5 - Биохимическая идентификация *Pantoea agglomerans*

Активные компоненты	Реакции/ферменты	Результат	
		ТР	ВР
2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид	β-галактозидаза (орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид)	+	-
L-аргинин	Аргининдигидролаза	-	+
L-лизин	Лизиндекарбоксилаза	-	
L-орнитин	Орнитиндекарбоксилаза	-	+
Цитрат тринатрия	Расщепление цитрата	+	
Тиосульфат натрия	Образование H ₂ S	-	
Мочевина	Уреаза	+	-
L-триптофан	Триптофандеаминаза	-	
L-триптофан	Образование индола	-	
Пируват натрия	Образование ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра)	+	-
Желатин (бычьего происхождения)	Желатиназа	+	
D-глюкоза	Ферментация/окисление (глюкоза) (4)	+	
D-маннит	Ферментация/окисление (маннит) (4)	+	
Инозитол	Ферментация/окисление (инозитол) (4)	-	
D-сорбит	Ферментация/окисление (сорбит) (4)	+	
L-рамноза	Ферментация/окисление (рамноза) (4)	+	
D-сахароза	Ферментация/окисление	+	
D-мелибиоза	Ферментация/окисление (мелибиоза) (4)	+	
Амигдалин	Ферментация/окисление (амигдалин) (4)	+	
L-арабиноза	Ферментация/окисление (арабиноза) (4)	+	

Примечание: «+» - положительная реакция, «-»- отрицательная реакция, ТР – типичные реакции, ВР- вариабельные реакции.

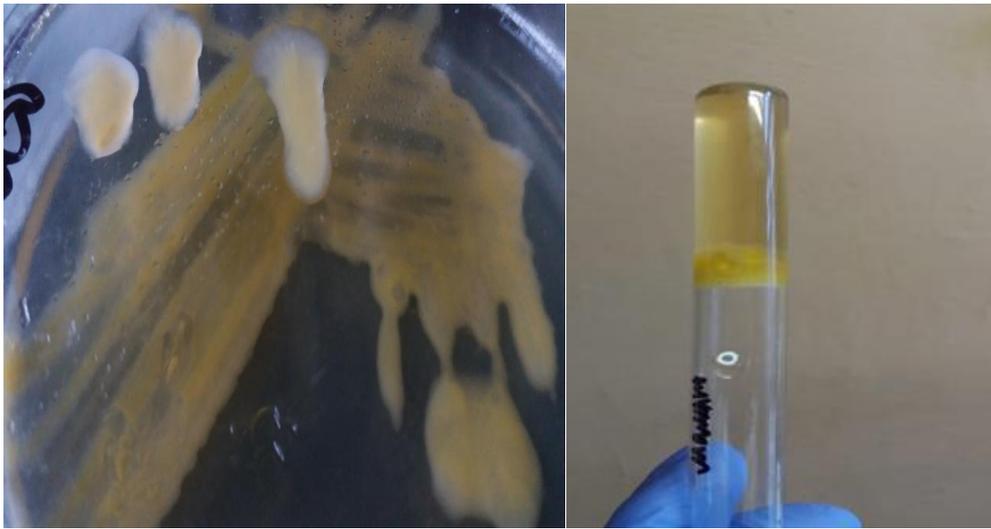


Рис.2.2.1.2.7 - Образование мукоидного фенотипа *Pantoea agglomerans* при росте на МПА и на МПБ

Все микроорганизмы были вирулентны, отличались по культурально-биохимическим свойствам, а также по чувствительности к разным группам антибактериальных препаратов.

Надо отметить, что каждый изолят отдельно включал не более 5% (2 или 3) нехарактерных тестов. По нашему мнению, эти значения косвенно отражают, во-первых, степень однородности изученной совокупности каждого вида бактерий и, во-вторых, количество источников происхождения.

Клинические изоляты оппортунистических микроорганизмов (*K. pneumoniae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pantoea agglomerans* и др.) обладали разными фенотипами, характеристики которых зависели от многих параметров, включая локализацию патологического процесса, проводимую антибактериальную терапию. Например, при пневмониях и маститах животных преобладали мукоидные штаммы с гиперпродукцией альгината, регистрировали биопленкообразующие изоляты, для которых мукоидность не является обязательным признаком. Подобные различия связаны как с селекцией клонов, так и с регуляцией экспрессии тех или иных генов, определяемой местными условиями обитания.

2.2.1.3 Результаты выявления и идентификации бактериологическими методами изолятов кампилобактерий

Бактериологический метод основан на культивировании и получении чистых культур микроорганизмов, содержащихся в исследуемых образцах с последующей их идентификацией до вида.

Выделенные бактерии из клинического материала идентифицировали до вида по совокупности типичных биохимических реакций. Все изоляты перед биохимической идентификацией дифференцировали окраской по Граму и по морфологии бактериальных клеток.

Campylobacter fetus по морфологическим свойствам - грамотрицательные палочки, извитые микроорганизмы, напоминающие крылья летящей чайки (S-образная и спиралевидная) (рис. 2.2.1.3.1).

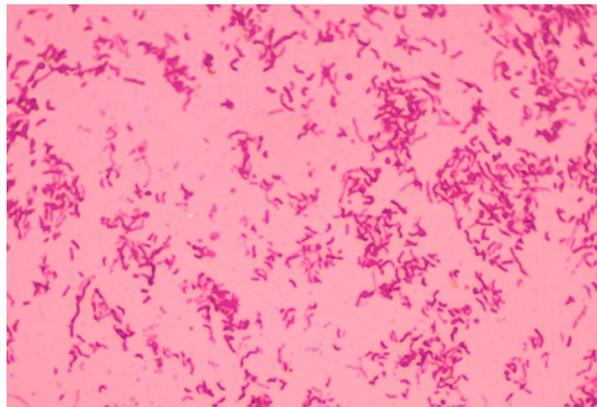


Рисунок 2.2.1.3.1 - Форма *Campylobacter fetus* при увеличении $\times 90$: S-образная и спиралевидная

Исследуемые культуры кампилобактерий обладали подвижностью, продуцировали каталазу и оксидазу. Не росли на ПЖА с 3,5% NaCl и в 0,5% агаре по уколу. Культуры штаммов, отнесенные к *C.fetus*, обладали способностью роста при температуре 25°C и не росли при 42°C , не росли на ПЖА с 1% глицина, не образовывали H_2S в трехсахарном агаре.

На полужидком агаре (ПЖА) кампилобактерии росли в виде нежного кольца под поверхностью среды (рис. 2.2.1.3.2).

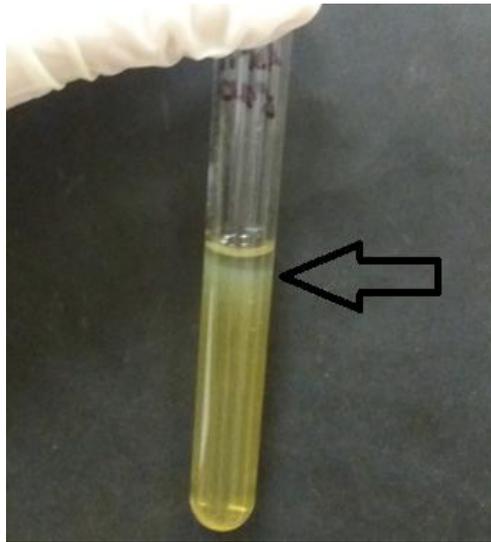


Рисунок 2.2.1.3.2 - Рост *Campylobacter fetus* на полужидком агаре (ПЖА)

Исследование действия лизоцима на *Campylobacter fetus* показывали, что после обработки лизоцимом на 3-и сутки появлялся рост типичных колоний кампилобактеров на всех чашках 10^4 - 10^6 КОЕ/мл. Лизоцим не оказывал бактерицидный или статистический эффект на *Campylobacter fetus*.

На кровяном мясо-пептонном агаре наблюдался рост в виде мелких круглых колоний или сплошной рост по штрихам в виде росинчатого налета, отсутствовала гемолитическая активность.

Патогенное значение оценивали не только по наличию гемолизина у *Campylobacter fetus*, но и определяли лизоцимную активность и вирулентность.

В случаях наличия в культуре таких микроорганизмов как *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, процент получения чистых культур *Campylobacter fetus* в исследуемом материале значительно снижался, что связано с антагонистическими отношениями между возбудителем кампилобактериоза и другими бактериями, и сложностями получения чистых культур (рис. 2.2.1.3.3).

При исследовании образцов бактериологическим методом на присутствие *Campylobacter spp.* положительный результат получен для 10, 0% образцов. По результатам наших исследований *Campylobacter jejuni* не обнаружены, а выявлены трудно культивируемые формы возбудителей *Campylobacter fetus ssp.*

fetus (9,0%) и *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* (1,0%), вызывающие репродуктивные нарушения у крупного рогатого скота (КРС) (таблица 2.2.1.3.1).

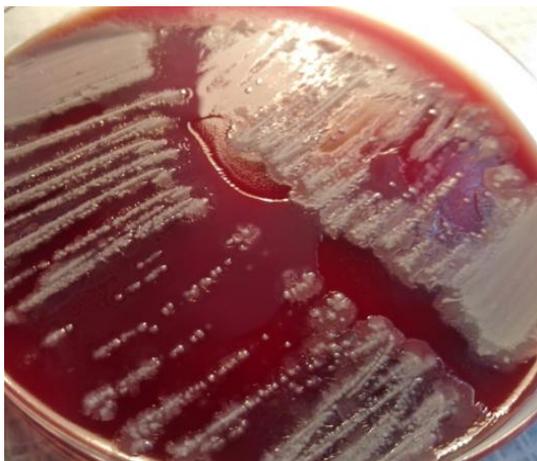


Рисунок 2.2.1.3.3 - Смешанная культура на кровяном агаре *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и *Campylobacter fetus*

Таблица 2.2.1.3.1 - Спектр кампилобактерий, выделенных при бактериологическом обследовании поголовья крупного рогатого скота в животноводческих комплексах

Наименование культуры возбудителя	Абортированные плоды (n=18)	Слизь (n=200)	
		влагалищная	препуциальная
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	3	10	7
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	-	2	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
ВСЕГО:	3	12	7

Бактериологический метод не лишён недостатков, к которым можно отнести длительность исследования, трудоёмкость, высокий риск контаминации, низкую чувствительность. В ходе исследований встречались полимикробные сообщества, которые образовывали биопленки. Это затрудняло проведение бактериологического анализа

Использование классического бактериологического метода диагностики микоплазмоза, уреоплазмоза и кампилобактериоза животных ограничено из-за

трудности культивирования, получения чистых культур и переменных биохимических свойств.

Установлено, что одна из причин урогенитальных инфекций крупного рогатого скота в условиях животноводческих хозяйствах – микроорганизмы рода *Campylobacter*. Бактериальный состав микрофлоры влагалищной слизи, отобранной от коров с признаками вульвовагинита, эндометрита и нарушениями репродуктивной функции (аборты, рождение мертвых плодов, бесплодие) исследовали бактериологическим и молекулярно-генетическим методами.

2.2.1.4 Результаты выявления и идентификации бактериологическими методами изолятов микоплазм

Микоплазмы со сложными пищевыми потребностями росли только на многокомпонентных средах, включающих такие ингредиенты, как дрожжевой экстракт, сыворотка крови животных, углеводы, стеролы, аминокислоты, неорганические соли. Для их дифференциации нужны специальные, сложные питательные среды, содержащие глюкозу и аргинин. При культивировании микоплазм с целью дальнейшей идентификации их условно делили на три группы, отличающиеся по биохимическим свойствам: глюкозоферментирующие, аргининферментирующие и не ферментирующие ни глюкозу, ни аргинин.

Приготовление специальных питательных сред для микоплазм требовало больших затрат времени и дорогостоящих компонентов.

В ходе исследований использовали жидкие диагностические питательные среды различных производителей, в состав которых входили индикатор (бромтимоловый синий, феноловый красный и т.д.) и соответствующий субстрат ферментативной активности (мочевина, аргинин, глюкоза). Сложность выращивания микоплазм на бесклеточных питательных средах и возможность их перехода в некультивируемые формы существенно ограничивали применение бактериологического метода.

Схема микробиологического исследования микоплазм. Материал отбирали на ранних стадиях клинического проявления болезни, от трупов животных не

позднее 2-3 ч после гибели, с максимальным соблюдением стерильности и транспортировали в термосе со льдом (рис.2.2.1.4.1, рис. 2.2.1.4.2).



Рисунок 2.2.1.4.1- Микоплазменная инфекция с поражением суставов телят, вызванная *M. bovis*



Рисунок 2.2.1.4.2- Микоплазменная инфекция с консолидацией легких, вызванная *M. bovis*

Изоляция микоплазм наиболее вероятна, если посев на питательные среды произведен в первые пять часов после взятия материала. Для хранения в течение 2-3 сут материал замораживали при -20°C .

При подозрении на микоплазмозный мастит для исследования с соблюдением асептики отбирали пробы молока.

При транспортировке образцов маститого молока рекомендуем в него добавлять 5 мкг/мл ампициллина, а так же амоксиклав.

Амоксиклав, содержащий амоксициллин (антибиотик группы пенициллинов) и клавулановую кислоту (ингибитор β -лактамаз,

предотвращающий инактивацию амоксициллина и расширяющий спектр его активности), обладающий бактерицидным действием на широкий спектр бактерий.

При респираторной патологии биоматериал отбирали влажными тампонами из глубины носовых ходов. Посмертно брали патматериал из трахеи, бронхов, легочной ткани. В случае репродуктивной патологии у коров для исследования отбирали тампонами мазки из вульвы, при наличии аборта — амниотическую жидкость, кусочки легких абортированных плодов.

Прямое микроскопическое обнаружение микоплазм в окрашенных препаратах из исследуемого материала из-за полиморфизма, слабого восприятия красителей и хрупкости клеток имело небольшую диагностическую ценность.

Пробоподготовка биологического материала. В результате обработки образцов (клинический материал и маститное молоко) от крупного рогатого скота с добавлением Амоксиклава, производили их посев на питательные среды.

Тканевый материал и внутрисуставная жидкость может содержать ингибиторы (например, металлопротеиназа), поэтому их разводили в жидкой питательной среде до 10^6 и каждое разведение инкубировали.

Ткани предварительно гомогенизировали. Гомогенизацию проводили в фосфатном буферном растворе или жидкой питательной среде. Чрезмерно не измельчали ткани из-за выделения ингибиторов, приготовление разведений гомогената преследовало эту же цель.

С целью подавления роста обычных бактерий и грибов исследуемый материал (гомогенат) перед посевом обрабатывали. Взвесь материала разводили фосфатно-солевым раствором 1:10, добавляли пенициллин (5000 ЕД/мл), при значительной контаминации — полимиксин В (100 ЕД/мл), ацетат таллия (1:2000—1:4000), для подавления грибов — амфотерицин В (50 мкг/мл).

Для подавления посторонней микрофлоры использовали пенициллин и его аналоги (при культивировании микоплазм) или линкомицин (при культивировании уреоплазм).

При подборе антибиотика учитывали действие на микоплазм, и не подавлял рост микоплазм, но эффективно работал против других бактерий. Поэтому препаратами выбора стали антибиотики групп пенициллинов: амоксиклав и ампициллин. Исходя из вышеизложенного, мы использовали амоксиклав с целью подавления роста посторонней микрофлоры.

В случаях наличия в пробах микоплазм, ассоциированных с такими оппортунистическими микроорганизмами, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, процент обнаружения микоплазм в исследуемом материале бактериологическим методом значительно снижался.

Посев исследуемого материала на питательные среды и культивирование. Производили посев биологического материала в две пробирки с жидкой питательной средой и в две чашки Петри с агаровой средой для выделения культуры микоплазм.

С целью более глубокого изучения культуральных свойств микоплазм выросшие на селективных индикаторных средах культуры пересеивали на аналогичные плотные диагностические среды с содержанием 1,3 % агара Дифко. Для этого 0,1 мл бульонной культуры микоплазм вносили пастеровской пипеткой или стерильным одноразовым шприцем на поверхность агара без штриховки и подсушивали при комнатной температуре. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 5 дн. Чашки с ростом микоплазм просматривали под малым увеличением микроскопа. Микоплазмы на плотной среде росли в виде круглых, не сливающихся друг с другом колоний с растущим в агар центром и нежной поверхностной периферией (рис. 2.2.1.4.5). Также отмечали мелкие зернистые колонии без особо выраженной центральной зоны. При обнаружении типичных колоний их вместе с агаровым блоком отсеивали на жидкие селективные питательные среды с соответствующей ферментативной активностью.

При отсутствии роста проводили 3-5 последовательных «слепых» пассажей, если в течение этого периода индикаторная среда не изменяла цвет. Использовали промежуточную ПЦР-индикацию для того, чтобы определить,

какой из пассажей в серии последовательных клонирований является достаточным.

При предположении на L-формы бактерий проводили 3-5 последовательных пассажей выделенных культур, с трехсуточным интервалом для восстановления исходных форм бактерий.

Для последовательных пересевов культур микоплазм с жидкой среды на жидкую 0,1 мл бульонной культуры переносили в 2 мл свежей бульонной среды с соответствующим субстратом ферментативной активности. Пробирки с посевами инкубировали в термостате при температура 37°C в течение трех суток или до изменения цвета среды. При пересеве с жидкой на плотную (1,3 % агара) 0,1 мл бульонной культуры микоплазм вносили пастеровской пипеткой на агаровую среду. Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 5 сут.

На жидких средах учитывали изменение цвета, прозрачность, наличие небольшого мутного или хлопьевидного осадка.

На плотных средах регистрировали скорость роста колоний, их форму. Быстрота роста и образования типичных колоний зависели от особенностей выделенной культуры, количества микробных клеток и от адаптированности к среде, на которую её пересевали. Так, некоторые культуры лучше росли на жидких питательных средах, чем на плотных, и наоборот.

С агаровой среды на жидкую переносили вырезанные агаровые блоки, содержащие микоплазменные колонии.

Для культивирования микоплазм использовали питательные среды (модифицированная среда Эдварда, Хейфлика, Friss) (рис. 2.2.1.4.3)



Рисунок 2.2.1.4.3- Приготовление питательных сред

Посевы инкубировали при 37-38 °С в течение 5-7 сут, ежедневно просматривая. При отсутствии роста микоплазм в течение этого срока проводят пять последовательных пассажей на средах с интервалом 5-8 сут.

Рост микоплазм *M. bovis* на жидких питательных средах проявлялся опалесценцией, легким помутнением (рис. 2.2.1.4.4)



Рисунок 2.2.1.4.4- Культуральные свойства микоплазм и посторонней микрофлоры

Бактериологическим методом изучали наличие или отсутствие роста при посевах на жидкие и полужидкие среды, и его результат выборочно подтверждали с применением ПЦР.

При выделении микоплазм на жидких элективных диагностических питательных средах производили дифференциацию по главным биохимическим признакам - разложению глюкозы, аргинина, мочевины.

В ходе нашего исследования отбирали выделенные культуры, которые относили к группе «неферментирующих» микоплазм. По современным данным в эту таксономическую группу включены *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovigenitalium*.

В случае роста на средах Фрисс не расщепляющие глюкозу микоплазмы *M. bovis*, не изменяли цвет среды, их использовали для дальнейшей работы. Помутнение, образование пристеночного роста, осадка и/или изменение цвета жидкой среды может быть обусловлено ростом посторонней микрофлоры. Микоплазменный осадок трудно бывает отличить и от осадка, образующегося при осаждении белков из содержащейся в средах сыворотки крови.

Результат посева изолята считали положительным, если рост микоплазм отмечали хотя бы в одном из засеянных вариантов среды (включая слепые пассажи).

Посевы микоплазм на плотных средах инкубировали в течение 5-14 сут в аэробных и микроаэрофильных условиях при 37⁰С. Длительное культивирование во избежание подсыхания сред его проводили при относительной влажности.

Пробирки с посевами в жидкие питательные среды инкубировали в аэробных и микроаэрофильных условиях и ежедневно контролировали на наличие роста. Наилучшие результаты удалось получить при использовании эксикаторов с 5-10% CO₂.

Для подтверждения роста микоплазм на жидких питательных средах производили посевы на плотную питательную среду. На плотных средах наличие колоний обнаруживали под малым увеличением микроскопа (x40) (рис. 2.2.1.4.5).

При отсутствии роста осуществляли до 5 пассажей на жидкой среде с пятидневным интервалом и проводили ПЦР перед отрицательным заключением.

Микоплазмы образовывали довольно характерные колонии на плотной питательной среде (модифицированная среда Хейфлик, содержащая дрожжевой экстракт, сыворотку крови лошади, теллурид калия, ее готовили *ex tempore*).

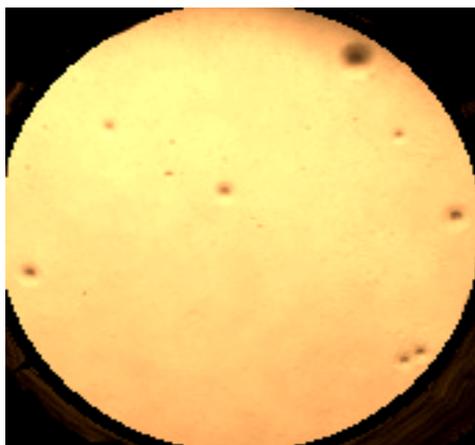


Рисунок 2.2.1.4.5- Колонии *Mycoplasma spp.* на плотной среде (x40): с вросшим в агар центр колонии и периферийной зоной роста

Центральная часть колонии вросла в толщу питательной среды, что обнаруживали путем снятия бактериальной массы фламбированным скальпелем

или бактериологической петлей с последующим изучением участка среды под колонией при помощи микроскопа (рис. 2.2.1.4.5).

При обнаружении колоний, сходных с колониями микоплазм, проводили их клонирование на средах без ингибиторов с целью получения чистой культуры. Из бульонной культуры готовили разведения 10^{-1} - 10^{-9} , каждое из которых (0,2-0,3 мл) пересевали на две чашки Петри с плотной питательной средой. Для выделения чистой культуры агаровый блок с колониями вырезали скальпелем и помещали в пробирку с 2-3 мл жидкой питательной среды, инкубировали 48 ч при 37°C .

Из биоматериала, взятого при респираторной патологии крупного рогатого скота, после доставки его из хозяйства делали посев на плотные среды Фрисс и Хейфлик. Параллельно материал засеивали на аналогичные жидкие питательные среды. Материал, взятый тампонами, а также трахеальные и бронхиальные смывы засеивали в бульон в трех разведениях (10^{-1} - 10^{-3}), легочный гомогенат разводили до 10^{-9} . Посевы инкубировали при 37°C в CO_2 -инкубаторах при высокой влажности.

Посевы из жидкой среды через 2—3 дня культивирования пересевали на агаровые среды с последующей отвивкой выросших колоний на жидкие среды (рис. 2.2.1.4.6)



Рисунок 2.2.1.4.6- Культивирование микоплазм на жидких питательных средах Фрисс и Хейфлик

Индикация и идентификация чистых культур микоплазм. Диагностические сложности при выявлении и особенно типировании микоплазм, изолированных от крупного рогатого скота бактериологическим методом заключалось в следующем.

Под воздействием ингибиторов, входящих в состав питательных сред для первичного культивирования микоплазм, возможна L-трансформация бактериальных контаминантов, что требует дифференциации колоний L-форм бактерий и микоплазм.

Бактериологическую идентификацию чистых культур микроорганизмов возможно осуществлять на основании изучения ферментативных характеристик, чувствительности к дигитонину, а также при помощи серологических методов. Для дифференциации представителей родов *Mycoplasma*, *Ureaplasma* и *Acholeplasma* исследуют чувствительность к дигитонину и наличие уреазы. Дальнейшее исследование ферментативной активности и культуральных признаков позволяет провести видовую идентификацию основных микоплазм (табл. 2.2.1.4.1).

Таблица 2.2.1.4.1 - Биохимические свойства видов и серогрупп микоплазм, выделяемых от крупного рогатого скота (Lausman L. H., 1994) [181].

Вид или серогруппы	Аргинин	Глюкоза	Фосфатаза	Редукция тетразолия натрия	Образование пленки и пятен	Гидролиз желатина
<i>M. bovigenitalium</i>	-	-	+	-/+	+	-
<i>M. bovis</i>	-	-	+	+/+	d	Н.д.

Примечание: «-» - отрицательный результат, «+» - положительный результат, н.д. – нет данных, d – 11-89 % изоляты с положительным результатом

В ходе наших исследований окончательную идентификацию выделенных чистых культур из группы «неферментирующих» микоплазм проводили с применением молекулярно-генетического метода.

Индикация бактериологическим методом *M.bovis*, изолированных из легких абортированных телят, при атипичных пневмониях у большой группы животных, при маститах коров подтверждает этиологическую роль данного возбудителя в развитии патологии животных.

Однако, при всех достоинствах бактериологического подхода идентификации микроорганизмов существуют проблемы их культивирования с использованием питательных сред со сложным компонентным составом,

трудности создания оптимальных условий первичной изоляции и доставки клинического материала, а также трудоемкость и самое главное - длительность классического микробиологического исследования, что затрудняет возможность скрининга большого числа проб.

Сроки выполнения бактериологического исследования в большинстве случаев являются основным препятствием для назначения первичной этиотропной терапии.

К другим недостаткам бактериологического метода следует отнести высокий риск контаминации, низкую чувствительность, сложность видовой идентификации. Некорректное применение антимикробных препаратов в ветеринарной практике, а также в условиях организма больного животного многие гуморальные факторы защиты самого организма (лейкоцитарные ферменты, низкий рН, лизоцим, система комплемента и др.) могут способствовать образованию измененных форм бактерий (близких к L-вариантам) некультивируемых бактерий. Феномен образования бактериями некультивируемых форм характерен для грамположительных и грамотрицательных бактерий. Некультивируемые микроорганизмы можно определить как состояние бактерий, клетки которых сохраняют низкую метаболическую активность, недостаточную для непрерывного клеточного деления, необходимого для роста в жидких или на плотных средах, в норме поддерживающих рост этих бактерий.

В связи с этим, одним из приоритетных направлений развития лабораторной диагностики оппортунистических инфекций является внедрение в практику новых молекулярно-генетических методов и усовершенствование имеющихся тест-наборов с целью повышения чувствительности, специфичности, а также ускорения сроков постановки диагноза.

Недостатками фенотипической идентификации, являются нетипичные и вариабельные культурально-биохимические свойства бактерий, что вызывает сложности в интерпретации результатов и обуславливает необходимость применения протеометрических и молекулярно-генетических методов. Таким

образом, приведенная ниже схема тройной индикации и идентификации *M.bovis*: 1-й этап - посев с первичной индикацией с применением ПЦР – 2-ой этап - пересев и накопление с промежуточным ПЦР-контролем – 3-ий этап - подтверждающая индикация и идентификация чистых культур с применением ПЦР, является оптимальным алгоритмом полифазных лабораторных исследований, разработанным нами в процессе проведенной работы.

2.2.2 Применение MALDI–TOF–MS анализа для видовой идентификации и дифференциации микроорганизмов, изолированных от животных, с атипичными биологическими свойствами

Микробные ассоциации выделяли из клинического материала от коров с вульвовагинитами, маститами и от телят с болезнями респираторных органов.

«Золотым стандартом» лабораторной диагностики являлся бактериологический метод. Однако, как было отмечено выше, при всех достоинствах бактериологического метода в то же время он вариабелен, трудоемок и длителен для успешного применения в эпизоотологическом мониторинге и не всегда обеспечивает получение достоверной информации вследствие невысокой информативной способности типирования и идентификации микроорганизмов с измененными свойствами.

Бактерии очень пластичны и легко изменяются под действием различных неблагоприятных факторов (антибиотиков, дезинфектантов, изменения температуры, старение культуры).

В процессе культивирования микроорганизмов на различных питательных средах нами зафиксированы изменения биологических свойств: формирование мукоидного фенотипа; способности к продукции пигмента, бактериоцинов и токсинов; вариации чувствительности к АМП, включая бактериофаги и др., поэтому стандартные бактериологические методы не всегда оказывались эффективными при видовой дифференциации микроорганизмов с измененными морфологическими и культурально-биологическими свойствами.

В результате наших исследований были выявлены атипичные биохимические свойства у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

В связи с этим была проведена повторная идентификация некоторых изолятов с применением MALDI-TOF-MS анализа. Методом MALDI-TOF-MS анализом определены белковые профили и виды изучаемых бактерий. Идентифицировано 6 видов условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*. Получены изоляты 5 видов редко встречающихся возбудителей бактериальных инфекций животных: *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas koreensis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia rettgeri* и *Stenotrophomonas maltophilia*. При этом видовая идентификация изолятов полностью соответствовала их биохимической идентификации.

В процессе мониторинга важность изучения биохимического профиля изолятов необходима не только с точки зрения идентификации, но также для оценки неоднородности видовых популяций возбудителей.

MALDI-TOF-MS анализ предпочтительнее использовать для идентификации условно-патогенных энтеробактерий в практике ветеринарных лабораторий, поскольку в базе данных MALDI Biotyper версии 3.0 представлено значительно большее разнообразие видов, чем можно определить по биохимическим показателям.

Протеомным методом проводили идентификацию *CoNS* с мукоидным фенотипом (M-колонии). Изучены изоляты стрептококков следующих видов: *S. agalactiae*, *S. disagalactiae*, *S. pyogenes*. Среди всех изолятов, протестированных методом MALDI-TOF-MS анализа с $score \geq 2,0$.

Параллельно произведена идентификация изолятов *S. disagalactiae* с помощью VITEK2Compact, при которой получены неоднозначные результаты.

В результате идентификация β -гемолитических стрептококков полное совпадение отмечено только при тестировании *S. agalactiae* и *S. pyogenes*.

На основании проведенного исследования сделано следующее заключение?

что метод MALDI-TOF-MS анализа по объективности, скорости и простоте постановки в целом значительно превосходит используемые в настоящее время способы видовой идентификации микроорганизмов.

Сравнение вариантов определения видов микроорганизмов свидетельствует о высокой частоте совпадений результатов, что дает основание применять MALDI-TOF-MS как самостоятельный метод в ветеринарных лабораториях для видовой и родовой идентификации микроорганизмов, выделенных от животных.

Метод MALDI-TOF-MS анализа показал высокую достоверность ($score \geq 2$) видовой идентификации стафилококков, энтерококков, условно-патогенных энтеробактерий, неферментирующих бактерий, и β -гемолитических стрептококков, что обосновывает приоритет MALDI-TOF-MS при видовом определении микроорганизмов этих групп.

Методом MALDI-TOF-MS анализа проведена видовая идентификация коринебактерий, выделенных из молока коров при маститах. Высокое качество идентификации ($score \geq 2,0$) отмечено лишь для одного вида коринебактерий – *Corynebacterium amycolatum* (более 80,0%), тогда как остальные виды коринебактерий определялись с меньшими значениями $score$. Все случаи несовпадений проверяли секвенированием генов 16S РНК. Секвенирование 16S РНК мы применили как референс-метод для идентификации выделенных коринебактерий.

Одновременное применение бактериологических методов и метода с использованием MALDI-TOF-MS анализа позволяет существенно повысить обоснованность и скорость принятия клинических решений. На основании получаемых данных можно с наибольшей вероятностью выбирать своевременную этиотропную терапию.

Недостатками бактериологических и протеометрических методов являются сложности получения чистой культуры микроорганизмов для дальнейшей идентификации.

2.2.3 Молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование) в лабораторной диагностике бактериальных инфекций животных

2.2.3.1 Апробация микрочиповой системы с лиофилизированными реактивами для молекулярно-генетических исследований в производственных условиях

2.2.3.1.1 Состав и характеристика наборов микрочипов с диагностической лиофилизированной тест-системой

Одним из вариантов постановки ПЦР в режиме реального времени является проведение реакции в формате микрочиповой системы с иммобилизованными реактивами для молекулярно-генетического анализа. Данный формат постановки реализован с применением микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот в режиме реального времени. Примером подобного оборудования российского производства является амплификатор «АриаДНА» (ГК «Люмэкс», Санкт-Петербург).

Проведение ПЦР в микрочиповом формате позволило определять нескольких инфекционных возбудителей в одной пробе. При этом диагностическая чувствительность мультиплексной микрочиповой системы сопоставима с чувствительностью обычных тест-систем на основе ПЦР в реальном времени. Преимуществом микрочиповых систем с иммобилизованными реактивами является сокращение количества манипуляций при проведении анализа, за счет чего снижается вероятность ошибок и уменьшается общая продолжительность исследования. Кроме того, использование формата мультиплексной микрочиповой системы с иммобилизованными реактивами позволяет увеличить производительность лаборатории в 1,5-2 раза без увеличения приборной базы за счет меньшей загрузки амплификаторов.

При использовании микроматриц детекция и идентификация ДНК микроорганизмов осуществляли методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Тест-системы иммобилизованы в ячейках ПЦР-матрицы в произвольном порядке, при

этом схема ПЦР-матрицы описана в сопроводительной документации к каждому набору матриц.

Для проведения ПЦР в реальном времени в формате микроматрицы необходимо следующее оборудование - амплификатор нуклеиновых кислот в реальном времени, обеспечивающий проведение термоциклирования в микрореакторах, объемом до 1,5 мкл ("АриаДНА", ГК «Люмэкс», Россия или аналогичный) (рис. 2.2.3.1.1.1).

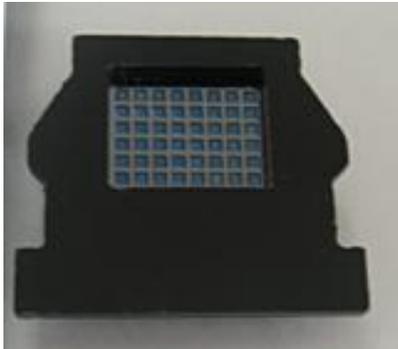


Рисунок 2.2.3.1.1.1 - Микрочиповый ПЦР-РВ амплификатор «АриаДНА»

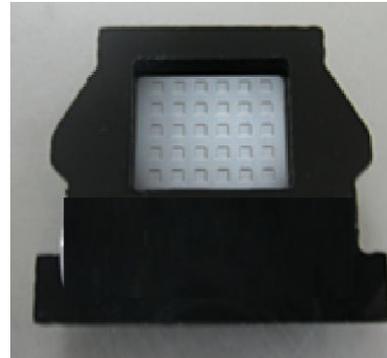
Микрочипы с лиофилизированными тест-системами «Урогенитальные инфекции КРС» системами («УГИ-1», «УГИ-2», «УГИ-3», «УГИ-4» КРС), разработанные ГК "Люмэкс" позволяли исследовать образцы клинического материала и проводить молекулярную идентификацию ДНК одного возбудителя или одновременно несколько возбудителей: *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*, *Campylobacter fetus* и др. Микрочипы с лиофилизированными тест-системами, производимые компанией ГК "Люмэкс" могут быть использованы только на приборе АриаДНА, что значительно ограничивает возможности её применения.

Микрочип содержит 30 ячеек микрореакторов с лиофилизированными ПЦР-смесями (рис.2.2.3.1.1.2).

Материал реакционной зоны: кремний или алюминий. Оптимизация материала микрочипа по теплопроводности сократила время амплификации за счет ускорения нагрева и охлаждения ПЦР-смесей в ячейках.



А



В

Рисунок 2.2.3.1.1.2 - Микрочип с иммобилизованными реагентами А) кремневый (Si) микрочип и В) алюминиевый (Al) микрочип

Гидрофильная поверхность в реакционных зонах (ячейках) обеспечивает хорошую растекаемость пробы внутри ячейки. Гидрофобная поверхность вне области реакционных зон предотвращает растекание пробы за границы ячейки, объем 1,2 мкл.

Исключительно гидрофобная поверхность снаружи микрореакторов и гидрофильная поверхность внутри ячейки удовлетворяет требованиям удобства использования и предотвращает взаимное перемешивание проб (кросс-контаминацию) (рис. 2.2.3.1.1.3, рис. 2.2.3.1.1.4).

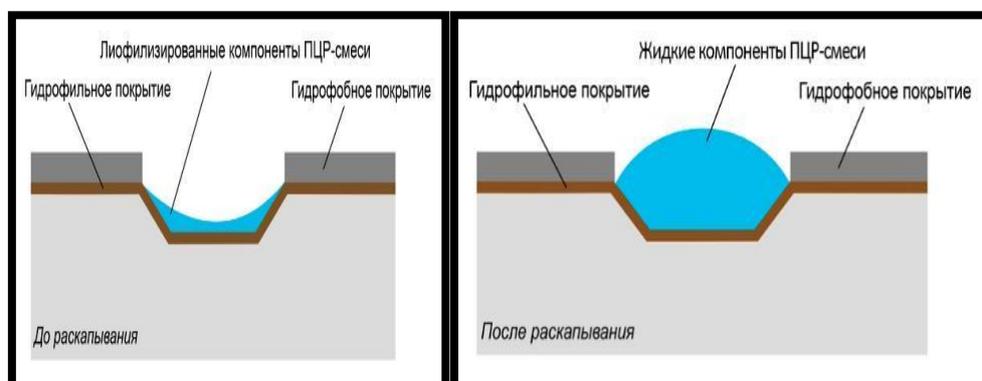
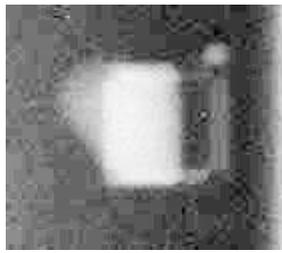


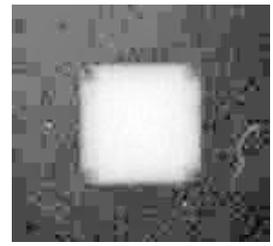
Рисунок 2.2.3.1.1.3 - На схеме показана ячейка микрочипа в разрезе



гидрофоб/гидрофоб



гидрофил/гидрофил



гидрофоб/гидрофил

Рисунок 2.2.3.1.1.4 - Создание слоя на поверхности микрочипа снаружи и внутри микрореакторов

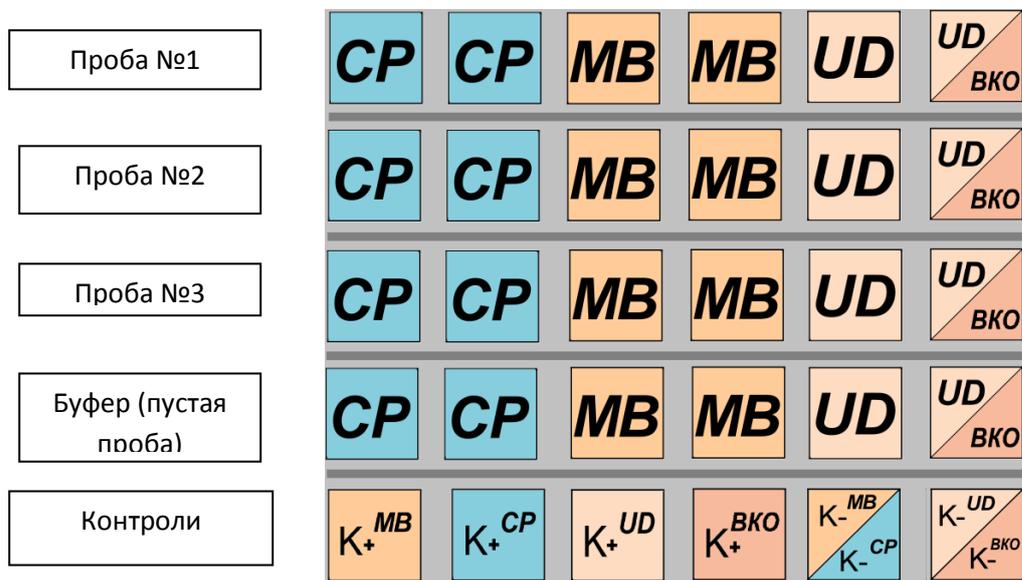


Рисунок 2.2.3.1.1.5 - Схема расположения микрореакторов на микроматрице

Тест-системы на рис. 2.2.3.1.1.5: CP — *Chlamydomonas reinhardtii*; UD — *Ureaplasma diversum*; MB — *Mycoplasma bovis*; K⁺ — положительный контрольный образец; K⁻ — отрицательный контрольный образец; ВКО — внутренний контрольный образец.

Преимуществом микрочиповой системы с лиофилизированными реактивами являлась гибкая система производства, которая обеспечивает возможность создания микроматриц с лиофилизированными тест-системами под заказ пользователя.

2.2.3.1.2 Оценка диагностических возможностей и апробация ПЦР в режиме реального времени в формате микрочипов с лиофилизированными реактивами

Выделение ДНК проводили с использованием набора «АмплиПрайм РИБО-преп», «АмплиПрайм ДНК –сорб В», «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Для экстракции ДНК из образцов отбирали 1 мл молока центрифугировали при $13000 \times g$ в течение 5 мин с последующим удалением жира и супернатанта. Оставшийся осадок ресуспендировали в 100 мкл буферного раствора.

Для экстракции ДНК из мазков, отобранных из респираторного и репродуктивного тракта крупного рогатого скота с помощью стерильных зондов с ватными тампонами с 500 мкл стерильного физиологического раствора не проводили предварительную подготовку.

Тканевой материал объемом $0,2-0,3 \text{ см}^3$ (200-300 мкл) гомогенизировали с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовили 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию отстаивали при комнатной температуре в течение 2-3 мин и 100 мкл верхней фракции использовали для экстракции ДНК.

Постановка ПЦР в реальном времени в формате микроматрицы

Перед началом постановки реакции в микроматрице убедились в ее целостности, наличии штрихкода и отсутствии трещин и сколов в реакционной зоне и на рабочей поверхности. Осмотр и вскрытие матриц проводили в боксах, перед началом работы. Матрицы без механических повреждений с четкими штрих-кодами использовали для дальнейшей работы. С микроматрицы удаляли защитные плёнки. При этом важно не допустить повреждения штрих-кодов.

После удаления защитной плёнки матрицу помещали в картридж для внесения реактивов согласно инструкции. Для предотвращения испарения реакционной смеси во время проведения ПЦР реакционную зону микроматрицы покрывали герметизирующей жидкостью в объеме 620 мкл. Такой объём

обеспечивает покрытие всей реакционной зоны ровным слоем. Следили за тем, чтобы слой герметизирующей жидкости не содержал пузырьков. Закрытая жидкостью матрица при дальнейших манипуляциях находилась строго в горизонтальном положении, чтобы избежать стекания жидкости с краёв матрицы.

В соответствии с количеством образцов, которые планировали исследовать, отбирали пробирки объёмом 0,2 мл. Дополнительно отбирали три пробирки для постановки реакции с положительным контрольным образцом, отрицательным контрольным образцом выделения и отрицательным контрольным образцом реакции ПЦР. При необходимости возможна постановка контрольных образцов других типов. В пробирки вносили по $(N \times 0,15)$ мкл буферного раствора и по $(N \times 1,35)$ мкл очищенного препарата ДНК, где N - количество реакций (микрореакторов), в которых производили анализ каждого из образцов. В случае, если имеющегося объема препарата ДНК недостаточно для приготовления рабочей смеси, допускается разбавление раствора ДНК деионизованной водой в соотношении "ДНК: деионизованная вода" не более 1:2 (v/v). Перед использованием полученные смеси тщательно перемешивали на вортексе. Образовавшиеся капли стряхивали со стенок и крышек пробирок путём центрифугирования на микроцентрифуге в течение нескольких секунд.

Подготовленные согласно приведённым указаниям смеси вносили в матрицу под слой герметизирующей жидкости. Для этого наконечник с 1,2 мкл реакционной смеси погружали на микрореактор и аккуратно выдавливали смесь на дно под герметизирующую жидкость (рис. 2.2.3.1.2.1).



Рисунок 2.2.3.1.2.1 - Микрочип с лиофилизированными в микрореакторах компонентами ПЦР-смеси

Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени на микрочиповом амплификаторе «АриаДНА»

Картридж с микрочипом помещали в термоблок амплификатора с детекцией в режиме реального времени «АриаДНА» и запускали программу амплификации (табл. 2.2.3.1.2.1).

Таблица 2.2.3.1.2.1 - Параметры термоциклирования

Этап	Температура, °С	Время, с	Кол-во циклов
1	94	120	1
2	94	5	45
	60*	30	

* — на этом этапе производится регистрация сигнала

Результаты испытания микрочипов с лиофилизированной разработанной тест-системой

Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения амплификатора. Процедуры обработки данных включали (как и в случае проведения ПЦР в реальном времени в центрифужных пробирках) стадии контроля качества прохождения ПЦР, первичной обработки данных и анализа исследуемых образцов. Эти этапы работы осуществляли по тому же принципу, что и в случае проведения реакции в пробирках и стрипах. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_t . Результат ПЦР-исследования считали достоверным, если получены адекватные результаты для положительного и отрицательного контроля (рис. 2.2.3.1.2.2).

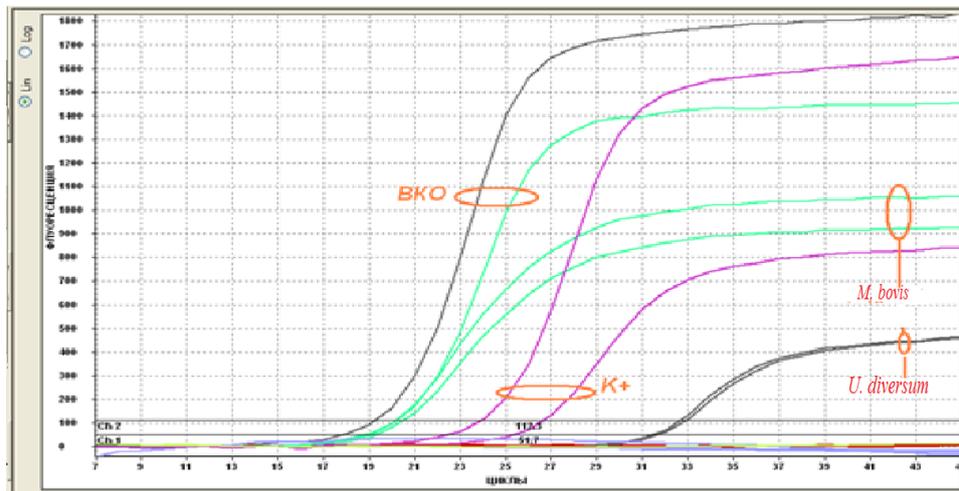


Рисунок 2.2.3.1.2.2 - Графики одновременного накопления продуктов амплификации специфического ПЦР-фрагмента *M. bovis* и *U. diversum* в ПЦР в режиме реального времени в формате микрочипов

Способ одновременной детекции микроорганизмов родов *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, изолированных от крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью микрочипа (матрицы) с лиофилизированной тест-системой.

По завершению реакции обработанные матрицы помещали в дезинфицирующий раствор и очищали картридж безворсовой салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором.

Микрочип с иммобилизованными в микрореакторах компонентами ПЦР-смеси позволяет сократить время подготовки к проведению эксперимента, упростить и ускорить процедуру анализа, а также делает возможным скрининг большого числа проб за короткое время и проведение одновременной молекулярной идентификации нескольких патогенов.

2.2.3.1.3 Методологические подходы к созданию диагностических панелей молекулярно-биологического выявления условно-патогенных микроорганизмов, изолированных от животных

Полученные нами данные позволили предложить к разработке диагностическую ПЦР-панель для комплексной детекции патогенов оппортунистических инфекций, содержащую праймеры наиболее часто встречающихся бактерий.

Способ одновременной детекции микроорганизмов рода *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydiaceae*, изолированных от крупного рогатого скота методом цепной полимеразной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью диагностической панели со стрипами при одинаковом режиме амплификации состоит в следующем.

В нашей разработке мы предлагаем использовать диагностические панели, представленные из микропробирок для ПЦР в стрипах с крышками с иммобилизованными «раскапанными» реакционными смесями для одновременного обнаружения ДНК микроорганизмов родов *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*.

Процесс экстракции ДНК проводили с использованием набора «АмплиПрайм РИБО-преп», «АмплиПрайм ДНК – сорб В», «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя. Для определения возможной контаминации на этапе выделения ДНК в каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом включают отрицательный контроль выделения (ОКО-В), который анализируют далее в ПЦР.

Вносили образцы в стрипы с реакционной смесью для исследуемых образцов, один исследуемый образец вносили в каждую пробирку стрипа (на стенку пробирки) по 10 мкл, начиная с 1-ой промаркированной пробирки.

Содержимое стрипованных пробирок кратковременно перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировали 1 мин при 3000 об-мин. на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл (рис. 2.2.3.1.3.1).

Процесс амплификации проводили в приборе для ПЦР-РВ «CFX-96». Поместили стрипы с микропробирками для ПЦР в амплификатор по заданной топологии и запустили программу амплификации (рис. 2.2.3.1.3.1).

Использовали следующие температурные параметры: 95° С-3 мин. -1цикл. Последующие 40 циклов 95 °С в течение 10 сек., 60°С-30 сек., 95 °С-10 сек.

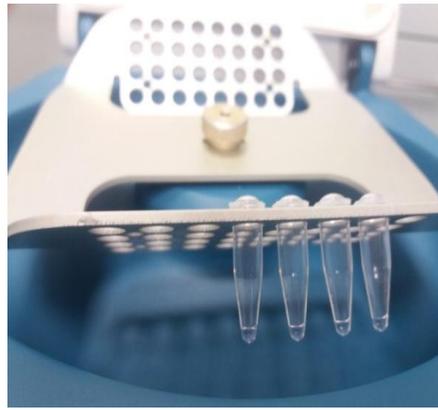


Рисунок 2.2.3.1.3.1 - Центрифуга «Циклотемп -903» со стрипованными пробирками 0,2 мл

1 ряд		2 ряд		3 ряд	
Стрипы с п *исследуемыми образцами на детекцию ДНК <i>Mycoplasma spp</i>	№1	Стрипы с п *исследуемыми образцами на детекцию ДНК <i>Ureaplasma spp.</i>	№1	Стрипы с п *исследуемыми образцами на детекцию ДНК <i>Chlamidia spp.</i>	№1
	ОКО-В		ОКО-В		ОКО-В
	№2 К-		№2 К-		№2 К-
	№3		№3		№3
	№4		№4		№4
	№5		№5		№5
	№6		№6		№6
	№7		№7		№7
№8	№8	№8			
Стрипы с контролями					
1ПКОМус		2ПКО Chl		3ПКО Ur	

Рисунок 2.2.3.1.3.2 - Порядок расположения стрипованных микропробирок в амплификаторах

Топология стрипованных микропробирок в амплификаторах: 1ПКОМус-положительный контрольный образец *Mycoplasma spp.*; 2ПКОChl-положительный контрольный образец *Chlamidia spp.*, 3ПКО Ur - положительный контрольный образец *Ureaplasma spp*, ОКО-В- отрицательный контрольный

образец выделения; К- контроль отрицательный 2этапа.; МУС- *Mycoplasma*, СНЛ- *Chlamydia*; , UR – *Ureaplasma.*, №1,2,3,4...-исследуемые образцы; n *- количество стрипованных пробирок зависит от количества исследуемых проб (рис. 2.2.3.1.3.2).

Регистрировали сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Ureaplasma spp.* (рис. 2.2.3.1.3.3).

Необходимо для молекулярного скрининга оппортунистических инфекций разрабатывать и апробировать наборы, содержащие праймеры наиболее часто встречающихся при этой нозологии бактерий (в т.ч. *S. agalactiae*, *E. coli*, *E. faecalis* и др.).

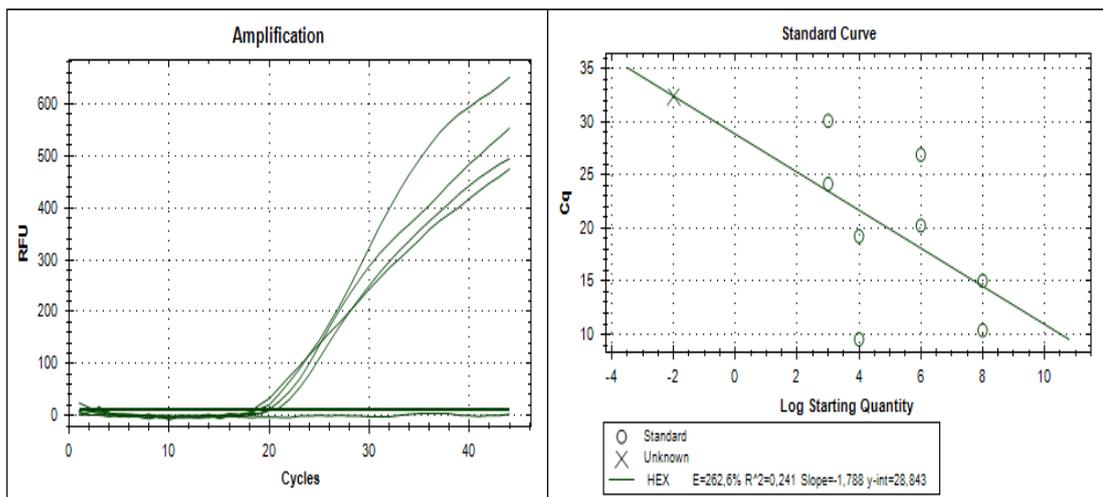


Рисунок 2.2.3.1.3.3 - Графики одновременного накопления *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Ureaplasma spp.* в ПЦР в реальном времени

В нашей разработке мы предлагаем использовать диагностические панели, представленные из микропробирок для ПЦР в стрипах с крышками с иммобилизованными (раскапанными) реакционными смесями для одновременного обнаружения ДНК микроорганизмов *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*. и других условно-патогенных энтеробактерий (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*) при едином режиме амплификации.

Процесс экстракции ДНК проводили с использованием набора ДНК-сорбент-ИДС (ООО ИДС, г. Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Процесс амплификации ДНК проводили с использованием наборов для выявления стафилококков «Стаф-ИДС» (*Staphylococcus spp.*), энтеропатогенной кишечной палочки «Коли-ИДС» (*E. coli*), стрептококков «Стреп-ИДС» (*Streptococcus spp.*), условно-патогенных энтеробактерий «Энтеробак-ИДС» (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*) (ООО ИДС, г. Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Конструирование и производство диагностических панелей с использованием микропробирок или стрипов для ПЦР позволит повысить возможности диагностических ветеринарных лабораторий по мониторингу за возбудителями репродуктивных, респираторных и маститных инфекций крупного рогатого скота

Достоинствами диагностической панели для молекулярной диагностики видового разнообразия патогенов являются высокая специфичность, чувствительность, универсальность процедуры, простота и удобство проведения анализа, автоматизация процессов, возможность выявления сразу нескольких патогенов в разных пробирках при условии наличия в реакционной смеси соответствующих праймеров и зондов. И что не маловажно – в несколько раз сокращает стоимость исследования. Поэтому данный вид ПЦР может быть доступен для массового исследования и проведения мониторинга на территории РФ.

Поместили стрипы с микропробирками для ПЦР в амплификатор по заданной топологии и запустили программу амплификации для одновременной детекции микроорганизмов (рис. 2.2.3.1.3.4).

Процесс амплификации проводили в приборе для ПЦР-РВ LightCycler 96 (Roche).

Использовали общие температурные параметры для идентификации нескольких патогенов: 95° С-5 мин -1цикл. Последующие 5 и 35 циклов 2-этапная амплификация 95 °С в течение 15 сек, 56°С-30 сек.

ПЦР-диагностика обнаруживает возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими лабораторными методами это сделать невозможно или затруднительно.

Феномен образования бактериями некультивируемых форм характерен для грамположительных и грамотрицательных бактерий. Предложенные ПЦР-панели оптимизируют микробиологическую диагностику оппортунистических инфекций коров и телят.

1 ряд		2 ряд		3 ряд	
Стрипы с п *исследуемыми образцами на детекцию ДНК <i>Staphylococcus spp</i>	№1 ОКО-В	Стрипы с п *исследуемыми образцами на детекцию ДНК <i>Streptococcus spp.</i>	№1 ОКО-В	Стрипы с п *исследуемыми образцами на детекцию ДНК <i>E. Coli</i>	№1 ОКО-В
	№2 К-		№2 К-		№2 К-
	№3		№3		№3
	№4		№4		№4
	№5		№5		№5
	№6		№6		№6
	№7		№7		№7
	№8		№8		№8
Стрипы с контролями					
1ПКО <i>Staphylococcus spp.</i>		2ПКО <i>Streptococcus spp.</i>		3ПКО <i>E. Coli</i>	

Рисунок 2.2.3.1.3.4 - Порядок расположения стрипованных микропробирок в амплификаторах

Регистрировали сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* и *E. coli* (рис. 2.2.3.1.3.5).

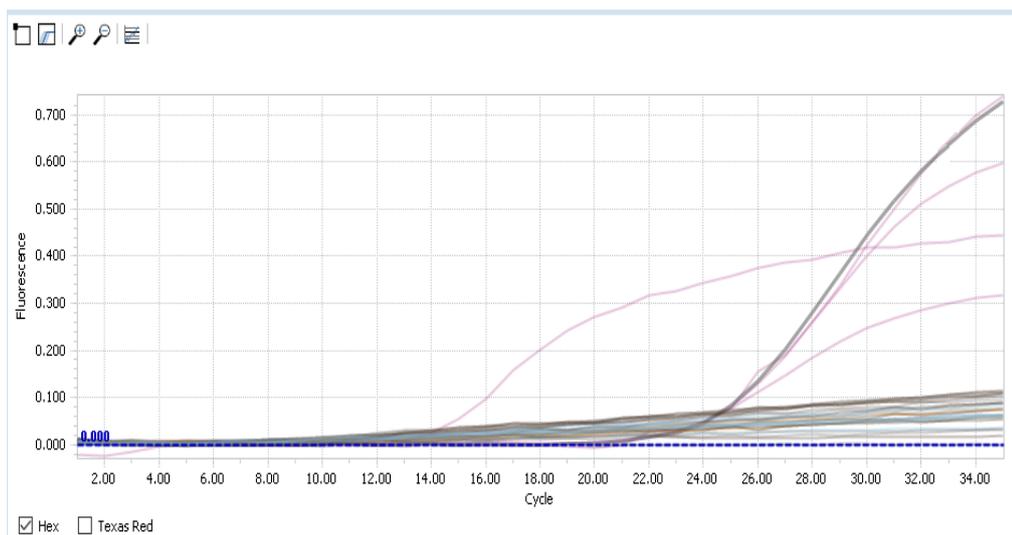


Рисунок 2.2.3.1.3.5 - Графики анализа результатов амплификации специфического участка ДНК *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* и *E. coli*. в ПЦР в реальном времени

Применение разработанной ПЦР-панели даёт возможность быстро и с высокой степенью достоверности одновременно выявлять несколько возбудителей на ранних стадиях болезни животных. Такой подход позволяет своевременно принимать меры по профилактике и лечению инфекций крупного рогатого скота и, как следствие, снижать экономический ущерб животноводческих хозяйств.

2.2.3.1.4 Метод секвенирования в структуре лабораторной диагностики бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных

2.2.3.1.4.1 Результаты применения метода секвенирования для выявления и идентификации возбудителей *Mycoplasma bovis*

Недостатки биохимической идентификации, в частности, атипичные и переменные свойства бактерий, вызывают сложности в интерпретации результатов, что обуславливает необходимость применения более точных молекулярно-генетических методов анализа. Все случаи несовпадений результатов идентификации проверяли дополнительными диагностическими тестами классической микробиологии и/или молекулярно-генетическими методами (ПЦР, секвенирование генов 16S рРНК).

В исследуемых пробах была обнаружена группа «неферментирующих» глюкозу и аргинин микоплазм, к которой относятся *Mycoplasma bovis*.

Секвенирование 16S рРНК применили как референс-метод для идентификации выделенных микроорганизмов с атипичными свойствами.

Результаты проведения молекулярно-генетических методов для обнаружения труднокультивируемых микроорганизмов рода *Mycoplasma spp.* с применением секвенирования представлены ниже.

Совершенствование эпизоотологического надзора за микоплазменной инфекцией с помощью идентификации возбудителей, циркулирующих в Северо-Западном ФО РФ возможно проводить с применением секвенирования.

Учет результатов ПЦР проводили по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной ДНК (рис. 2.2.3.1.4.1.1). Размер фрагмента генома 16S рРНК составлял 400 п.н.

Очистка ПЦР-продукта. Перед секвенированием амплифицированного фрагмента генома проводили очистку ПЦР-продукта от невключившихся праймеров и дНТФ. Для очистки отбирали 5 мкл ПЦР-продукта, добавляли 2 мкл реагента для очистки продуктов ПЦР и перемешивали пипетированием.

Полученный раствор инкубировали при температуре 37 °С в течение 15 мин. Затем встряхивали и осаждали капли кратковременным центрифугированием и снова инкубировали при температуре 80 °С в течение 15 мин.

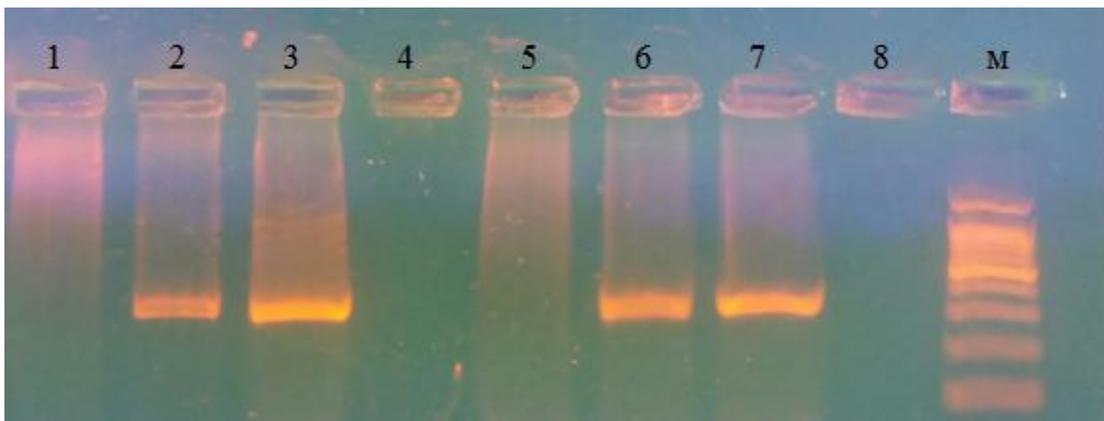


Рисунок 2.2.3.1.4.1.1 - Результаты электрофореграммы *Mycoplasma bovis* :
 М – маркер молекулярных масс, 1,5 – отрицательные клинические образцы,
 2,3,6,7- положительные клинические образцы, 4-контроль отрицательный, 8-
 отрицательный контрольный образец (ОКО)

Сиквенсовая реакция. ПЦР-продукты секвенировали с прямого и обратного ПЦР праймеров. Для проведения реакции в тонкостенные микропробирки вместимостью 0,2 см³ вносили 1 мкл очищенного ПЦР-продукта, 0,8 мкл праймера молярной концентрации 1 мкмоль/дм³, а также 1 мм³ смеси реагента для секвенирования и 2,2 мкл воды деионизованной. Общий объем реакционной смеси должен быть 5 мкл.

Термоциклирование проводили с помощью набора Big Dye® Terminator v1.1.Cycle Sequencing Kit.: начальная денатурация – 1 мин при температуре 96 °С, затем 25 циклов: денатурация 96 °С – 10 с, отжиг праймера – 5 с, элонгация при 60°С – 4 мин. Отжиг для всех использованных в работе праймеров в реакции секвенирования оптимизирован для 55 °С.

Полученные после амплификации продукты секвенирования - реакционную смесь объемом 5 мкл - использовали для дальнейшего испытания.

Очистка реакционной смеси после секвенирования. Проводили очистку реакционной смеси от избытка дНТФ, флуоресцентно-меченных ддНТФ, секвенирующего праймера и солей осаждением полинуклеотидов изопропиловым спиртом. Для этого к реакционной смеси объемом 5 мкл в микропробирке добавляли 30 мкл 75 %-го изопропилового спирта и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре.

Затем микропробирки с полученной смесью центрифугировали при 13000 об/мин в течение 20 мин и удаляли надосадочную жидкость.

К полученному осадку добавляли 100 мкл 75 %-ного изопропилового спирта, центрифугировали при 13000 об/мин в течение двух минут и удаляли надосадочную жидкость.

Высушивали полученный осадок в термостате при температуре 65 °С в течение 10-15 мин и растворяли в 20 мкл формамида высокой степени очистки Hi-Di™ Formamide

Полученные анализируемые пробы в формамиде переносили в 96-луночный планшет, закрывали уплотнителем и подвергали тепловой денатурации при

температуре 95 °С в течение 3 мин, а затем при температуре 4 °С – в течение 3 мин.

Определение нуклеотидной последовательности методом капиллярного электрофореза. Для секвенирования ДНК по методу Сэнгера использовали автоматический Генетический анализатор ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США), позволяющий надежно определять последовательность длиной до 700-800 пар нуклеотидов в одном прочтении. Все этапы исследования и интерпретация результатов выполняли в соответствии с инструкцией производителя генетического анализатора.

Подготовленные анализируемые пробы, содержащие продукты секвенирования, разделяли методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции.

Программное обеспечение генетического анализатора автоматически анализирует полученные сигналы (хроматограммы), оценивает качество прочтения (QV) и определяет последовательность нуклеотидов. Результатом анализа является расшифрованная последовательность нуклеотидов, приведенная над пиками хроматограммы в формате *abi* файла.

Корректность чтения нуклеотидов проверяли дополнительно вручную в целях исключения ошибки автоматического анализа. Удаляли плохо читаемые из-за всплесков фона нуклеотиды в начале хроматограммы и область обратного праймера на конце секвенируемого ПЦР-продукта.

Полученные последовательности выравнивали с использованием программы AlignX из пакета Vector NTI Suite 6.0 и анализировали с помощью программы MEGA 4.

Нами исследованы клинические образцы, выделенные от животных в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ. В результате работы были подобраны праймеры на область 16 s рНК *M_bovis* (for CGAAGG CAGСТААСТGGGCАТАС; rev TCGGGCAGTCTCCTTAGAGTG) и оптимизированы условия их термоциклирования для реакции ПЦР.

По результатам секвенирования нами сделано заключение, что полученные последовательности принадлежат микроорганизму *Mycoplasma bovis*. Данные изоляты относятся к циркулирующим в хозяйствах *Mycoplasma bovis* (рис. 2.2.3.1.4.1.2).

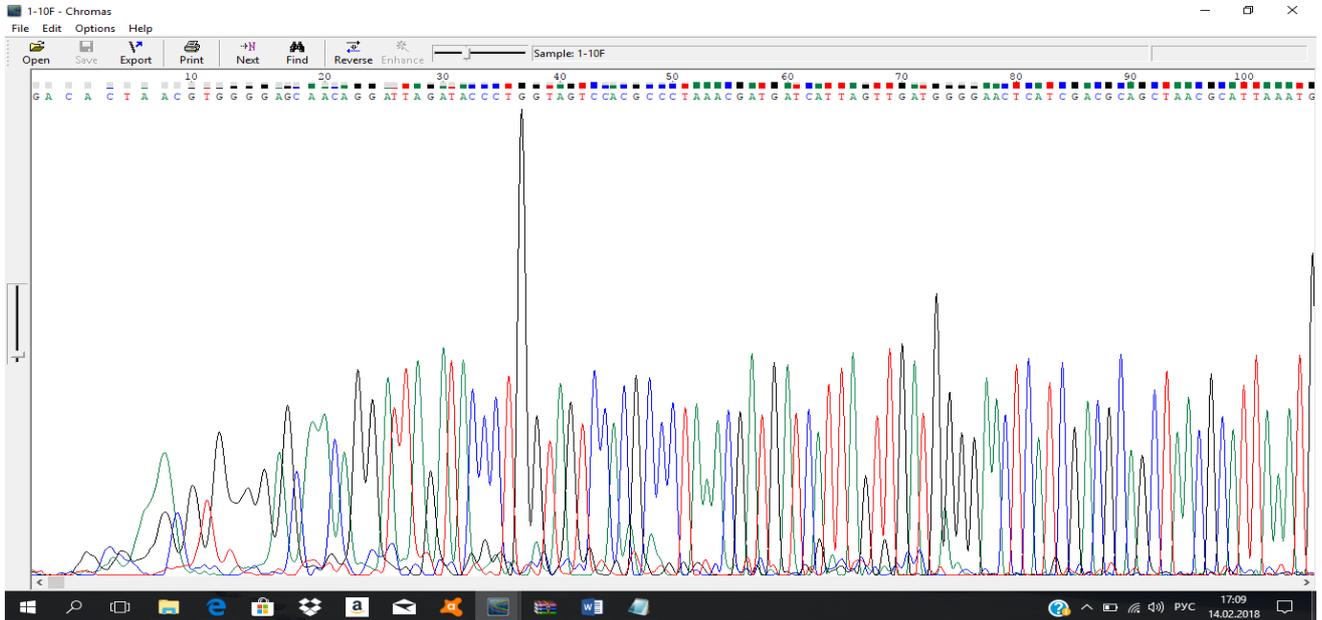


Рисунок 2.2.3.1.4.1.2 - Фрагмент хроматограммы при идентификации *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis идентифицирована секвенированием и уровень гомологии составил 100%, что подтверждает правильность выбранных нами последовательностей.

2.2.3.1.4.2 Результат филогенетического анализа при молекулярно-генетическом исследовании бактерий *Mycoplasma bovis*

В большинстве случаев все нуклеотидные последовательности, полученные для образцов из одного хозяйства в одно время, совпадали между собой. Гомология нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по каждому из трех фрагментов генома составила 98,9-100%.

Для поиска гомологичных последовательностей в базах данных NCBI использовали алгоритм *BLAST* на поисковом интернет-ресурсе www.ncbi.nlm.nih.gov. Отчет о поиске представляется в виде списка последовательностей, с которыми полученная в результате испытания нуклеотидная последовательность имеет наибольшую гомологию (рис. 2.2.3.1.4.2.1).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mycoplasma bovis isolate JF4278 genome assembly_chromosome_1	684	1369	96%	0.0	100%	LT578453.1
Mycoplasma bovis strain Ninxia-1 chromosome_complete genome	684	1364	96%	0.0	100%	CP023663.1
Mycoplasma bovis clone CL4 16S ribosomal RNA gene_partial sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX649989.1
Mycoplasma bovis strain 08M_complete genome	684	1364	96%	0.0	100%	CP019639.1
Mycoplasma bovis strain MYC84 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462436.1
Mycoplasma bovis strain MYC83 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462435.1
Mycoplasma bovis strain MYC81 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462433.1
Mycoplasma bovis strain MYC80 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462432.1
Mycoplasma bovis strain MYC79 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462431.1
Mycoplasma bovis strain MYC78 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462430.1
Mycoplasma bovis strain MYC77 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462429.1
Mycoplasma bovis strain MYC76 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462428.1
Mycoplasma bovis strain MYC75 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462427.1
Mycoplasma bovis strain MYC74 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462426.1
Mycoplasma bovis strain MYC73 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462425.1
Mycoplasma bovis strain MYC72 16S ribosomal RNA (rrf4) gene_complete sequence	684	684	96%	0.0	100%	KX462424.1

Рисунок 2.2.3.1.4.2.1 - Форма отчета BLAST поиска

В результате работы были подобраны специфические праймеры на область 16 S рНК *Mycoplasma bovis*, оптимизированы условия их термоденатурации для реакции ПЦР.

Проведен филогенетический анализ полученных последовательностей (рис. 2.2.3.1.4.2.2).

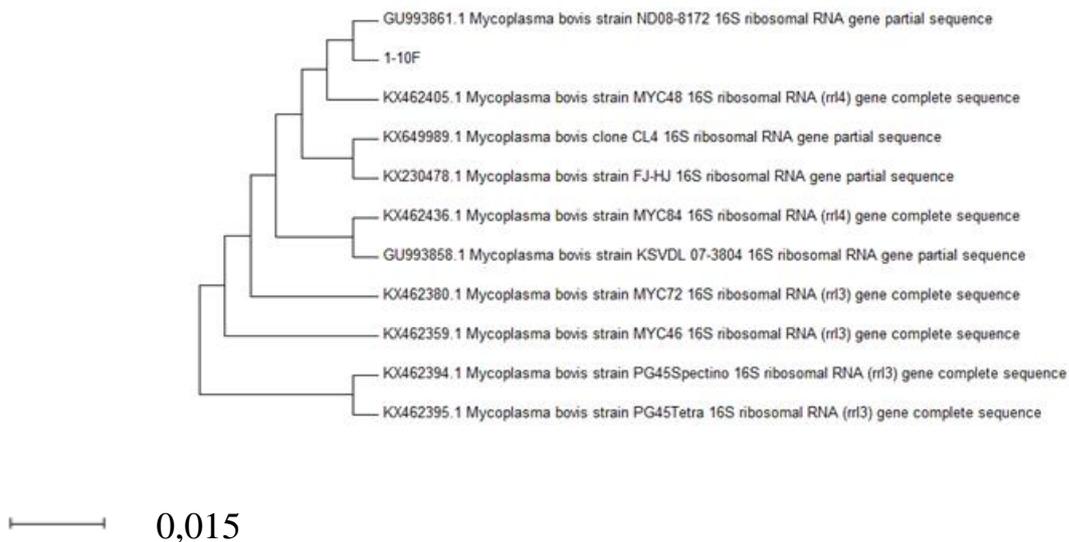


Рисунок 2.2.3.1.4.2.2 - Филогенетический анализ *Mycoplasma bovis* микоплазменной инфекции крупного рогатого скота

По результатам секвенирования нами сделано заключение, что полученные последовательности принадлежат микроорганизму *Mycoplasma bovis*. Данные изоляты относятся к циркулирующим в хозяйствах СЗ ФО РФ микроорганизмов *Mycoplasma bovis*.

2.2.3.1.5 Дифференцированный подход и рациональное применение молекулярно-генетических методов

Все случаи несовпадений результатов идентификации проверяли дополнительными диагностическими тестами классической микробиологии и/или молекулярно-генетическим методом (ПЦР, секвенирование генов 16S рРНК).

В лабораторной практике использовали наборы реагентов (тест-системы) для обнаружения *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Campylobacter spp.* в чистой культуре и/или клиническом материале от разных видов животных с применением ПЦР с электрофоретической детекцией и в режиме реального времени (производства ФБУН «Центральным НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО Биофракта, ООО «ВЕТ ФАКТОР», Thermo SCIENTIFIC, компания «ИДС» и др.), которые активно использовали как в диагностических целях, так и в эпизоотологических исследованиях.

Система "Уреаплазмоз (*Ureaplasma sp.*)" ООО "Фракта Био" (Россия) не позволяла проводить видовую идентификацию возбудителей. В связи с этим, остаётся востребованным создание тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, которая обладала бы высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, была бы совместима с оборудованием для ПЦР в реальном времени различных моделей и позволяла бы осуществлять видовую идентификацию как *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis*, *Campylobacter fetus*, так и других приоритетных микроорганизмов.

Комерческие наборы для выявления стафилококков «Стаф-ИДС» (*Staphylococcus spp.*), энтеропатогенной кишечной палочки «Коли-ИДС» (*E. coli*), стрептококков «Стреп-ИДС» (*Streptococcus spp.*), условно-патогенных энтеробактерий «Энтеробак-ИДС» (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*) и др. производства «Инновационные диагностические системы» («ИДС», Россия),

использовали для скрининговых исследований биологического материала, полученного от животных.

Для экстракции ДНК из образцов отбирали 1 мл молока, центрифугировали при $13000 \times g$ в течение 5 мин с последующим удалением жира и супернатанта. Оставшийся осадок ресуспендировали в 100 мкл буферного раствора.

Процесс экстракции ДНК затем продолжали с использованием набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Для выделения ДНК использовали наборы, предназначенные для работы с клиническим материалом, например «ДНК-сорб-Б», «ФБиоНуклео» (ООО Фрактал Био, Россия). При использовании наборов, предполагающих сорбцию ДНК на магнитных частицах типа «М-сорб» (ООО Синтол, Россия), необходимо наличие магнитных штативов для пробирок-эппендорф.

ПЦР анализ для выявления и молекулярной идентификации основных микоплазменных возбудителей мастита, например *Mycoplasma bovis*, проводили с применением микроматрицы с лиофилизированными тест-системами с последующей амплификацией нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА» (ГК Люмэкс, Санкт-Петербург).

ПЦР анализ для индикации *Mycoplasma spp.* проводили с применением тест-системы «МИК-КОМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Оптимизацию бактериологической диагностики проводили с применением молекулярно-биологических методов (ПЦР в формате микрочипов с лиофилизированными тест-системами, секвенированием) для идентификации микоплазм.

Результаты, полученные с помощью бактериологической методики (при простом осмотре посевов), проверяли посредством проведения ПЦР. Дополнение бактериологического метода с сомнительным результатом роста (+/-) избирательным ПЦР-анализом формировали комплексный метод, объединяющий бактериологические и молекулярно-генетические методы.

В ходе работы применили полимеразную цепную реакцию (ПЦР): ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации с использованием тест систем (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), а также ПЦР в режиме реального времени и ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами (ГК Люмэкс, Санкт-Петербург).

Для идентификации *Mycoplasma spp.* проводили постановку ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Выделение ДНК из отобранных образцов проводили с использованием оптимизированного коммерческого набора «РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией к данному набору. Для процесса амплификации ПЦР с электрофоретической детекцией использовали прибор «Терцик» производства ООО «ДНК Технология» (Москва). Для проведения электрофоретической детекции использовали камеру для электрофоретических разделений ПЦР-продуктов в агарозном геле.

В исследуемых пробах была обнаружена группа «неферментирующих» глюкозу и аргинин микоплазм, к которой относятся *Mycoplasma bovis*.

Нами были упрощены методы работы с труднокультивируемыми микроорганизмами (кампилобактериями, микоплазмами и другими): адаптировали их к современным условиям, чтобы сделать более доступным бактериологическое исследование образцов от животных на наличие микоплазм. Представлен усреднённый результат проб для обоих методов, поскольку было получено равное количество положительных и отрицательных результатов (табл. 2.2.3.1.5.1).

Однако в целом, за исключением однозначно положительных проб результаты бактериологического исследования мазков и результаты изучения смывов методом ПЦР не всегда соответствуют друг другу. Кроме того, результаты обнаруживая микоплазм в одном и том же анатомическом месте одного и того же животного чередуются. Вероятно, это объясняется тем, что внутриклеточный возбудитель, находящийся внутри клеток, слизи, наличием очень небольшого количества микоплазм, находящихся на границе чувствительности обоих методов.

Таблица 2.2.3.1.5.1 - Результаты исследования клинических образцов, изолированных от крупного рогатого скота

N п.п	Вид биологического материала	Бактериологический посев		ПЦР биологического материала
		Осмотр посевов на <i>M.bovis</i>	ПЦР культурами <i>M.bovis</i>	
Коровы с репродуктивными патологиями				
1.	Маститное молоко	-	-	+/-
2.	Молоко от клинически здоровой коровы	-	-	-
3.	Абортированный плод	+/-	+/-	+/-
4.	Смывы из влагалища	-	-	+/-

Примечание : «+» обнаружен, «-» не обнаружен микроорганизм

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что чувствительность бактериологического метода при исследовании патологического материала соизмерима с чувствительностью ПЦР.

При бактериологическом исследовании клинического материала на наличие *M.bovis* (маститное молоко, смывы и мазки влагалища, респираторного тракта) были затруднения с получением чистой культуры в связи с контаминацией разнообразной микрофлорой, наличием некультивируемых форм возбудителя.

Полученные результаты свидетельствуют, о том что для атипичных форм микроорганизмов оптимальным подходом к идентификации является полифазный анализ. Необходимо комбинировать высокочувствительные методы – бактериологические и молекулярно-генетические (ПЦР, секвенирование), дополнив их друг другом.

Бактериологические исследования позволяют оценить жизнеспособность микоплазм, что важно для контроля лечения животных, а с возможности ПЦР этого не предполагают. Микоплазмы имеют тесный контакт с клетками, вероятнее всего, даже погибнув, они будут оставаться в клетках эпителия, и, соответственно детектироваться посредством ПЦР до слущивания и замены на свежий эпителий в течение нескольких недель. Но при отсутствии жизнеспособных микоплазм продолжать лечение антибиотиками в этот период бессмысленно.

Для видовой идентификации использовали ПЦР в реальном времени с набором микрочипов с лиофилизированными тест-системами. Для проведения амплификации применяли микрочиповый ПЦР–РВ амплификатор «АриаДНА», разработанный ГК «Люмэкс», Санкт-Петербург. Гибкая система производства обеспечивает возможность создания чипов под заказ пользователя. По окончании ПЦР-анализа происходит автоматическая генерация отчетов с информацией о наличии или отсутствии искомых возбудителей.

Для видовой идентификации амплифицировали нуклеотидную последовательность 16S рРНК методом рутинной ПЦР, используя праймеры *M_bovis* (for CGAAGG CAGCTAACTGGGCATAC; rev TCGGGCAGTCTCCTTAGAGTG) при следующих температурно-временных режимах: начальная денатурация – 1 мин при температуре 96°C, затем 25 циклов: денатурация 96°C – 10 с, отжиг праймера – 5 с, элонгация при 60°C – 4 мин. Отжиг для всех использованных в работе праймеров в реакции секвенирования оптимизирован для 55°C. Снятые с агарозного геля амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали по методу Сэнгера. Сравнительный компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы «BLAST».

Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Результат считали достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации (рис. 2.2.3.1.5.1).

Анализируя график регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени на микрочипе, содержащем лиофилизированные тест-системы видно, что исследуемые пробы содержат генетический материал *Mycoplasma bovis*.

Использование классического бактериологического метода диагностики урогенитальных инфекций животных (микоплазмоза, уреоплазмоза и кампилобактериоза и др.) ограничено из-за трудности культивирования.

Идентификация микроорганизмов с атипичными биологическими свойствами затруднена или невозможна при использовании традиционных

бактериологических методов исследования.

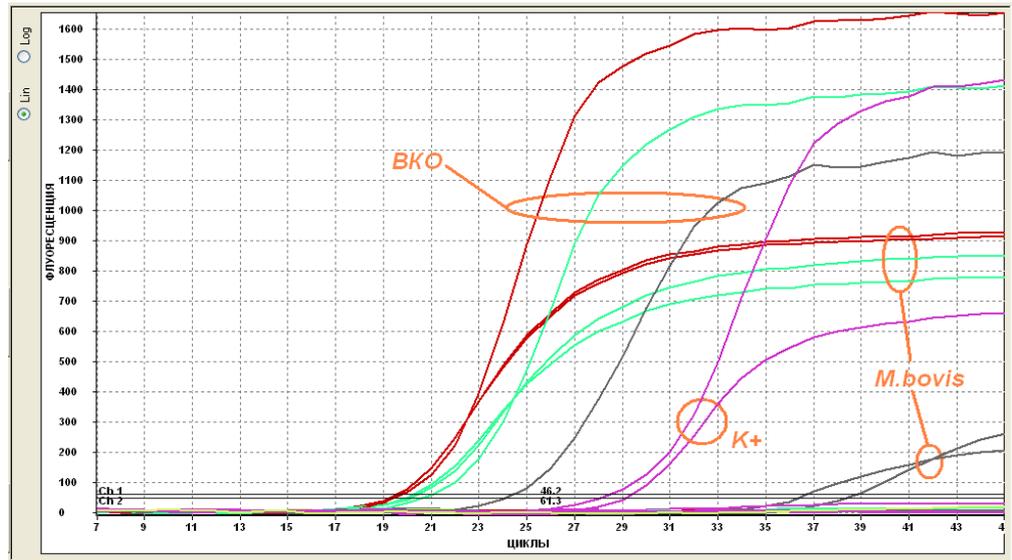


Рисунок 2.2.3.1.5.1 - График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени на микрочипе, содержащем лиофилизированные тест-системы

Внедрение в лабораторную практику молекулярных методов исследований для идентификации возбудителей и быстрое получение результатов анализа позволяет в короткие сроки принимать решения по схеме лечения животных, а точная идентификация патогенных микроорганизмов сокращает спектр используемых антибиотиков, что поддерживает продуктивность на высоком уровне и, в итоге, повышает качество пищевых продуктов, получаемых от животных.

Нами разработан диагностический алгоритм лабораторного обследования животных с применением современных методов диагностики оппортунистической инфекций с учетом атипичных, некультивируемых и латентных возбудителей.

Проведенные исследования дают основание считать, что молекулярно-генетические методы открывают качественно новый этап в микробиологических исследованиях, заметно потеснив биохимические методы. Внедрение их в практику ветеринарных лабораторий позволяет объективизировать диагностические процессы, ускорить, удешевить видовую идентификацию многих микроорганизмов, упростить диагностику оппортунистических инфекций, а также дает возможность оперативно проводить штаммовое типирование УПМ,

что имеет первостепенное значение в системе микробиологического мониторинга по профилактике формирования эпизоотических вариантов клинических изолятов в животноводческих хозяйствах.

Сочетание классических традиционных бактериологических подходов с молекулярно-биологическими технологиями - основная концепция наших исследований.

Оптимизацию бактериологического метода диагностики кампилобактериоза проводили с применением молекулярно-биологического метода. Бактериологическим методом в некоторых случаях в связи со сложностями культивирования возбудителя и его идентификацией проводили родовую индикацию кампилобактерий и оценку их жизнеспособности.

Молекулярную идентификацию генетического материала кампилобактерий, изолированных из биоматериала от крупного рогатого скота, проводили с применением коммерческой тест-системы для ПЦР-диагностики микроорганизмов *Campylobacter spp.*, *Campylobacter jejuni* производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва) с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле или ПЦР в режиме реального времени.

Молекулярную видовую идентификацию ДНК *Campylobacter fetus* проводили с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (PCR Real-time) на микрочипах.

Для экстракции ДНК из образцов влажной слизи предварительную пробоподготовку не проводили. Чистую культуру кампилобактерий разводили в 0,5-1,0 мл физиологического раствора, осаждали на микроцентрифуге при 11-12 тыс. об/мин в течение 5-10 мин, а осадок использовали для экстракции ДНК.

Процесс экстракции ДНК затем продолжали с использованием набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Смесь с исследуемой ДНК вводили в микрореакторы в объеме 1,2 мкл под слой герметизирующей жидкости. Аналогично в микрореакторы с контролями К+

и К– вводили смесь для контрольных образцов. Для проведения амплификации применяли микрочиповый ПЦР–РВ амплификатор «АриаДНА», разработанный группой компаний «Люмэкс» (Санкт-Петербург). Амплификатор «АриаДНА» осуществлял полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени с использованием двухканального флуоресцентного детектора.

При исследовании образцов на присутствие ДНК *Campylobacter spp.* положительный результат был получен для 78,3% случаев выделения. Поскольку основным возбудителем урогенитального кампилобактериоза считается *C. fetus*, а также есть информация о влиянии некоторых возбудителей *C. jejuni* на фертильность крупного рогатого скота, было проведено дополнительное исследование образцов на наличие ДНК *C. fetus* и *C. jejuni*.

Фрагменты генома ДНК *C. jejuni* была обнаружена в 11,7% образцов. Возможно, присутствие ДНК *C. jejuni* является следствием контаминации образцов при отборе клинического материала. При молекулярном исследовании материала с использованием микрочипового амплификатора одновременно выделили и идентифицировали репродуктивных бактериальных патогенов таких, как *Campylobacter fetus* (7,0%).

Для повышения процента обнаружения *Campylobacter fetus* необходимо проводить молекулярную идентификацию до подвида *Campylobacter fetus subspecies fetus* и *Campylobacter fetus subspecies venerealis*.

Полученное разнообразие видов труднокультивируемых микроорганизмов подчёркивает ценность метода секвенирования при видовой идентификации этой группы микроорганизмов.

Молекулярно-генетический метод позволяет идентифицировать коринебактерии, расширяет наше представление о их видовом разнообразии, выделенных от животных и дает основание для изучения их возможной роли в развитии патологических процессов.

Идентификацию видов чистой культуры *Corynebacter spp.* их биоразнообразии *Corynebacterium freneyi*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium testudinoris*, *Corynebacterium hominis* установлена молекулярно-

генетическим методом при секвенировании генов 16S рРНК/ (ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ»). Видовой состав идентифицированных изолятов: *Corynebacterium amycolatum* - 6 (30,0%), *Corynebacterium freneyi* – 6 (30,0%), *Corynebacterium glutamicum* – 3 (15,0%), *Corynebacterium hominis* – 3 (15,0%), *Corynebacterium testudinoris* - 2 (10,0%).

Бактериологический и молекулярно-биологический методы дополняют друг друга, что обуславливает необходимость их одновременного применения для диагностики маститов (полифазный лабораторный анализ) и формирования схемы лечебно-профилактических мероприятий (рис. 2.2.3.1.5.2).



Рисунок 2.2.3.1.5.2 - Схема оптимизации лабораторной диагностики бактериальных инфекций животных, ассоциированных с атипичными микроорганизмами

2.2.4 Результаты мониторинга возбудителей бактериальных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ

2.2.4.1 Спектр микроорганизмов органов репродукции крупного рогатого скота

Строение репродуктивных органов у коров не исключает возможности проникновения в матку оппортунистических микроорганизмов и грибов во время родов и в послеродовой период. Благоприятные условия для этого создаются после осложненных, затяжных родов, особенно сопровождающихся задержанием последа и субинволюции матки, несбалансированного кормления. В связи с этим актуально изучение микробного пейзажа влагалища у коров на 2-3 сутки особенно после патологических родов, у которых в последующем развился острый катарально-гнойный эндометрит.

По результатам исследований из 220 образцов, взятых у коров при инфекциях репродуктивного тракта наиболее часто бактериологическими методами выделялись условно-патогенные микроорганизмы. Получено 220 изолятов: *Escherichia coli* (в 23,6% случаев, n=52), *Klebsiella pneumoniae* (18,2 %, n=40), *Proteus spp.* (13,6%, n=30), *Campylobacter fetus* (10,9%, n=24), *Pseudomonas aeruginosa* (9,0 %, n=20), *Staphylococcus spp.*(12,0 %, n=22) и *Streptococcus spp.* (*S.uberis*) (3,6%, n=8), *Bacillus spp.*(3,6%, n=8), *Serratia spp.* (2,7%, n=6), *Actinomycetes spp.* (4,5%, n=10) (рис. 2.2.4.1.1).

Чистая культура возбудителя кампилобактериоза *Campylobacter fetus* трудно выделяется из смешанной культуры. Антагонистические отношения между возбудителем кампилобактериоза и другими бактериями (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) снижали процент обнаружения *Campylobacter fetus* в исследуемом материале.

При молекулярном исследовании клинического материала от коров с признаками вульвовагинита и нарушениями репродуктивной функции выделяли и идентифицировали урогенитальных патогенов *Mycoplasma bovis* , *Ureaplasma diversum* , *Campylobacter fetus*, *Chlamydophila pecorum*.

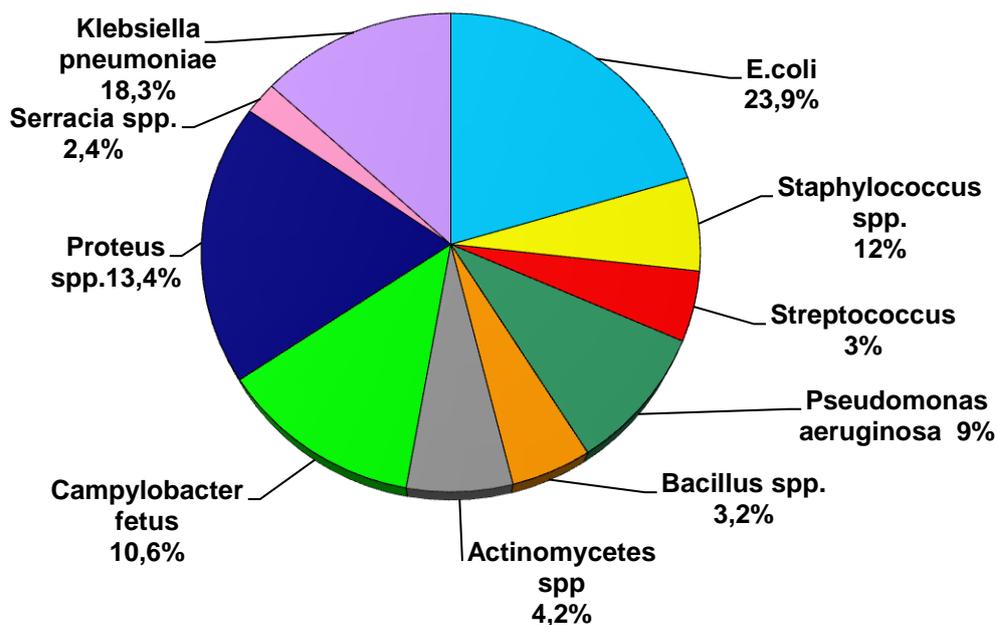


Рисунок 2.2.4.1.1 - Видовой и процентный состав микроорганизмов, выделенных от коров с нарушением репродуктивной функции, бактериологическим методом

Результаты исследования показали, что у коров после патологических родов на 2-3 сутки матка контаминирована УПМ, которые изолированы нами из влагалища в форме ассоциаций, что явилось одним из этиологических факторов.

При исследовании проб от животных в хозяйствах Ленинградской области и Псковской области с помощью полимеразной цепной реакции нам удалось установить сложную этиологическую структуру репродуктивных инфекций крупного рогатого скота.

В результате проведенных исследований в 70% проб нами выявлены различные варианты ассоциаций микроорганизмов. В 55,3 % случаев обнаруживали ДНК *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*, *Chlamydia pecorum*. *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis*, *Chlamydia pecorum* и в 10,0% *Campylobacter fetus* (рис. 2.2.4.1.2).

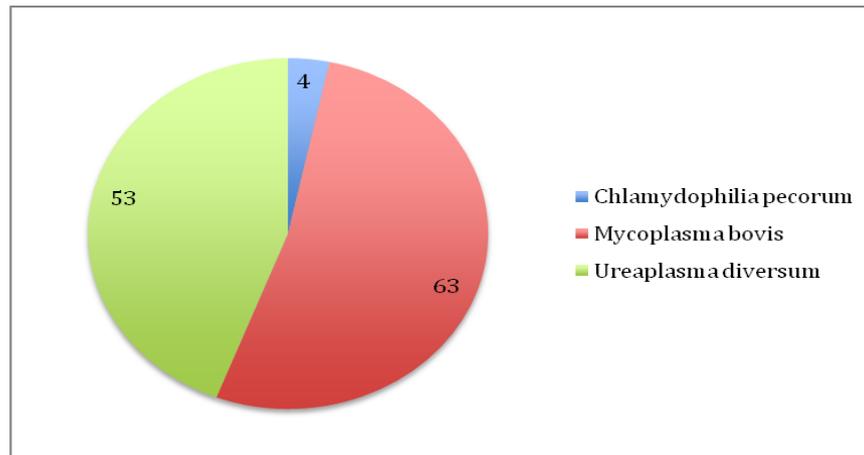


Рисунок рис. 2.2.4.1.2 - Спектр возбудителей урогенитальных инфекций в положительных пробах биоматериала в ПЦР у крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах

Невысокий процент обнаружения микроорганизмов *Campylobacter fetus* (7,0 %) и *Chlamydia pecorum* (2,0 %) возможно обусловлен высокой генетической вариабельностью возбудителей (рис. 2.2.4.1.3).

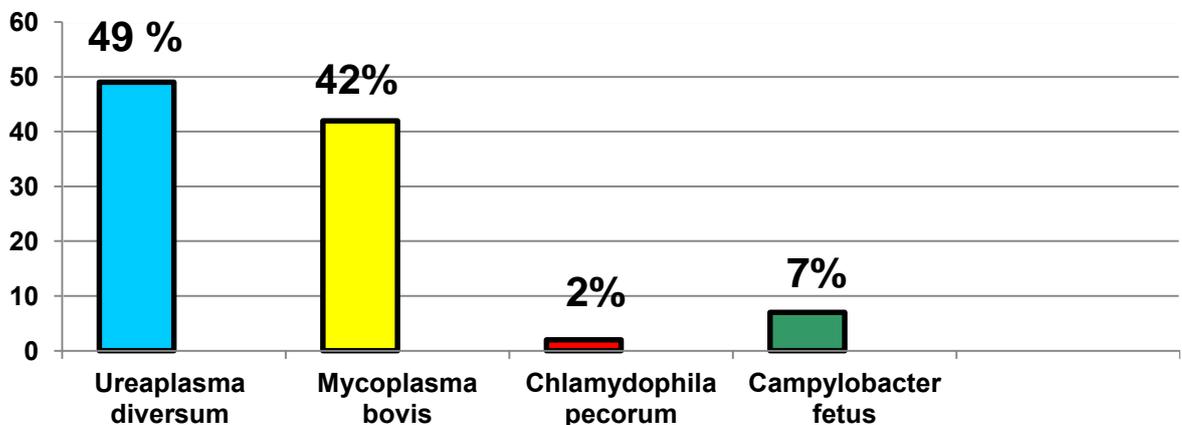


Рисунок 2.2.4.1.3 - Видовой и процентный состав микроорганизмов, выделенных из влагалищной слизи коров молекулярно-генетическим методом в хозяйствах

В хозяйствах Северо-Западного ФО РФ (Псковской, Ленинградской областях) при исследовании на урогенитальные инфекции 726 проб влагалищной слизи от абортировавших коров методом ПЦР в микрочиповом формате получено 360 положительно реагирующих проб, что составляет 50% от числа

исследованных. Из них в 57 пробах определяли несколько возбудителей (*Chlamydophila pecorum*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*). При молекулярном исследовании материала от коров с признаками вульвовагинита и нарушениями репродуктивной функции с использованием микрочипового амплификатора одновременно выделили и идентифицировали *M. bovis* (153)-42,0%, *U. diversum* (177)-49,0%, *C.fetus* (24)-7,0%, *C. pecorum* -2,0% (рис. 2.2.4.1.2).

Проведенный анализ результатов ПЦР-исследований показал высокую частоту встречаемости микроорганизмов рода *Mycoplasma* -91,0%, из них *Mycoplasma bovis* в клинических образцах - 42,0% случаев, *U. diversum* - 49,0% в зависимости от хозяйства (табл. 2.2.4.1.1).

Таблица 2.2.4.1.1 - Спектр микроорганизмов, выделенный при молекулярно-биологическом мониторинге коров в молочном комплексе Северо-Западного ФО РФ

Вид материала	Выделенные урогенитальные микроорганизмы
Мазки из влагалища коров, больных маститом и вульвовагинитом	<i>Mycoplasma spp.</i> 91% : <i>M. bovis</i> -42% <i>U. diversum</i> .-49%; <i>C.fetus</i> -7%, <i>Chlamydophila pecorum</i> 2%, из них смешанных -16%

Среди бактериальных агентов при эндометритах, вульвовагинитах и из абортированных плодов чаще всего выявляли микроорганизмов рода *Mycoplasma* (91,0%).

Оценивали и проводили анализ эпизоотической ситуации, используя данные полученные при лабораторном исследовании проб из хозяйств Волосовского района Ленинградской области: Ушевицы, Остроговицы, Ударник, Рабитицы, Торосово, Труд, Ленинский путь, Сельцо, Каложицы, Сумино и в частном секторе (рис. 2.2.4.1.4).

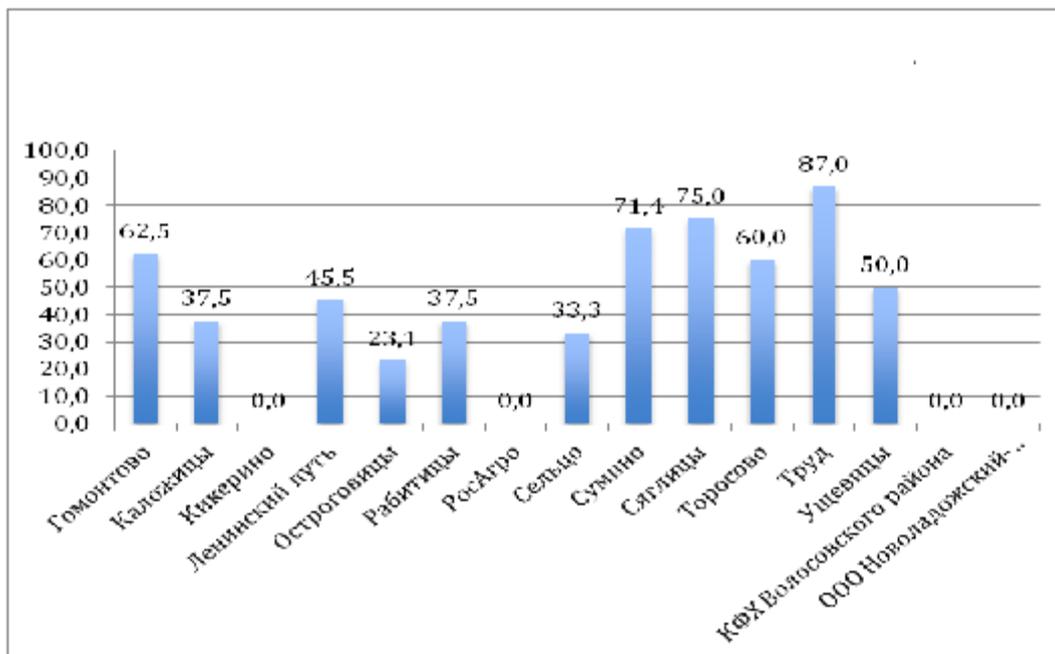


Рисунок 2.2.4.1.4 - Процент положительных проб с *Mycoplasma bovis*

Анализ лабораторных данных показал, что в развитии оппортунистических инфекций КРС существенную роль играют ассоциации условно - патогенных бактерий.

Результаты наших исследований продемонстрировали при мониторинге за структурой микробной экологии в хозяйстве, что она не претерпела кардинальных изменений, несмотря на проводимые мероприятия по лечению животных АМП, дезинфекции животноводческих помещений и оборудования.

В результате проведенных исследований определена структура микробной экологии оппортунистических инфекций животных в животноводческих комплексах, установлен видовой спектр и структура приоритетных патогенов как основа формирования микроэкологической системы.

Динамика изменений видового состава и патогенного потенциала выделенных в хозяйствах микроорганизмов, свидетельствует о существовании устойчивого патологического микробиоценоза.

Учитывая благополучие региона по особо опасным болезням и особое внимание, уделяемое оздоровлению стад от лейкоза, в настоящее время особое

значение приобретают ассоциированные болезни крупного рогатого скота, связанные с иммуносупрессивным действием на организм, таких как вирусная диарея - болезни слизистых оболочек и инфекционный ринотрахеит.

Сочетание классических традиционных бактериологических подходов с молекулярно-биологическими технологиями - основная концепция наших исследований.

2.2.4.2 Особенности этиологии инфекционно-воспалительных болезней (ИВБ) у телят

С целью изучения УПМ в этиологии ИВБ у телят, а также для оценки бактериологических методов диагностики, проведено комплексное обследование 128 телят, идентифицировано 356 изолятов УПМ.

Выявлены приоритетные группы УПМ, циркулирующих среди животных разных (n=7) животноводческих комплексов (рис. 2.2.4.2.1).

УПМ в 73,0% обнаруживали у телят. Всего выделено и протестировано на чувствительность к АМП 356 изолятов. Различные варианты ассоциаций микроорганизмов в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ выявлены в 70% проб.

С целью изучения особенностей колонизации слизистых оболочек (ЖКТ и респираторного тракта) телят идентифицировано и протестировано на чувствительность к АМП 356 изолятов УПМ. Из них выделено и идентифицировано 178 культур бактерий: *Escherichia coli* (27, 5%, n=98), *K. pneumoniae* (7,3%, n= 64), *Proteus spp.* (13,5%, n=48), *Pseudomonas aeruginosa* (10,1 %, n= 36), *Streptococcus spp.* (5,05%, n=18) (табл. 2.2.4.2.1).

Чаще всего в животноводческих хозяйствах выделяли *Staphylococcus spp.* (33,23 %).

Среди возбудителей *Staphylococcus spp.* доминировали *CoNS*, в 72,0% случаев выделения и *Staphylococcus aureus* в 28,0% случаев выделения (рис. 2.2.4.2.2).

Видовой состав *CoNS* представлен 6 видами, с преобладанием в животноводческих комплексах трех видов: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и *S. chromogenes* (рис. 2.2.4.2.3).

Таблица 2.2.4.2.1 - Спектр микроорганизмов, выделенных у телят на животноводческих комплексах Северо-Западного ФО РФ

Вид материала	Исследуемые микроорганизмы	
	ПЦР-метод	Бактериологический метод
Мазки из носовой полости телят с болезнями респираторных органов	<i>Mycoplasma bovis</i> <i>Ureaplasma diversum</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae spp. pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> CoNS <i>Streptococcus spp.</i>
Ректальные мазки от телят с гастроэнтеритами	-	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Providencia rettgeri</i>
Мазки из носовой полости клинически здоровых телят	<i>Ureaplasma diversum</i> <i>Mycoplasma spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

Широкое распространение оппортунистических инфекций, вызываемых CoNS, делает актуальной проблему терапии животных. Сложности лечения животных с указанными инфекциями связаны с высокой частотой распространения среди CoNS устойчивости к большинству β -лактамовых антибиотиков, а также ассоциированной устойчивости к антибиотикам других групп.

Другой группой бактерий по частоте выделения у телят с респираторными и желудочно-кишечными патологиями оказались представители семейства *Enterobacteriaceae* (50,0%). Нами выделено 7 родов бактерий: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*. Преобладали в основном три вида: *E. coli*, *K. pneumoniae* и *E. cloacae*.

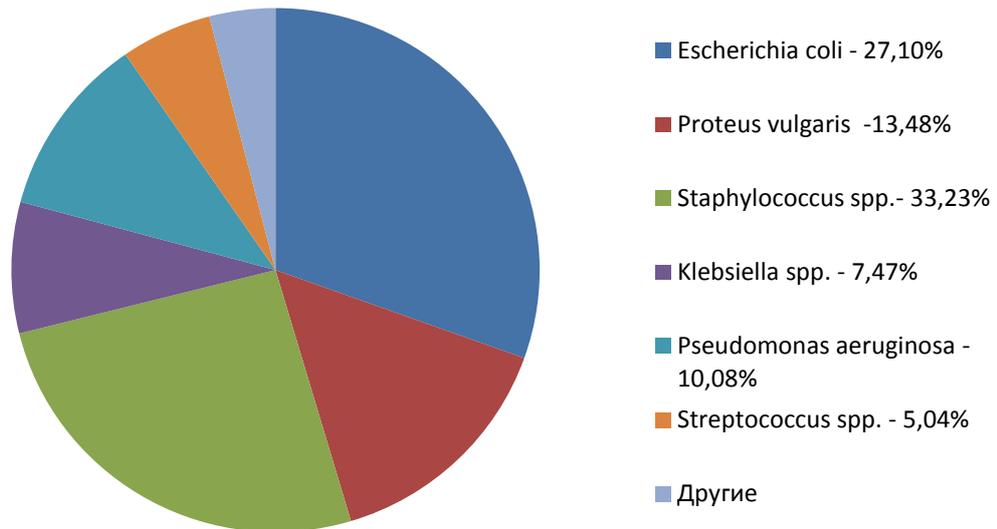


Рисунок 2.2.4.2.1 - Основные группы УПМ, выделенных от телят с респираторным и желудочно-кишечным симптомокомплексом

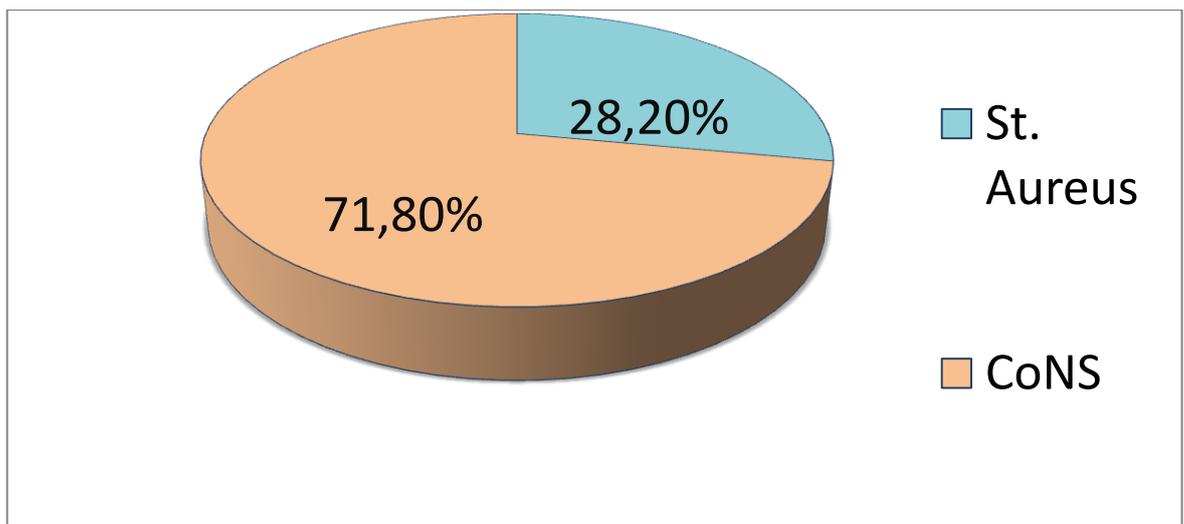


Рисунок 2.2.4.2.2 - Соотношение штаммов *St. aureus* и *CoNS* в составе культур рода *Staphylococcus*

Нами был сделан вывод о том, что оппортунистические инфекции коров и телят имеют полиэтиологичный характер и вызваны ассоциацией нескольких видов микроорганизмов, относящихся к условно патогенным.

Третью группу бактерий по частоте изоляций составили энтерококки (из них виды *E. faecalis*), а также стрептококки *Streptococcus spp.* (*S. agalactiae*, *S. disagalactiae*, *S. uberis*).

Четвертое место среди основных групп УПМ занимала *P. aeruginosa*, нами также изолирована от телят.

Получены изоляты редко встречающихся возбудителей инфекций респираторного тракта животных, которые занимают менее 5% от общего числа выделенных микроорганизмов: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas koreensis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*.

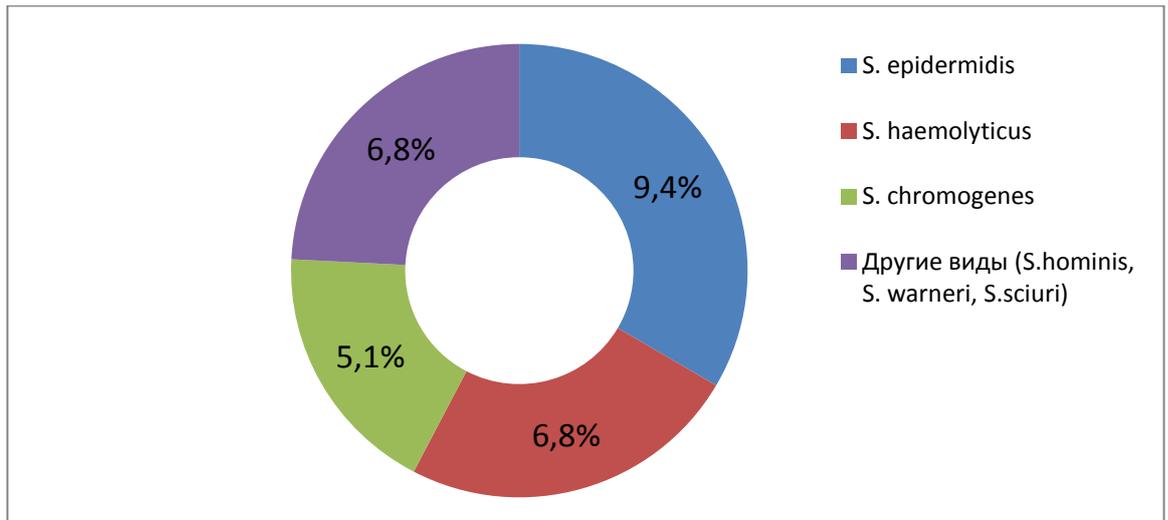


Рисунок 2.2.4.2.3 - Частота выделения различных видов *CoNS* из биоматериала от телят

Особое внимание вызвала колонизация респираторного тракта телят *Stenotrophomonas maltophilia*, из-за их природной полирезистентности к антибиотикам.

Впервые параллельно с культуральным методом и видовой идентификацией выделенных УПМ методом MALDI–TOF–MS анализа проводили прямую индикацию микроорганизмов непосредственно в клиническом материале методом количественной ПЦР с использованием микрочипового формата.

Проведенный анализ результатов ПЦР-исследований при атипичных пневмониях телят показал высокую частоту встречаемости микроорганизмов рода *Mycoplasma* (89,0%). При молекулярно-биологическом методе исследования клинического материала из респираторного тракта телят идентифицировали и дифференцировали *Mycoplasma bovis* – 28,0%, *Ureaplasma diversum* – 31,0% и

другие виды микоплазм в 30,0% случаев выделения. Аналогичные микроорганизмы обнаружены при обследовании у стельных коров – матерей этих телят, а так же из легких абортированных плодов (рис. 2.2.4.2.4).

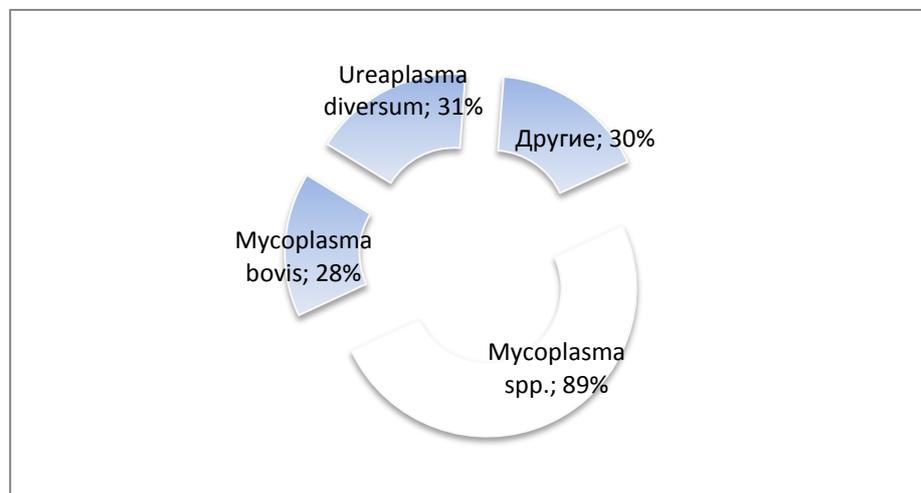


Рисунок. 2.2.4.2.4 - Спектр возбудителей *Mycoplasma bovis* и *Ureaplasma diversum*, выделенных с применением ПЦР при атипичных инфекциях телят

Таким образом, проведенное исследование еще раз подтвердило, что этиология ИВБ тесно связана с составом доминирующих групп УПМ в животноводческих комплексах, колонизирующих слизистые оболочки новорожденных животных. Нами отмечено небольшое разнообразие видов УПМ, циркулирующих в разных животноводческих хозяйствах, среди которых преобладают энтеробактерии и *CoNS*.

Проведенная видовая идентификация с помощью метода *MALDI-TOF-MS* анализа расширила спектр выявляемых микроорганизмов (*CoNS*, энтеробактерии, дрожжевые грибы), что имеет значение в контроле за гетерогенностью микробных популяций, циркулирующих в конкретных хозяйствах.

2.2.4.3 Спектр микроорганизмов при инфекционных маститах коров

Микробиологические исследования секрета молочной железы, выполненные на территории Северо-Западного региона ФО РФ (Псковской и Ленинградской областях) в период 2015-2018гг. показали видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных от больных маститом коров.

Возбудителей мастита условно делили на устойчивые (энвероментальные) и неустойчивые во внешней среде (контагиозные). Патогенные микроорганизмы могут передаваться от одного животного к другому через руки персонала и доильное оборудование (контагиозный путь), а также при контакте вымени с подстилкой и навозом (через окружающую среду) (табл. 2.2.4.3.1).

Таблица 2.2.4.3.1 - Основные возбудители маститов коров

Группы микроорганизмов	Контагиозные микроорганизмы	Виды приоритетных микроорганизмов	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Mycoplasma bovis</i>
	Микроорганизмы окружающей среды (энвероментальные)		<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus spp. (KOC)</i> <i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter aerogenes</i>
	Другие виды патогенов		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , а также микроорганизмы <i>Bacillus, Serratia</i> и дрожжевые грибы <i>Candida</i>

По результатам исследований за 2015 год из 63 образцов молока от коров, исследованных на мастит, получено 72 изолятов: *Enterobacter spp.* (11,1%), *Streptococcus spp.* (20,8%), *E. coli* (13,8%), *S.aureus* (28,0%), *C. albicans* (7,0%), *Bacillus spp.*(4,1%), *Actinomycetes spp.* (5,5%), *S. marcescens* (1.4%), *Klebsiella spp.*(8,3%).

По результатам исследований за 2016 год из 110 образцов молока от коров, исследованных на мастит, получено 98 изолятов: *Streptococcus spp.*(24,5%), *Klebsiella pneumoniae* (15.3%), *Candida albicans* (4,1%), *Pseudomonas aeruginosa* (4,1%), *Staphylococcus spp.* (31,6%) *Staphylococcus spp.* (31, 6%), из них коагулазонегативных (CoNS) не обнаружено, *Streptococcus spp.* (24, 5%), *Bacillus spp.* (3, 06%), *Serratia marcescens* (1, 2%), *Citrobacter spp.* (3, 06%), *Actinomycetes spp.* (3, 06%).

По результатам исследований за 2017 год из 54 образцов молока от коров, исследованных на мастит, получено 80 изолятов: *E. coli* (17,5% случаев),

Klebsiella pneumoniae (7.5%), *Candida albicans* (7,5%), *Staphylococcus spp.* (27,5%) из них: 9 культур-*Staphylococcus aureus* – 22,5% и 2 культуры гемолитического неплазмокоагулирующего стафилококка-*Staphylococcus spp.*- 5,0%, *Streptococcus spp.* (30,0%), из них: *Streptococcus agalactiae* -7 культур (17,5%) и *Enterococcus faecalis*-5культур(12,5%); *Actinomycetes spp.* (7.5%); *Corynebacteria spp.* (1,4%).

По результатам исследований за 2018 год из 62 образцов молока, выделено 72 изолятов: *E. coli* (7, 0% случаев), *Klebsiella pneumoniae* (15, 2%), *Candida albicans* (4, 2%), *Pseudomonas aeruginosa* (5, 5%), *Staphylococcus spp.* (32,0%), *Streptococcus spp.* (25,0%), *Bacillus spp.* (4.2%), *Serratia marcescens* (1,4%), *Actinomycetes spp.* (4, 2%), *Corynebacteria spp.* (1, 4%).

По результатам исследований за 2018 г. в секрете молочной железы больных маститом коров отмечено доминирование кокковой микрофлоры по сравнению с энтеробактериями – 56,9% и 29,1 % соответственно.

По результатам бактериологических исследований секрета молочной железы в период с 2015 г. по 2018 г. отмечено преимущество кокковой микрофлоры по сравнению с энтеробактериями - 31,2% и 64,5% соответственно (таблица 2.2.4.3.1). В числе кокковой микрофлоры патогенные *S. aureus* составили в среднем 29,4%, коагулазоотрицательные стафилококки - 3,5%, стрептококки - 28,7%, энтерококки - 2,8%.

По результатам исследований в секрете молочной железы больных маститом коров были выделены микроорганизмы рода *Streptococcus* с преобладанием в маститном молоке коров трех видов: *S. agalactiae*, *S. disagalactiae* и *S.uberis*.

В результате проведенных исследований установлено, что одним из отличий *hνKp*-штаммов *K. pneumoniae*, выделенных нами из маститного молока, является способность синтезировать мощную полисахаридную гиперкапсулу, образующую в результате гиперпродукции капсульных полисахаридов – такие штаммы обычно называют «гипермукоидными». Гипермукоидный фенотип *K. pneumoniae* выявлен у 20 изолятов (9,17%).

Проведен анализ результатов молекулярно-биологических исследований секрета молочной железы от больных маститом коров за период с 2017 по 2019г. Установлено, что *Mycoplasma spp.* выделена из маститного молока в 66,6%, а из них 33,3% *Mycoplasma bovis*.

Значительная вариабельность показателей индикации той или иной микрофлоры из секрета молочной железы больных маститом коров говорит о существенных различиях в этиологии болезней в зависимости от хозяйства Северо-Западного ФО РФ.

На основании полученных данных нами был сделан вывод о том, что маститные инфекции коров имеют полиэтиологичный характер и вызваны ассоциацией нескольких видов микроорганизмов, относящихся к условно – патогенным.

Mycoplasma bovis является ведущим этиологическим фактором в данной ассоциации оппортунистических микроорганизмов, выделяли их из секрета молочной железы при маститах у коров, со слизистых оболочек влагалища у коров при вульвовагинитах, а также из абортированных плодов, слаборазвитых телят.

Значение видовой идентификации патогена заключается в оценке клинического значения микроорганизма, выборе АМП для тестирования и интерпретация результатов определения чувствительности, выбора АМП для лечения, выбора режима и длительности терапии.

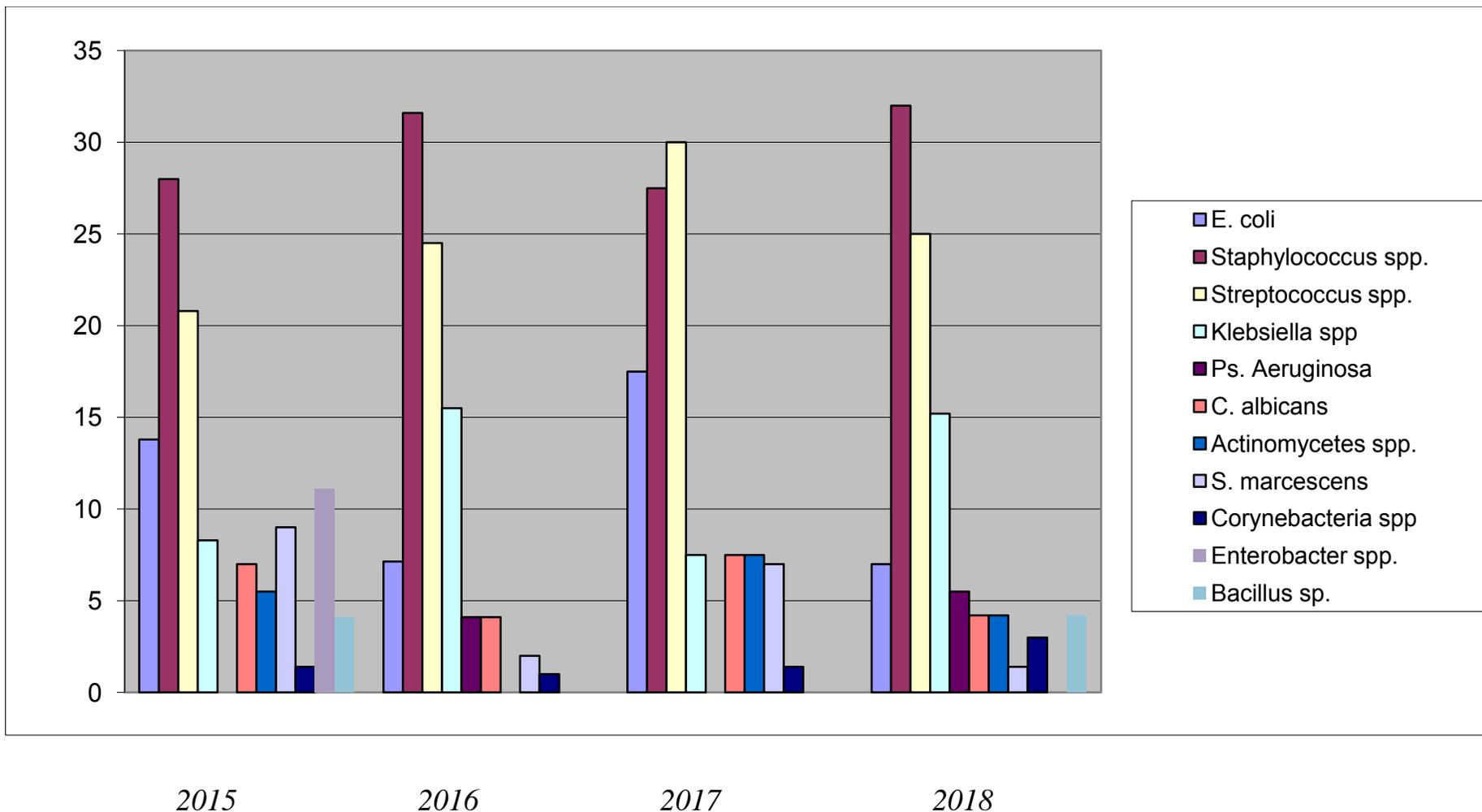


Рисунок 2.2.5.1.1 – Структура приоритетных микроорганизмов, изолированных из молока больных маститом коров в период 2015-2018гг. в СЗ ФО РФ

Таблица 2.2.5.1.1 - Результаты по бактериологическому исследованию секрета вымени от больных маститом коров за период 2015-2018 гг. в СЗ ФО РФ

Период	Кол-во исслед.	Выделенная микрофлора (кол-во культур/процент)												
		В том числе по видам возбудителя:												
		<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>S.aureus</i>	CoNS	<i>C. albicans</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Actinomycetes spp.</i>	<i>Corynebacteria spp</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
2015	72	8/11,1	15/20,8	10/13,8	-	20/28,0	-	5/7,0	3/4.1	-	4/5,5	-	1/1.4	6/8,3
2016	98	-	24/24,5	7/7,14	3/3,06	31/31,6	-	4/4,1	3/3,06	4/4,1	3/3,06	-	1/1,2	15/15,3
2017	80	-	24/30,0	14/17,5	-	18/22,5	4/5,0	6/7.5	-	-	6/7.5	2/1,4	-	6/7.5
2018	72	-	18/25,0	5/7,0	-	17/23,6	6/8,3	3/4,2	3/4,2%	4/5,5%	3/4,2%	1/1,4%	1/1,4	11/15,2
Итого	282	8	81	36	3	83	10	18	9	8	16	3	3	38

Примечание: в числителе – абсолютное число культур, в знаменателе – процент от числа выделенных культур.

2.2.5 Микробиологические основы рациональной фармакотерапии животных

Результат этого этапа исследования опубликован в статье «Этиологическая структура возбудителей мастита коров и их характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам в Северо-Западном регионе» [100].

Собранные данные загружены в таблице Excel на платформу AMRcloud для последующего комплексного анализа и систематизации (Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, МАКМАХ). Проанализированы функциональные возможности онлайн-платформы ARMcloud для прогнозирования (экстраполирования) резистентности микроорганизмов к другим антимикробным препаратам (<https://app.amrcloud.net/rus/?id=381a79f79178a9e4fbec1b6ea14ec55d&direct=T>).

2.2.5.1 Результаты антибиотикорезистентности условно-патогенных грамположительных микроорганизмов

Чувствительность к АМП клинических изолятов стрептококков и энтерококков, изолированных от крупного рогатого скота

Наряду с изучением видового состава выделенных бактерий из клинического и патологоанатомического материала у коров и телят, нами были проведены исследования по определению их чувствительности к антибактериальным средствам.

Изоляты культур микроорганизмов рода стрептококков проявили разнообразную антибактериальную чувствительность.

Выделены культуры стрептококков группы В *Streptococcus agalactiae*, чувствительные к бензилпенициллину (S=100,0%), который является маркерным препаратом для бета-лактамов, поэтому данные по чувствительности распространили на исследуемые АМП этого класса: амоксициллин (S=100,0%), цефалексин (S=100,0%), цефотаксим (S=100,0%). К эритромицину *S. agalactiae* были резистентны (R=90,0%), значит, к азитромицину тоже. Устойчивость наблюдалась к тетрациклину (R=100,0%), который является маркерным, и к доксициклину (R=100,0%).

Стрептококки группы В обладают природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая азтреонам, темоциллин, полимиксин, колистин, налидиксовую и фузидиевую кислоту, цефтазидим, низкие уровни резистентности выявлены к аминогликозидам.

Культуры стрептококков группы E *Streptococcus uberis* были резистентны к тетрациклину (R=100,0%), но чувствительны к бензилпенициллину (S=100,0%).

Гемолитические стрептококки группы А проявили резистентность к эритромицину (R=100,0%), клиндамицину (R=100,0%), тетрациклину (R=78,0%).

Исходя из чувствительности к бензилпенициллину, использование препаратов группы бета-лактамов для терапии животных целесообразно.

Таблица 2.2.5.1.1 - Устойчивость микроорганизмов рода *Streptococcus*, выделенных от коров и телят в СЗ ФО РФ, к различным АМП (ЕСОФФ)

Название антимикробного препарата	<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Streptococcus uberis</i>		Гемолитические стрептококки		Количество исследуемых культур
	S	R	S	R	S	R	
Пенициллины							
Бензилпенициллин	50/100,0	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	0/0	50
Цефалоспорины							
Цефалексин	50/100,0	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	0/0	50
Цефотаксим	50/100,0	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	0/0	50
Макролиды							
Эритромицин	5/10,0	45/90,0	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	50
Азитромицин	5/10,0	45/90,0	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	50
Линкозамиды							
Клиндамицин	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	50
Тетрациклины							
Тетрациклин	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	11/22,0	39/78,0	50
Доксициклин	0/0	50/100,0	0/0	50/100,0	11/22,0	39/78,0	50

Примечание: S-чувствительные; R- резистентные; в числителе – абсолютное число культур, в знаменателе – процент от числа выделенных культур.

Enterococcus faecalis был чувствителен к ампициллину (S=100, 0%) и

тетрациклину (S=70, 0%). Была выявлена резистентность к гентамицину, поэтому комбинации бета-лактамов с гентамицином и другими аминогликозидами не будут обеспечивать синергизм (кроме стрептомицина).

К стрептомицину *Enterococcus faecalis* был чувствителен (S=100,0%).

Анализируя перечень антимикробных препаратов для эпидемиологического мониторинга за антибиотикорезистентностью, предлагаем список АМП для эпизоотологического наблюдения (табл. 2.2.5.1.2)[66].

Таблица 2.2.5.1.2 – Перечень антимикробных препаратов для эпизоотологического наблюдения за антибиотикорезистентностью микроорганизмов *E. faecalis*, *E. faecium*

Определение чувствительности <i>in vitro</i>	Результат резистентности распространяется на препараты
Ампициллин или амоксициллин	Аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин)
Гентамицин	Гентамицин Скрининг для выявления приоритетной резистентности высокого уровня к гентамицину и другим аминогликозидам (кроме стрептомицина)
Ципрофлоксацин или левофлоксацин	Ципрофлоксацин, левофлоксацин
Ванкомицин	Ванкомицин
Линезолид	Линезолид

Enterococcus faecalis обладают природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая цефалоспорины, аминогликозиды, макролиды, сульфаниламиды, фузидиевую кислоту, клиндамицин.

Ампициллин является препаратом выбора для лечения животных с энтерококковыми инфекциями.

Несмотря на то, что энтерококки обладают природной резистентностью к аминогликозидам, данный класс АМП широко применяют в комбинированной терапии. Целесообразность таких схем лечения животных объясняется синергизмом между аминогликозидами и ампициллином.

Активность триметоприма в отношении энтерококков не ясна, поэтому для их популяции в ECOFF нет значений, а согласно EUCAST данный препарат относится к категории умеренной резистентности.

Таблица 2.2.5.1.3 – Устойчивость и чувствительность микроорганизмов *Enterococcus faecalis*, выделенных от коров и телят в СЗ ФО РФ, к различным АМП (ECOFF)

Название антимикробного препарата	Чувствительные	Резистентные	Количество исследуемых культур
Пенициллины			
Ампициллин	50/100,0	0/0	50
Бензилпенициллин	50/100,0	0/0	50
Макролиды			
Эритромицин	0/0	50/ 100,0	50
Азитромицин	0/0	50/ 100,0	50
Линкозамиды			
Клиндамицин	0/0	50/ 100,0	50
Аминогликозиды			
Гентамицин	0/0	50/ 100,0	50
Неомицин	0/0	50/ 100,0	50
Стрептомицин	50/100,0	0/0	50
Тетрациклины			
Тетрациклин	35/70,0	15/30,0	50
Доксициклин	35/70,0	15/30,0	50
Цефалоспорины			
Цефалексин	9/18,0	41 /82,0	50

Примечание: в числителе – абсолютное число культур, в знаменателе – процент от числа выделенных культур.

Чувствительность к АМП клинических изолятов стафилококков, изолированных от крупного рогатого скота

Изоляты культур *Staphylococcus aureus* были наиболее чувствительны к азитромицину и эритромицину (S=76,0%), цефотаксиму (S=100,0%), цефалексину (S=100,0%), неомицину (S=70,0%), клиндамицину (S=76,0%), тетрациклину (S=70,0%).

Все изоляты, отнесенные к группе коагулазоотрицательных стафилококков (CoNS), характеризовались множественной лекарственной устойчивостью. В

такой ситуации крайне необходим строгий эпизоотологический контроль за циркулирующими штаммами CoNS, в связи с этим необходимо улучшать и разрабатывать новые методы типирования CoNS.

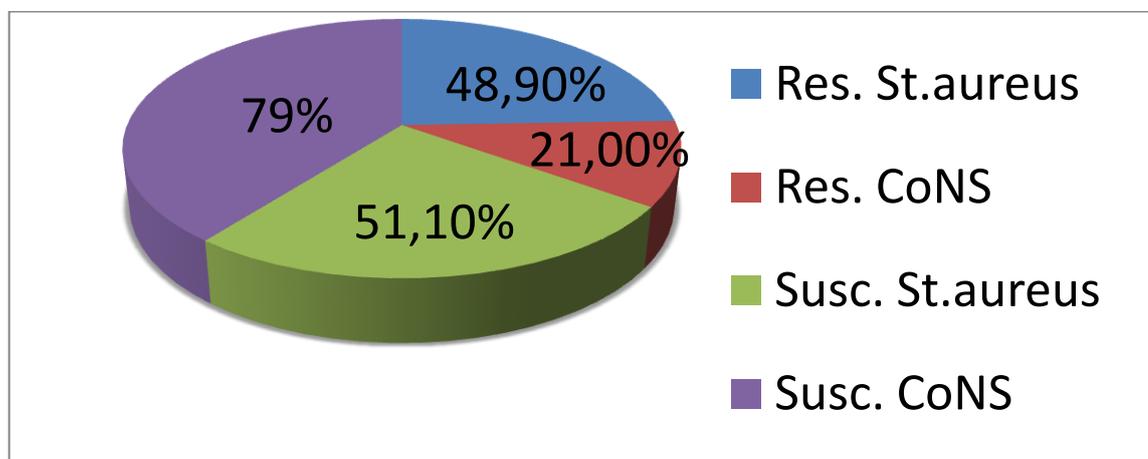


Рисунок 2.2.5.1.2 - Удельный вес чувствительных и устойчивых к АМП CoNS и *St. aureus*

Установлено, что антибиотикорезистентность к цефалоспорином чаще встречается у CoNS на 14,3%, к пенициллинам – на 25,0%, к макролидам – на 7,7%, чем у *S. aureus*. У *S. aureus* резистентность выше к тетрациклинам на 21,7%, аминогликозидам – на 32,0%, линкозамидам – на 19,7%, чем у CoNS. Удельный вес чувствительных к АМП CoNS составляет 79,0% и устойчивых 21,0% случаев выделения. Удельный вес чувствительных к АМП *S. aureus* 51,1% и устойчивых 48,9% случаев выделения.

Широкое распространение оппортунистических инфекций, вызываемых CoNS, делает актуальной проблему терапии животных. Сложности лечения животных с указанными инфекциями связаны с высокой частотой распространения среди CoNS устойчивости к большинству β -лактамных антибиотиков, а также к антибиотикам других групп.

Предлагаемый перечень АМП может быть использован как при определении чувствительности с терапевтической целью, так и для проведения эпизоотологического наблюдения за антимикробной резистентностью. Данный перечень не является исчерпывающим. При появлении новых данных и АМП, а

также в зависимости от локальных приоритетов, перечень может быть пересмотрен.

Таблица 2.2.5.3.4 – Устойчивость и чувствительность микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, выделенных от коров и телят в СЗ ФО РФ, к различным АМП (ЕСОФФ)

Название антимикробного препарата	Чувствительные	Резистентные	Количество исследуемых культур
Пенициллины			
Ампициллин	13/26,0	37/74,0	50
Бензилпенициллин	37 /74,0	13/26,0	50
Макролиды			
Эритромицин	26 /76,0	12/24,0	50
Азитромицин	26/76,0	12/24,0	50
Линкозамиды			
Клиндамицин	26 /76,0	12/24,0	50
Линкозамицин	45/90,0	5/10,0	50
Аминогликозиды			
Гентамицин	38/76,0	12/24,0	50
Неомицин	35/70,0	15/30,0	50
Тетрациклины			
Тетрациклин	35/70,0	15/30,0	50
Доксициклин	35/70,0	15/30,0	50
Цефалоспорины			
Цефалексин	50/100,0	0/0	50
Цефотаксим	50/100,0	0/0	50

Примечание: в числителе – абсолютное число культур, в знаменателе – процент от числа выделенных культур.

В таблице 2.2.5.1.3 указаны приоритетные препараты для мониторинга антибиотикорезистентности *S. aureus*. В первом столбце указаны приоритетные для мониторинга АМП, во втором столбце указаны препараты, к которым с высокой степенью вероятности ожидается наличие резистентности при устойчивости к препарату из первого столбца. Таким образом, используя

указанные препараты из первого столбца экстраполировали наличие резистентности к другим препаратам. Если наименования препаратов первого и второго столбца совпадали, то наличие резистентности распространяется только на данный препарат (препараты из этого же класса следует оценивать отдельно). Следует отметить, что представленные таблицы составлены только для экстраполяции категории резистентности [66].

В наших исследованиях у *Staphylococcus aureus* у 8 из 33 изолятов (24,3%) были обнаружены фенотипические признаки устойчивости к бета-лактамам антибиотикам.

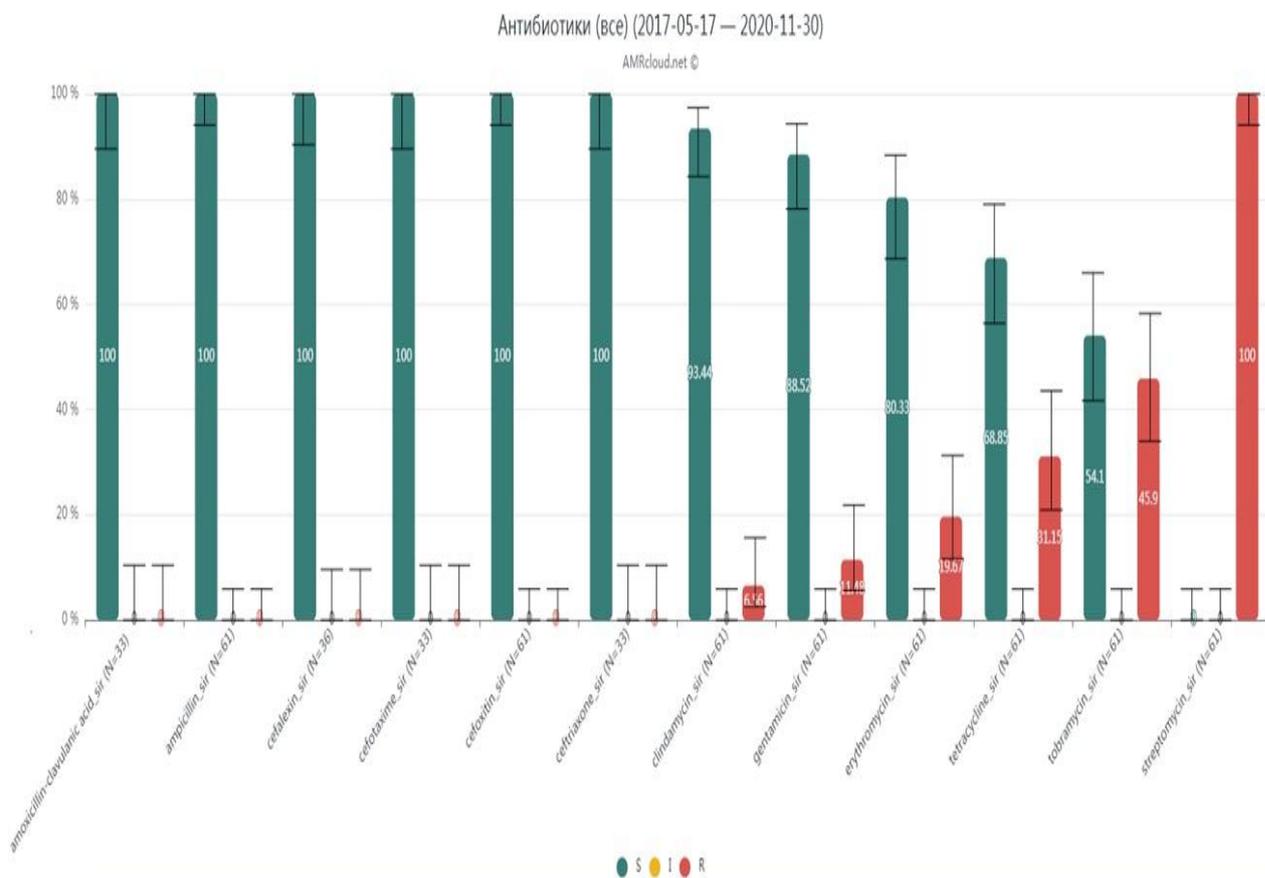


Рисунок 2.2.5.1.3 - Процентное соотношение чувствительность и резистентность *Staphylococcus aureus* к АМП (AMRcloud)

Таблица 2.2.5.1.5 - Перечень антимикробных препаратов для эпизоотологического мониторинга за антибиотикорезистентностью микроорганизмов *S.aureus*

Определение чувствительности <i>in vitro</i>	Результат резистентности распространяется на препараты
Цефокситин (ДДМ) скрининг Оксациллин (МПК) скрининг	Антистафилококковые бета-лактамы (оксациллин, амоксициллин/клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам, цефазолин, цефуроксим, карбапенемы), кроме анти-MRSA цефемов (цефтаролин, цефтобипрол) Фенотипическое выявление метиллинрезистентности (MRSA)
Ципрофлоксацин или левофлоксацин или офлоксацин	Фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин, офлоксацин)
Норфлоксацин (ДДМ) скрининг	Скрининг резистентности к ципрофлоксацину, левофлоксацину, офлоксацину, моксифлоксацину
Ванкомицин	Ванкомицин Определение чувствительности проводится методом микроразведений в бульоне
Линезолид	Линезолид
Рифампицин	Рифампицин
Эритромицин	Макролиды (эритромицин, азитромицин, кларитромицин, рокситромицин и др.) При выполнении диско-диффузионного метода диски с эритромицином и клиндамицином можно использовать для выявления индуцибельной резистентности к клиндамицину (расположить диски рядом, расстояние между краями 12-20 мм)
Клиндамицин	Клиндамицин, линкамицин, макролиды При выполнении диско-диффузионного метода диски с эритромицином и клиндамицином можно использовать для выявления индуцибельной резистентности к клиндамицину (расположить диски рядом, расстояние между краями 12-20 мм)
Гентамицин	Аминогликозиды

Из 50 исследуемых изолятов *Staphylococcus aureus* 12 (24%) обладали устойчивостью к гентамицину по ДДМ, 3 изолята проявили рост при МИК \geq 0,5 мг/л, а 9 изолятов при МИК \geq 2,0 мг/л.

Из исследуемых изолятов *Staphylococcus aureus* (24%) обладали устойчивостью к азитромицину по ДДМ и проявили рост 20 (60,6%) при МИК \geq 0,5 мг/л, а изолятов 4 (8,0 %) при МИК \geq 1,0 мг/л.

Из исследуемых изолятов *Staphylococcus aureus* (30,0%) обладали устойчивостью к тетрациклину. Если *Staphylococcus aureus* был резистентен к тетрациклину, определяли резистентность к доксициклину МИК \geq 0,5 мг/л у 7 изолятов, и у 8 изолятов отмечали МИК \geq 1,0 мг/л.

В зависимости от различных МИК гентамицина, азитромицина и доксициклина распределение изолятов *Staphylococcus aureus* носило бимодальный характер, что указывает на гетерогенность изолятов.

Staphylococcus aureus обладают природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая цефтазидим, азтреонам, полимиксин, колистин, налидиксовую кислоту.

В заключение важно отметить, что значение МИК позволяет прогнозировать вероятность успеха и неудачи выбранной терапии.

Низкое значение МИК указывает на высокую чувствительность к АМП, а высокое значение прогнозирует низкую чувствительность и вероятную резистентность.

Значение МИК позволяет ветеринарному врачу:

- выбрать наиболее подходящий антимикробный препарат;
- модифицировать дозирование АМП, принимая во внимание чувствительность патогенна (МИК) в комбинации с характеристиками животного и фармакокинетическими параметрами лекарственного средства посредством использования терапевтического лекарственного мониторинга.

2.2.5.2 Результаты антибиотикорезистентности условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов

Культуры *Pseudomonas aeruginosa* чувствительны только к гентамицину (S=73,0%), ципрофлоксацину (S=80,0%), пиперациллину (S=100,0%), цефтазидиму (S=100,0%).

Перечень антисинегнойных антибиотиков не велик, но чувствительность к ним можно оценивать согласно списка Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) и с применением эпидемиологических точек отсечения (ECOFF). В клинических условиях *Pseudomonas aeruginosa* может формировать резистентность к каждому антимикробному препарату (табл. 2.2.5.2.1).

Таблица 2.2.5.2.1 – Перечень антимикробных препаратов для эпизоотологического мониторинга за антибиотикорезистентностью микроорганизмов *P. aeruginosa*

Определение чувствительности <i>in vitro</i>	Результат резистентности распространяется на препараты
Пиперациллин /тазобактам	Пиперациллин /тазобактам
Цефтазидим	Цефтазидим
Азтреонам	Азтреонам
Цефтозолан /тазобактам	Цефтозолан /тазобактам
Цефтазидим /тазобактам	Цефтазидим /тазобактам
Гентамицин или торбамицин	Гентамицин, торбамицин
Амикацин	Амикацин
Ципрофлоксацин или левофлоксацин	Фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин)
Имипенем	Имипенем
Меропинем	Меропинем
Колистин	Полимиксины (колистин, полимиксин В) Определение чувствительности проводится только методом микроразведений в бульоне

Pseudomonas aeruginosa обладают природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая ампицилин, амоксицилин, клиндамицин, даптомицин, гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин), макролиды, тетрациклины, хлорамфеникол, цефалоспорином 1 и 2 поколениям, кроме «антисинегнойных цефалоспоринов»- цефтазидима. Известно, что при наличии у бактерий

природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны в монотерапии [66].

Большинство изолятов культур *E.coli* наиболее чувствительны к неомицину (S=100,0%), ципрофлоксацину (S=93,0%), но резистентны к остальным исследуемым антибиотикам: гентамицину (R=14,0%). Изоляты культур *E.coli* были резистентны к ампициллину (R=76,0%) и результат резистентности распространяется на аминопенициллины (ампициллин, амоксициклин), цефалоспорины I поколения (цефалексин) (рис. 2.2.5.2.1, табл. 2.2.5.2.2).

Таблица 2.2.5.2.2 – Устойчивость и чувствительность микроорганизмов *E.coli*, выделенных от коров и телят в СЗ ФО РФ, к различным АМП (ЕСОФФ)

Название антимикробного препарата	Чувствительные	Резистентные	Количество исследуемых культур
Пенициллины			
Ампициллин	0/0	179/100,0	179
Макролиды			
Эритромицин	0/0	179/100,0	179
Азитромицин	0/0	179/100,0	179
Линкозамиды			
Клиндамицин	0 /0	179/100,0	179
Линкозамицин	0/0	179/100,0	179
Аминогликозиды			
Гентамицин	154/86,0	25/14,0	179
Неомицин	179/100,0	0/0	179
Тетрациклины			
Тетрациклин	126/70,0	53/30,0	179
Доксициклин	126/70,0	53/30,0	179
Цефалоспорины			
Цефалексин	43/24,0	136/76,0	179
Фторхинолоны			
Ципрофлоксацин	167/93,0	12/7,0	179
Примечание: в числителе – абсолютное число культур, в знаменателе – процент от числа выделенных культур.			

E.coli обладают природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая бензилпенициллину, гликопептидам, макролидам, линкозамидам, стрептограминам, фузидиевой кислоте, рифампицину, даптомицину, линезолиду.

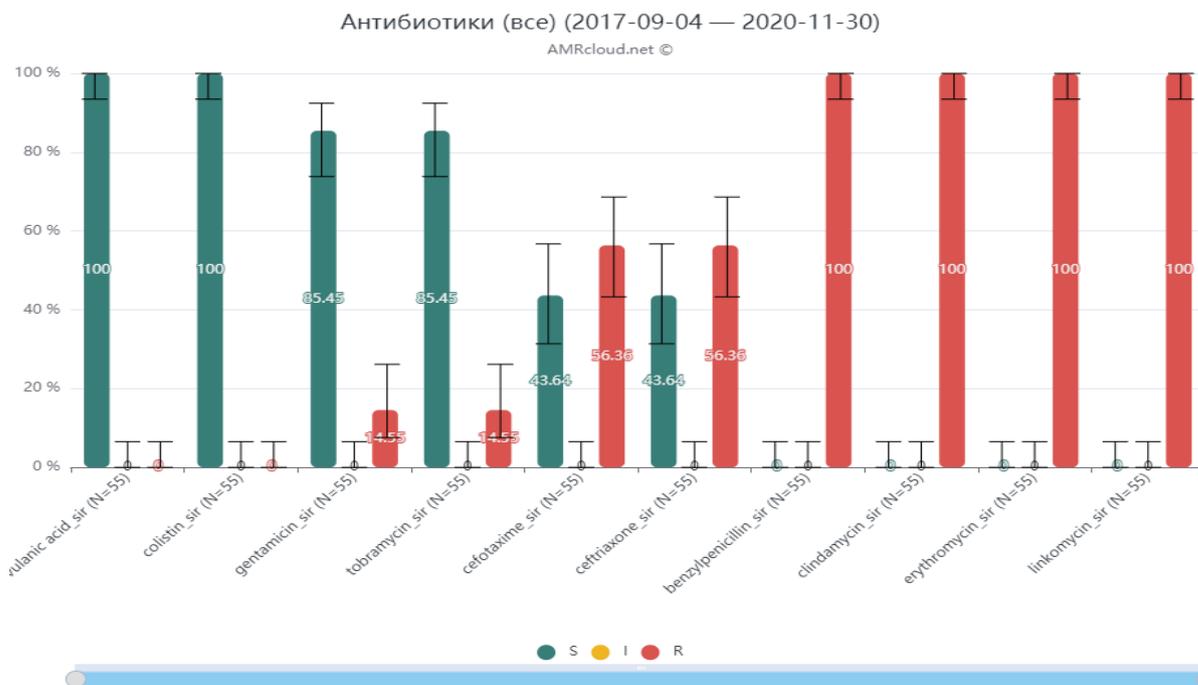


Рисунок 2.2.5.2.1 - Процентное соотношение чувствительности и резистентности *E.coli* к АМП (AMRcloud)

Представление данных по ассоциированной устойчивости в виде «матрицы» позволяет определить процент, при котором устойчивость к одному препарату свидетельствует о наличии устойчивости к другому, в расчет включались резистентные изоляты (табл.2.2.5.2.3).



Таблица 2.2.5.2.3 - Матрица ассоциированной резистентности микроорганизмов *E.coli* к АМП (AMRcloud)

Тестируемые культуры *K. pneumoniae* обладали чувствительностью к неомицину (S=50,0%), ципрофлоксацину (S=80,0%), но устойчивы к антимикробным препаратам: гентамицину (R=93,0%). Изоляты культур *K. pneumoniae* были резистентны к ампициллину (R=52,0%) и результат резистентности распространяется на аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин), цефалоспорины I поколения (цефалексин) (табл. 2.2.5.3.4).

Таблица 2.2.5.3.4 – Устойчивость и чувствительность микроорганизмов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от коров и телят в СЗ ФО РФ, к различным АМП (ЕСОФФ)

Название антимикробного препарата	Чувствительные	Резистентные	Количество исследуемых культур
Пенициллины			
Ампициллин	0/0	179/100,0	179
Макролиды			
Эритромицин	0/0	139/100,0	139
Азитромицин	0/0	139/100,0	139
Линкозамиды			
Клиндамицин	0/0	139/100,0	139
Линкозамицин	0/0	139/100,0	139
Аминогликозиды			
Гентамицин	10/7,0	129/93,0	139
Неомицин	129/93,0	10/7,0	139
Тетрациклины			
Тетрациклин	98/70,0	41/30,0	139
Доксициклин	124/70,0	15/11,0	139
Цефалоспорины			
Цефалексин	0/0	139/100,0	139
Фторхинолоны			
Ципрофлоксацин	114/80,0	25/20,0	139

Примечание: в числителе – абсолютное число культур, в знаменателе – процент от числа выделенных культур.

Таблица 2.2.5.2.5 – Перечень антимикробных препаратов для эпизоотологического мониторинга за антибиотикорезистентностью микроорганизмов порядка *Enterobacterales*

Определение чувствительности <i>in vitro</i>	Результат резистентности распространяется на препараты
Ампициллин или амоксициллин	Аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин), цефалоспорины I поколения Только для <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i>
Амоксициллин/клавулановая кислота	Амоксициллин/клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам Кроме <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae complex</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia spp.</i> , <i>Serratia marcescens</i> (природная резистентность) Амоксициллин-клавулановая кислота в комбинации с цефалоспоридами III-IV поколения может использоваться для выявления ESBL диск-диффузионным методом для выявления механизмов резистентности, имеющих клиническое, эпизоотологическое и эпидемиологическое значение
Пиперациллин /тазобактам	Пиперациллин /тазобактам, амоксициллин/клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам, цефоперазол-сульбактам
Цефотаксим или цефтриаксон	Цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефтриаксон) Цефалоспорины III-IV поколения и их комбинации с клавулановой кислотой могут использоваться для выявления ESBL
Цефтазидим	Цефтазидим Цефалоспорины III-IV поколения и их комбинации с клавулановой кислотой могут использоваться для выявления ESBL
Цефтазидим /авибактам	Цефтазидим /авибактам Для возбудителей, особенно при высоком уровне распространенности CRE
Гентомицин или торбамицин	Гентомицин, торбамицин
Амикацин	Амикацин
Ципрофлоксацин или левофлоксацин	Фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин и др.)
Имипенем	Имипенем
Меропинем	Меропинем, дорипенем, эртапинем
Эртапинем	Эртапинем В том числе для скрининга пониженной чувствительности к карбопенемам
Колистин	Полимиксины (колистин, полимиксин В) Определение чувствительности проводится только методом микроразведений в бульоне

Значения МИК для гентамицина составили > 2 мг/л и ≥ 4 мг/л, что выше установленного стандарта для чувствительных изолятов по критериям ЕСOFF. На устойчивые штаммы содержание максимальных концентраций антибиотиков (64мг/л) не оказывало полного подавляющего действия, численность клеток была не ниже $2,84 \lg$ КОЕ/мл в среде с гентамицином.

K. pneumoniae обладает природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая бензилпенициллину, гликопептидам, макролидам, линкозамидам, стрептограминам, фузидиевой кислоте, рифампицину, даптомицину, линезолиду.

В таблице 2.2.5.2.5 указаны приоритетные для мониторинга антибиотикорезистентности препараты в зависимости от вида микроорганизмов. Следует отметить, что представленные таблицы составлены только для экстраполяции категории резистентности [66].

Чувствительность к АМП клинических изолятов S. maltophilia, изолированных от крупного рогатого скота

S. maltophilia, изолированная из слизистых истечений носовых ходов крупного рогатого скота, обладает природной резистентностью к широкому кругу антимикробных препаратов за счёт множественных эффлюксных систем и модификаций белков внешней мембраны. Хромосомно-кодируемые β -лактамазы *S. maltophilia* гидролизуют все бета-лактамные соединения, включая карбапенемы.

Изоляты *S. maltophilia*, выделенные из клинического материала от крупного рогатого скота были чувствительны только к левофлоксацину и моксифлоксацину (табл.2.2.5.2.6).

Хлорамфеникол практически не используется в качестве терапевтического препарата против грамотрицательных бактерий. При этом выявлен высокий уровень резистентности к хлорамфениколу, что свидетельствует об эффективности эффлюксного оттока у *S. maltophilia*, и в связи с этим, ограничении ко многим антимикробным препаратам.

Штаммы *Stenotrophomonas maltophilia*, изолированные из слизистых истечений носовых ходов при респираторных патологиях у сельскохозяйственных

животных, были вирулентны для белых мышей, что позволило предположить их этиологически значимыми.

Высокая фенотипическая устойчивость изолятов в нашем исследовании подчеркивает важность рутинного скрининга для выявления резистентности фенотипов изолятов. Наблюдения за изменениями численности жизнеспособных клеток в течение 24 ч под воздействием высоких концентраций антибиотиков дают возможность контролировать развитие антибиотикорезистентности.

Таблица.2.2.5.2.6 - Профиль антибиотикорезистентности для *Stenotrophomonas maltophilia*, составленный автоматическим анализатором MicroScan WalkAway 40 plus («Siemens», Германия)

Антимикробные препараты	МИК (Минимальная ингибирующая концентрация), мг/л	Интерпретация
Amikacin	>32	R
Амох/К Clavulanate	>16/8	R
Amp/Sulbactam	>16/8	R
Ampicillin	>16	R
Cefepime	>16	R
Cefotaxime	>32	R
Cefotaxime/К Clavulanate	>4	
Ceftazidime	>16	R
Ceftazidime/К Clavulanate	>2	
Ceftriaxone	>32	R
Cefuroxime	>16	R
Ciprofloxacin	2	R
Ertapenem	>4	R
Gentamicin	>8	R
Imipenem	>8	R
Levofloxacin	<=2	S
Meropenem	>8	R
Moxifloxacin	<=2	S
Ticar/К Clavulanate	>64	R
Tobramycin	>8	R
Trimeth/Sulfa	>2/38	R

Практическое применение фенотипических методов исследования позволяет выявить антибиотикочувствительность и механизмы резистентности у этиологически значимых возбудителей мастита у высокопродуктивных коров.

Важно оптимизировать использование АМП, которые пока еще являются эффективными. Способы предупреждения и лечения болезней бактериальной этиологии необходимо улучшать посредством:

- использования АМП только при наличии обоснованного показания;
- оптимизации дозирования АМП, что способствует более быстрому выздоровлению и снижению частоты развития резистентности;
- проведения мониторинговых исследований профилей чувствительности и минимальных ингибирующих концентраций в ветеринарных лабораториях с целью разработки и корректировки доз лечения животных.

2.2.5.3 Лабораторный контроль механизмов резистентности к антимикробным препаратам для микроорганизмов, изолированных от крупного рогатого скота

Результат этого этапа исследования опубликован в нашей статье «Механизмы резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от крупного рогатого скота» [102].

Существуют два подхода к интерпретации результатов определения чувствительности: микробиологический и клинический. Микробиологическая интерпретация основана на анализе распределения значений концентраций антибиотика, подавляющих жизнеспособность бактерий. Клиническая интерпретация основана на оценке эффективности антибактериальной терапии.

При определении чувствительности к АМП изолятов культур, выделенных из секрета вымени больных маститом коров, респираторного тракта телят из четырёх хозяйств за период с 2015г по 2018г, было установлено, что 73,0% исследованных микроорганизмов были устойчивы к 2 – 6 фармакологическим группам АМП.

К двум группам АМП было устойчиво 5,0% штаммов. Остальные 68,0% были полирезистентными (MDR), из них 31,0% относились к экстремально резистентным (XDR).

Наши данные свидетельствуют о том, что в процессе исследования не был установлен универсальный антибактериальный препарат, который обладал бы

широким спектром действия в отношении большинства выделенных изолятов культур микроорганизмов (рис.2.2.5.3.1).

Устойчивости к оксацилину у всех исследованных нами штаммов мы не обнаружили, что позволяет отнести их к метициллин-чувствительным *S. aureus* MSSA, а исследования с цефокситином не проводили. Согласно обновленной версии рекомендаций Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) существует рекомендация об использовании цефокситина для скрининга *mecA/mecC*- опосредованной резистентности к бета-лактамам у *S. aureus*.

Установлено, что изоляты, выделенные из молока коров в Северо-Западном регионе РФ, были восприимчивы к ванкомицину ($S=100,0$ %). Этот препарат больше не используется в ветеринарной медицине во многих странах, включая Россию, что может объяснять представленные результаты.

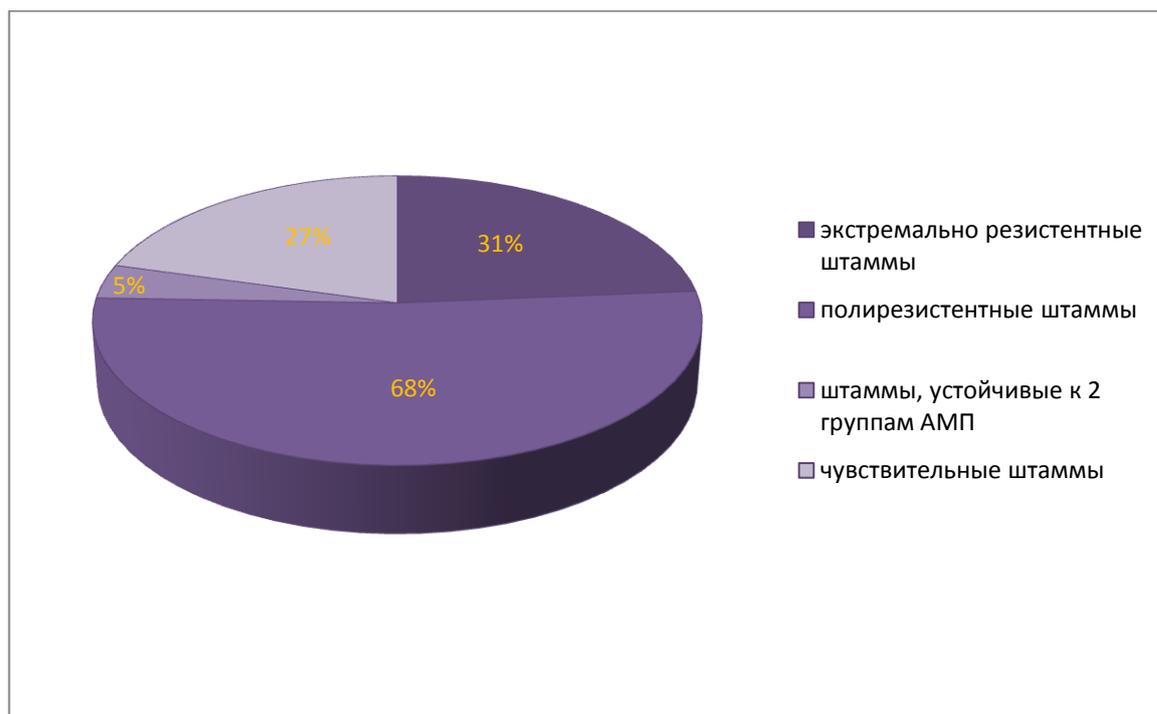


Рисунок 2.2.5.3.1 - Удельный вес чувствительных и устойчивых к АМП штаммов условно патогенных микроорганизмов, %

При анализе полученных данных особую обеспокоенность вызывает увеличение доли полирезистентных штаммов *K. pneumoniae* и *E.coli*, появление в последние годы полирезистентных штаммов.

У выделенных в период 2015 – 2018 гг. изолятов культур *Escherichia coli* было установлено профили резистентности к АМП. Одним из наиболее часто встречающихся профилей резистентности была устойчивость к цефалоспорином (табл. 2.2.5.3.1).

Отмечено, что у одного животного на слизистой оболочке респираторного тракта находились изоляты микроорганизмов, имеющие различные профили резистентности к АМП.

Таблица 2.2.5.3.1 - Результаты фенотипического анализа резистентности приоритетных штаммов грамотрицательных микроорганизмов к различным антимикробным препаратам (% устойчивых штаммов)

АМП \ Штаммы	<i>E.coli</i> (n=179)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=45)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=21)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=5)
Цефалоспорины				
Цефуроксим	52,31%	23,53%	100,0%	100,0%
Цефотаксим	32,31%	17,65%	100,0%	100,0%
Цефтазидим	30,77%	23,53%	52,38%	100,0%
Цефепим	18,46%	11,76%	23,81%	100,0%
Карбапенемы				
Имипенем	0	0	0	100,0%
Меропенем	0	0	0	100,0%

Тестируемые культуры *K. pneumoniae* обладали устойчивостью к антимикробным препаратам нескольких классов: сульфаниламидам, ко-тримоксазолу, тетрациклину, аминогликозидам (гентамицину), β-лактамам (амоксиклаву, цефепиму, цефотаксиму) продуцировали β-лактамазу расширенного спектра (БЛРС) класса СТХ.

В заключение хотелось бы отметить, что не существует методов, которые позволили бы с абсолютной достоверностью прогнозировать клинический эффект антибиотиков при лечении инфекционных болезней. Однако, данные результатов наших экспериментов по определению чувствительности возбудителей к АМП могут служить хорошим ориентиром ветеринарным врачам для выбора и коррекции антибактериальной терапии.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в настоящее время становится актуальной проблема циркуляции возбудителей, обладающих множественной устойчивостью к АМП.

В настоящее время в международных рекомендациях (EUCAST, CLSI) детекция специфического механизма резистентности (включая продукцию конкретной β -лактамазы - БЛРС, карбапенемазы КРС или МБЛ) не требуется для определения тактики лечения животных. Тем не менее, идентификация конкретного специфического фермента может быть полезна для проведения эпизоотологических и эпидемиологических исследований.

Профилактика распространения штаммов-продуцентов карбапенемаз основана на раннем выявлении носителей таких изолятов в животноводческих хозяйствах.

Оценка уровня бета-лактамазной активности в рутинной практике ветеринарных лабораториях позволит сократить необоснованное использование антибактериальных препаратов из группы бета-лактамов в ветеринарной практике.

Включение клинических образцов в экспериментальную выборку проводили согласно следующим критериям: присутствие в клиническом материале грамотрицательных бактерий в виде монокультуры; фенотипическая устойчивость выделенных бактерий к цефотаксиму и цефепиму (табл. 2.2.5.3.1).

Микробный спектр представлен следующими приоритетными грамотрицательными микроорганизмами: *E.coli* и *K.pneumoniae*.

По результатам микробиологического анализа чувствительности к цефалоспорином, данные бактериальные культуры отнесены к трем

фенотипическим группам: чувствительные к исследуемым антибиотикам; резистентные, обладающие устойчивостью к тестируемым препаратам; показывающие промежуточную чувствительность к одному из цефалоспоринов на фоне устойчивости к другому.

В ходе наших исследований у *K.pneumoniae*, *E.coli* и *Ps. aeruginosa* отмечена приобретенная устойчивость к цефтазидиму и цефотаксиму чувствительность к этим же препаратам, защищённым клавуланатом. Разница показателей МПК между незащищёнными и защищёнными цефалоспоридами в 3 и более раз доказывает способность исследуемых микроорганизмов продуцировать бета-лактамазы расширенного спектра (рис. 2.2.5.3.2, рис. 2.2.5.3.3).

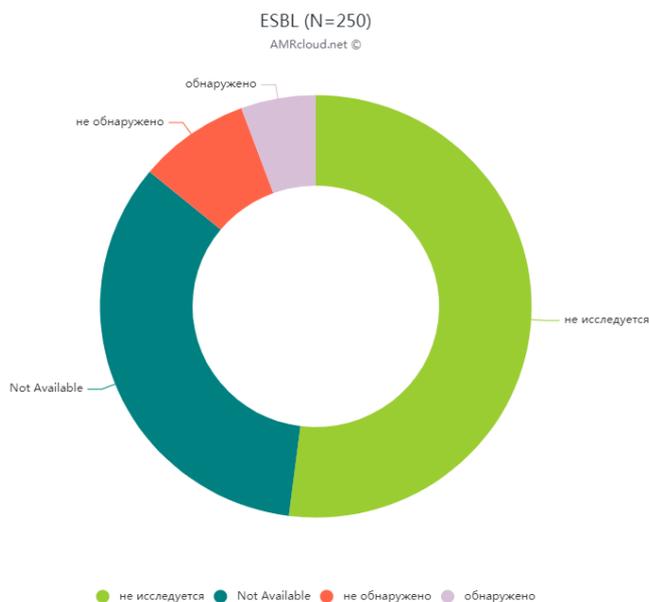


Рисунок 2.2.5.3.4 - Процентное соотношение изолятов семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующих бета-лактамазы, к общему спектру выделенных микроорганизмов (AMRcloud)

Выявление фенотипов бактерий, несущих детерминанты резистентности β -лактамазы расширенного спектра (ESBL), проводилось нами методом синергизма двойных дисков с ингибиторами ферментов – клавулановой кислотой (рис. 2.2.5.3.4).

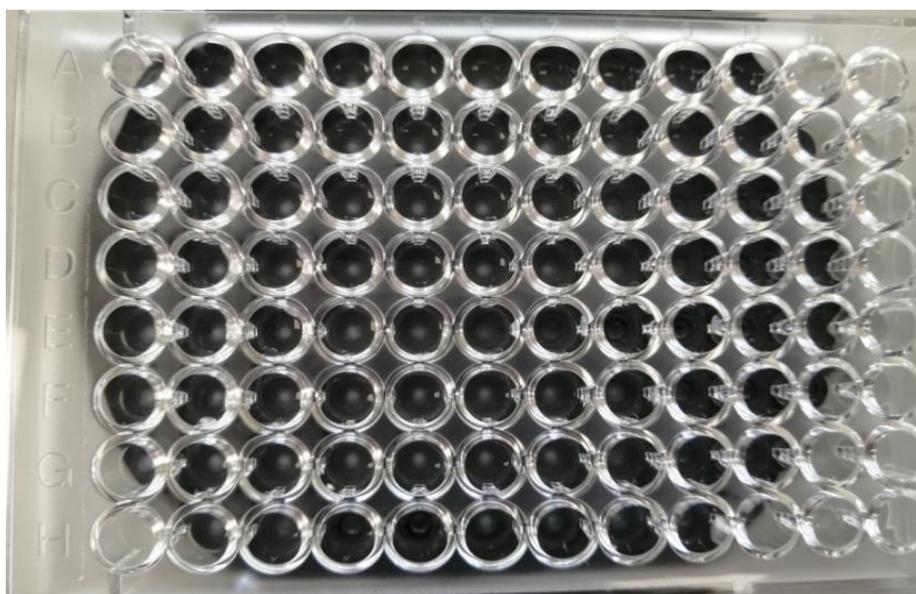


Рисунок 2.2.5.3.2 - Визуальный учет результата на наличие бета-лактамаз у микроорганизмов с применением планшета ESB1F Sensititre («Trek Diagnostic Systems», Великобритания)

СХЕМА ПАНЕЛИ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AXO 1	AXO 2	AXO 4	AXO 8	AXO 16	AXO 32	AXO 64	AXO 128	MERO 1	MERO 2	MERO 4	MERO 8
B	CEP 8	CEP 16	POD 0.25	POD 0.5	POD 1	POD 2	POD 4	POD 8	POD 16	POD 32	CIP 1	CIP 2
C	FOT 0.25	FOT 0.5	FOT 1	FOT 2	FOT 4	FOT 8	FOT 16	FOT 32	FOT 64	GEN 4	GEN 8	GEN 16
D	F/C 0.12/4	F/C 0.25/4	F/C 0.5/4	F/C 1/4	F/C 2/4	F/C 4/4	F/C 8/4	F/C 16/4	F/C 32/4	F/C 64/4	AMP 8	AMP 16
E	TAZ 0.25	TAZ 0.5	TAZ 1	TAZ 2	TAZ 4	TAZ 8	TAZ 16	TAZ 32	TAZ 64	TAZ 128	FAZ 8	FAZ 16
F	T/C 0.12/4	T/C 0.25/4	T/C 0.5/4	T/C 1/4	T/C 2/4	T/C 4/4	T/C 8/4	T/C 16/4	T/C 32/4	T/C 64/4	T/C 128/4	POS CON
G	IMI 0.5	IMI 1	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	P/T 4/4	P/T 8/4	P/T 16/4	P/T 32/4	P/T 64/4	POS CON
H	FEP 1	FEP 2	FEP 4	FEP 8	FEP 16	FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	FOX 64	NEG CON	POS CON

АНТИБИОТИКИ

CEPHEMS

TAZ	Ceftazidime
FAZ	Cefazolin
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitin
CEP	Cephalexin
POD	Cefpodoxime
FOT	Cefotaxime
AXO	Ceftriaxone

CARBAPENEM

IMI	Imipenem
MERO	Meropenem

AMINOGLYCOSIDE

GEN	Gentamicin
-----	------------

PENICILLIN

AMP	Ampicillin
-----	------------

FLUOROQUINOLONE

CIP	Ciprofloxacin
-----	---------------

Beta lactam/Beta lactamase Inhibitor

P/T4	Piperacillin / tazobactam constant 4
T/C	Ceftazidime / clavulanic acid
F/C	Cefotaxime / clavulanic acid

Controls

POS	Positive Control
NEG	Negative Control

Рисунок 2.2.5.3.3 - Схема расположения антибактериальных препаратов на планшете ESB1F Sensititre («Trek Diagnostic Systems», Великобритания).

Установлена продукция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у 21 (8,4%) из 250 изолятов условно-патогенной микрофлоры, выделенной из клинического материала крупного рогатого скота. Собранные данные загружены

в таблице Excel на платформу AMRcloud для последующего комплексного анализа и систематизации (рис.2.2.5.3.4, рис. 2.2.5.3.5, рис.2.2.5.3.6).

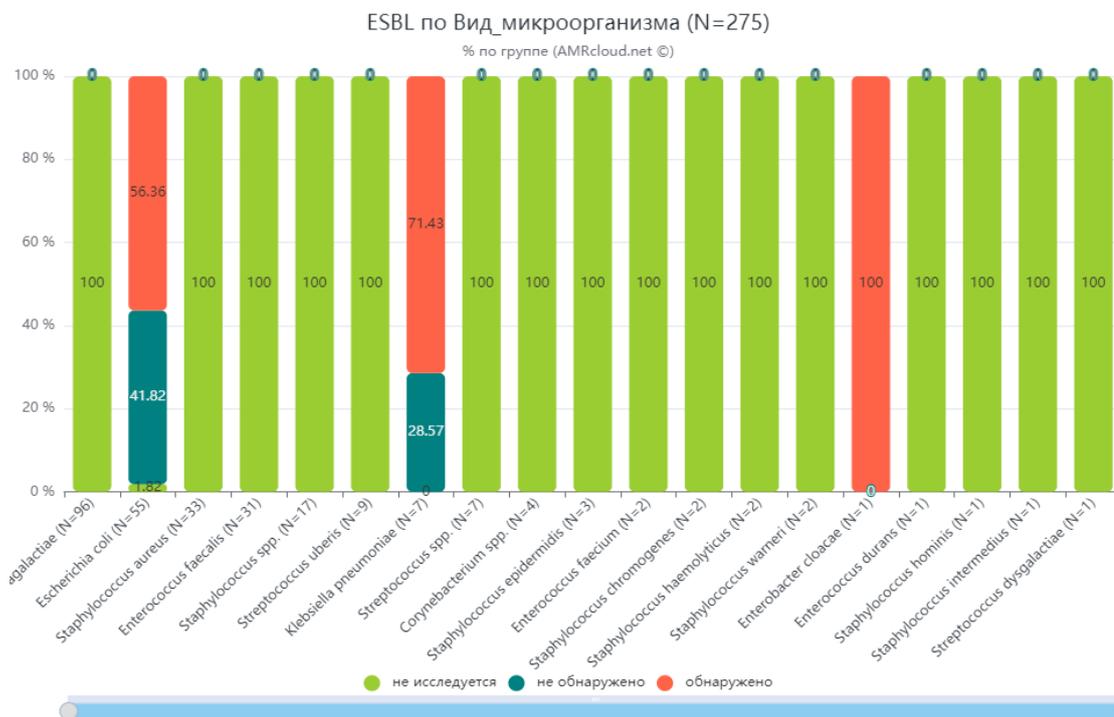


Рисунок 2.2.5.3.5 - Процентное соотношение изолятов семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующих бета-лактамазы, к общему спектру выделенных микроорганизмов (AMRcloud)

Отмечена антибиотикорезистентность к цефалоспорином 1-го и 2-го поколения у изучаемых грамотрицательных микроорганизмов.

Наиболее важный механизм устойчивости грамотрицательных бактерий к цефалоспорином связан с продукцией бета-лактамаз, причем наибольшую угрозу представляют бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), способные гидролизовать цефалоспорины широкого спектра.

У *K.pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* и *E.coli* установлена приобретенная устойчивость к бета-лактамам антибактериальным препаратам, что ограничивает их применение для лечения животных с бактериальными инфекциями, вызванными этими возбудителями. При анализе полученных данных особую обеспокоенность вызывает увеличение доли полирезистентных штаммов *K.pneumoniae*, *E.coli* и *Ps. aeruginosa*, а также появление в последние годы экстремально резистентных штаммов.

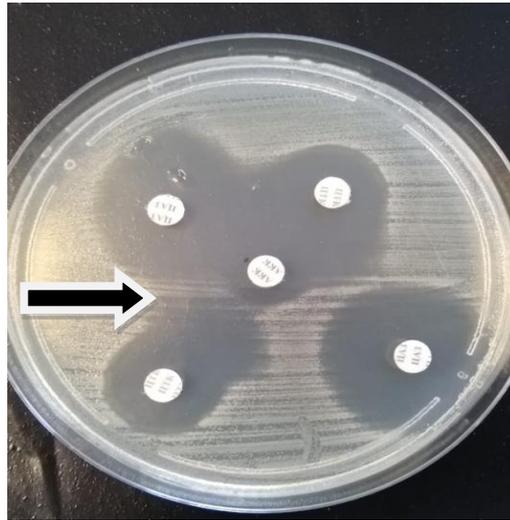


Рисунок 2.2.5.3.6 - *E.coli* с детерминантами резистентности β -лактамазы расширенного спектра (ESBL)

В результате проведения ПЦР-РВ генов приобретенных карбапенемаз группы KPC и OXA-48-подобных и металло- β -лактамаз групп VIM, IMP и NDM обнаружено не было (рис. 2.2.5.3.7).

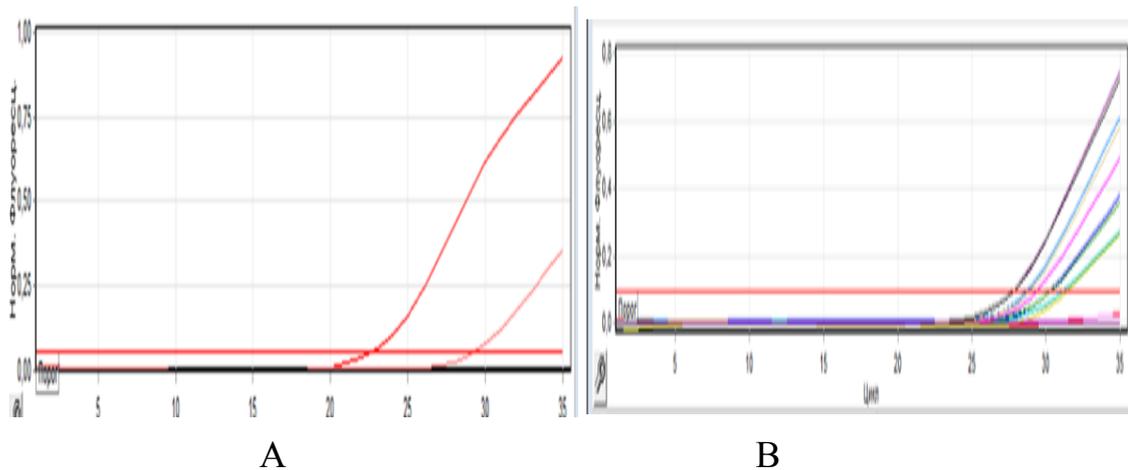


Рисунок 2.2.5.3.7 - А – график регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени свидетельствует о накоплении продуктов амплификации фрагментов генов MBL группы VIM и генов группы OXA-48-подобных положительных контролей; В – график регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени свидетельствует о накоплении продуктов амплификации внутренних контролей

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в настоящее время становится актуальной проблема циркуляции возбудителей, обладающих множественной устойчивостью к АМП.

Важно проводить систему лабораторного контроля за механизмами антимикробной резистентности.

Согласно современным представлениям, использование правильно подобранного антибиотика для исследования в совокупности с корректной идентификацией выделенного возбудителя позволяет предположить наличие механизмов резистентности и предсказать его резистентность к другим, близким по структуре или механизму действию АМП.

Ранжирование АМП для терапевтических целей и для проведения эпизоотологического наблюдения за антибиотикорезистентностью, экстраполирование резистентности к антимикробным препаратам и их выборочное репортирование, учитывая список АМП ВОЗ, имеющих критическое значение в медицине, результаты выявления механизмов резистентности позволяют повысить качество лабораторных исследований в ветеринарных лабораториях.

Правильный выбор антимикробных препаратов для лечения животных с учётом характеристики фенотипа резистентности на основании результатов исследований, предположение механизмов резистентности при интерпретации биологической чувствительности микроорганизмов по эпидемиологическим точкам отсечения (ECOFF) и прогнозирование фенотипа резистентности к другим антибиотикам позволят ветеринарным врачам дать наиболее достоверные терапевтические рекомендации.

Наиболее полное и систематизированное описание данной стратегии представлено в документе Европейского комитета по определению чувствительности (EUCAST) под названием «Экспертные правила определения чувствительности к антибиотикам EUCAST» [248].

Лечение должно быть комплексным, направленным на макроорганизм для повышения его резистентности и на микроорганизмы, ослабляя или уничтожая их с учетом эндо-и экзоэкологии (рисунок 2.2.5.3.8).



Рисунок 2.2.5.3.8 - Комплексная схема лечения, профилактики и мер борьбы с бактериальными инфекциями крупного рогатого скота

2.2.6 Фармако - токсикологические испытания препарата Азициклина

2.2.6.1 Характеристика антимикробного препарата Азициклина и его антимикробная активность

Для изучения острой и субхронической (подострой) токсичности, раздражающего и аллергического действия представлен препарат Азициклин, разработанный компанией ООО «НВЦ Агроветзащита» (Сергиев Посад).

В 1 г препарата Азициклина в качестве действующих веществ содержатся азитромицин дигидрат (140 мг), доксициклин гиклат (70 мг), эмидонол (250 мг), а также вспомогательные вещества: поливинилпирролидон, лецитин, стеарилфумарат натрия, ферол-А.

Антимикробная активность препарата Азициклина была изучена нами в отношении клинических изолятов, обладающих множественной устойчивостью к АМП гипермукоидного микроорганизма *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* и *S. haemolytica*, изолированных у телят с респираторной патологией.

При приготовлении инокулюма бактериальных культур использовали суточные культуры, оптическая плотность смыва их с агаровой среды (концентрация живых бактериальных клеток) при визуальном контроле соответствует 0,5 стандарту мутности по МакФарланду.

Результаты оценки антимикробной активности препарата методом серийных разведений представлены в таблицах 2.2.6.1.1 - 2.2.6.1.2.

При проведении исследований чувствительности выделенных микроорганизмов к доксициклину и азитромицину бактериальные популяции характеризовались гетерогенностью, т.е. наличием двух субпопуляций, одна из которых была восприимчива, другая устойчива к антибиотикам. При определении МИК выявлено бимодальное распределение изолятов с образованием чувствительной и резистентной популяций. Формирование полирезистентных фенотипов микроорганизмов способствовало проведению исследований комбинированного антимикробного препарата Азициклина.

Установили, что Азициклин обладает *in vitro* выраженной антимикробной активностью по отношению к грамположительным и грамотрицательным

бактериям, изолированным от крупного рогатого скота. МИК препарата Азициклина составляет для грамположительной и грамотрицательной микрофлоры *S. haemolytica* и *S.aureus* 0,4 мкг/мл, *E. coli* 3,2 мкг/мл и *Klebsiella pneumoniae* 6,5 мкг/мл.

Таблица 2.2.6.1.1 - Антимикробная активность препарата Азициклин при определении методом серийных разведений

Клинические изоляты	Концентрация препарата, мкг/мл						
	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,5	13,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolytica</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	-	-
Контроль (без АМП)	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - рост микробной культуры, «-» - отсутствие роста

Таблица 2.2.6.1.2 - Минимально ингибирующая концентрация (МИК) препарата Азициклин при определении методами серийных разведений

Клинические изоляты	Метод
	серийных разведений
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,4
<i>Staphylococcus haemolytica</i>	0,4
<i>Escherichia coli</i>	3,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,5

Отмечали отсутствие роста *E.coli* при концентрациях азитромицина 16 мг/л, а при концентрациях доксициклина 4 мг/л. Значения МИК *E.coli* для азитромицина и доксициклина составили ≥ 16 мг/л и ≥ 4 мг/л соответственно согласно критериям ЕСOFF.

Отмечали отсутствие роста *S. aureus* и *S. haemolytica* при концентрациях доксициклина 0,4 мг/л, а при концентрациях азитромицина 2 мг/л. Значения

МИК *S. aureus* для азитромицина и доксициклина составили ≥ 2 мг/л и $\geq 0,5$ мг/л соответственно согласно критериям ЕСOFF.

У *K. pneumoniae* наблюдали отсутствие роста при концентрациях азитромицина 32 мг/л, при концентрациях доксициклина 8 мг/л, что превышало значение МИК в одно разведение для азитромицина и доксициклина составили ≥ 16 мг/л и ≥ 4 мг/л соответственно согласно критериям ЕСOFF.

Фармакодинамика (ФД) Азициклина, в состав которого входит АМП из группы макролидов и тетрациклинов, связана с ФД-эффектами в интервале дозирования (или в 24-часовой период), входит в категорию АМП, зависимых от комбинации времени (возможно сокращение до 12 - часового периода) и концентрации.

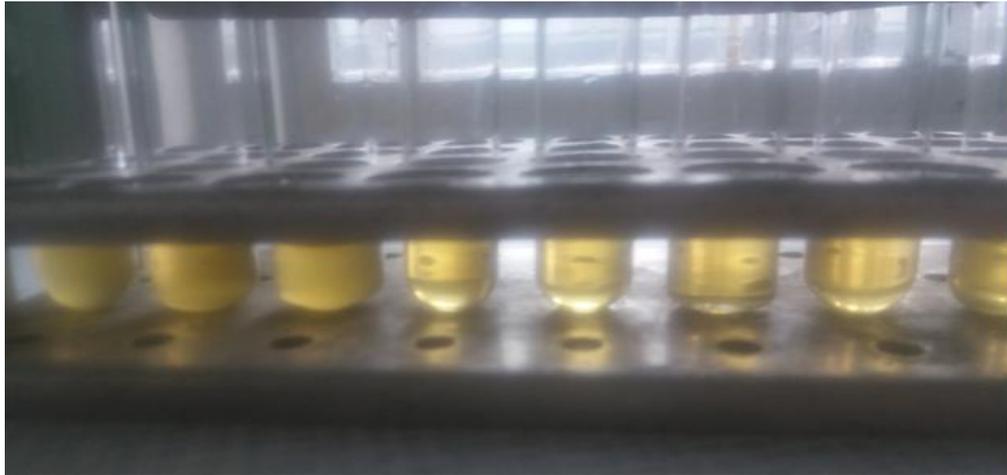
В случае высокого значения МИК (превышающего диапазон чувствительности) может потребоваться модификация дозирования АМП или переход на другой антибиотик с более низким МИК, ниже пограничной чувствительности.

На основании значения МИК дозирование АМП можно корректировать:

- обычная доза, если МИК соответствует профилю чувствительности бактерий дикого типа;
- более высокая доза, если МИК попадает в диапазон бактерий недикого типа, но все еще находится в диапазоне чувствительности;
- максимальная доза, если МИК находится на умеренно – резистентном уровне.

Значение МИК важно для эффективного дозирования антимикробного препарата. Оно определяет величину экспозиции антимикробного препарата, необходимую для достижения целевой фармакокинетики/фармакодинамики, связанной с максимальной эффективностью.

По результатам наших исследований, можно заключить, что препарат Азициклин является эффективным препаратом для лечения телят с ассоциированными инфекционными болезнями, возбудителями которых являются грамположительные и грамотрицательные патогенные микроорганизмы.



К+ 0,2 0,4 0,8 1,6 3,2 6,5 13,12



К+

0,2

0,4

Рост микробной культуры *Staphylococcus haemolytica* в контроле (без антибиотика Азициклин) и при разных концентрациях Азициклина



Отсутствие роста микроорганизмов на плотной среде *Staphylococcus haemolytica*

Рисунок 2.2.6.1.1 - Антимикробная активность Азициклина

2.2.6.2 Изучение острой токсичности препарата Азициклина

Для определения острой токсичности препарат Азициклин вводили перорально через зонд в желудок белым мышам по 0,6 мл - предельно допустимый объем для введения.

Введение препарата Азициклина перорально однократно в дозах 10; 20 и 30 г/кг не вызвало гибели мышей и проявления признаков интоксикации до 14 суток после введения. Максимально возможной дозой для перорального введения мышам была 30000 мг/кг. Препарат Азициклин согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к малоопасным веществам (4-й класс опасности).

Изучение острой токсичности проводили на лабораторных крысах путем введения в желудок. В ходе эксперимента были испытаны дозы в диапазоне 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 г/кг. В течение 2-х недель за животными велось наблюдение. Результаты представлены в таблице 2.2.6.2.1.

Таблица 2.2.6.2.1. – Показатели острой токсичности препарата Азициклин при пероральном введении

Группа животных	Подопытные				Контрольная дистиллированная вода
	30,0	40,0	50,0	60,0	
Доза г/кг					
Выжило	6	4	2	0	6
Погибло	0	2	4	6	0
Z	0	1,0	3,0	5,0	0
D	10,0	10,0	10,0	10,0	0
Zx D	0	10,0	30,0	50,0	0

Примечание: условные обозначения Z – среднее арифметическое из числа животных, у которых отмечен учитываемый эффект под влиянием 2-х смежных доз; d – интервал между двумя смежными дозами.

Для определения ЛД₅₀ использовали формулу Кербера в модификации Прозорского.

Определение ЛД₅₀ проводили по формуле: $ЛД_{50} = ЛД_{100} - \sum Zd : n$

Z – среднее арифметическое из числа животных, у которых отмечен учитываемый эффект под влиянием 2-х смежных доз; d – интервал между двумя смежными дозами; n – количество животных в каждой испытуемой группе.

ЛД₅₀ = 60 - 90:6 = составила 45 г/ кг. С помощью графического метода анализа зависимости «доза-эффект».

Для этого результаты гибели животных от каждой из суммарных доз были нанесены на график в двойном логарифмическом масштабе, а затем аппроксимированы прямой. От точек, соответствующих введенным дозам, был опущен перпендикуляр до пересечения с осью абсцисс. С помощью полученного графика определены ЛД₁₆ и ЛД₈₄, которые составили – 39 г/кг и 51 г/кг, соответственно. Стандартная ошибка устанавливалась по формуле Гаддама и составила 2,37 г/ кг.

$$S = \sqrt{K * s * d : n},$$

где K = 0,564; d – среднее; s = (ЛД₈₄ – ЛД₁₆): 2; n- количество животных в каждой испытуемой группе.

$$\text{Стандартная ошибка ЛД}_{50}(S) = \sqrt{0,564 * 6 * 10 : 6} = 2,37 \text{ г/кг.}$$

Таким образом, ЛД₅₀ препарата Азициклина составляет 45±2,37 г/кг массы тела. Согласно классификации (ГОСТ 12.1.007-76), препарат Азициклин малотоксичное соединение (4-й класс опасности) [44].

Клиническая картина острого отравления характеризовалась выраженным угнетением, вялостью животных, пониженной подвижностью. У подопытных животных наблюдались нарушения дыхания и координации движения. Смерть наступала от остановки дыхания. У выживших животных от признаков токсикоза постепенно исчезали, но шерсть оставалась взъероженной.

При проведении патологоанатомического вскрытия у погибших животных было отмечено некоторое полнокровие внутренних органов и умеренная гиперемия слизистой желудка и печени.

Для характеристики степени развития острого смертельного отравления, помимо величины LD_{50} , указывающей на степень токсичности, определялась величина S (функция угла наклона прямой смертельных доз к оси абсцисс), характеризующая опасность препарата в условиях введения в желудок ($LD_{84} / LD_{50} + LD_{50} / LD_{16}$): $2=1,14$

В результате эта величина составила 1,14, что свидетельствует о незначительной опасности развития острого отравления препаратом в условиях однократного применения. Определены LD_{16} и LD_{84} , которые составили – 39 г/кг и 51 г/кг, соответственно. Стандартная ошибка устанавливалась по формуле Гада и составила 2,37 г/кг.

Таким образом, LD_{50} препарата Азициклина составляет $45 \pm 2,37$ г/кг массы тела. Согласно классификации (ГОСТ 12.1.007-76), препарат – Азициклин малотоксичное соединение (4-й класс опасности) [44].

Клиническая картина острого отравления животных характеризовалась выраженным угнетением, вялостью животных, пониженной подвижностью. У подопытных животных наблюдались нарушения дыхания и координации движения. Смерть наступала от остановки дыхания. У выжившего животного явления токсикоза постепенно исчезали, но шерсть оставалась взъерошенной.

При проведении патологоанатомического вскрытия у погибших животных было отмечено некоторое полнокровие внутренних органов и умеренная гиперемия слизистой желудка и печени.

2.2.6.3 Изучение субхронической токсичности препарата Азициклина

Экспериментальные исследования по изучению субхронической токсичности (подострой токсичности) проводили в условиях лаборатории на крысах, масса которых составляла 230-240 г в течение 21 сут.

Препарат Азициклин при изучении подострой (субхронической) токсичности животным вводили перорально в дозах 90 мкг/кг, 225 мкг/кг, 450

мкг/кг, при этом масса тела подопытных крыс достоверно не отличалась от массы тела животных из контрольной группы. На протяжении курса введения Азициклина температура тела у животных подопытных групп не отличалась от физиологической нормы и аналогичных показателей контрольных групп животных, не установлено изменения частоты дыхания и температуры тела животных.

Отрицательное влияние препарата на организм крыс при длительном введении в разных дозах оценивали на основании изменения массы тела, гематологических и биохимических показателей (табл. 2.2.6.3.1., табл. 2.2.6.3.2).

В течение эксперимента вели наблюдение за состоянием и поведением животных, динамикой роста массы тела, регулярно проводили исследования по оценке функционального состояния печени, почек и изучали влияние препарата Азициклин на гематологические показатели.

Таблица 2.2.6.3.1 - Функциональное состояние периферической крови крыс при введении Азициклина в трех дозах в течение 21 сут

Показатели крови	Группы животных			
	90мкг/кг	225 мкг/кг	450 мкг/кг	Контроль
Гемоглобин (HGB), г/л	156,3±4,3	140,3±3,5	158,3±1,5	150,5±3,8
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	5,8±2,1	6,9±1,9	6,1±0,9	6,5±0,8
Лейкоциты (WBC), 10 ⁹ /л	8,3±1,9	9,3±1,5	7,7±1,5	8,9±0,6
Гранулоциты, %	1,5±0,5	1,9±1,8	1,8±3,1	1,2±0,5
Тромбоциты (PLT), 10 ⁹ /л	447,8±15,1	457,1±16,9	450,1±14,9	455,2±16,4
Эритроциты (RBC), 10 ¹² /л	6,2±0,9	6,5±1,5	7,2±1,1	6,8±0,6
Примечание: n=10, p≥0,5				

В таблице 2.2.6.3.2 приведены результаты динамики прироста массы тела у крыс в сравнении с контролем.

Также нами были изучены в ходе эксперимента биохимические показатели крови животных подопытной группы, они также не имели достоверных различий с контрольной группой животных.

Таблица 2.2.6.3.2 - Динамика прироста массы тела у крыс при введении Азициклина в трех дозах в течение 21 сут

Сутки	Дозы препарата, мг/кг			Контроль (вода для инъекций)
	90	225	450	
0	241,83±3,37	235,00±3,37	241,83±2,73	238,67±10,71
7	252,94±3,83*	248,05±2,69*	248,05±2,69*	252,94±3,83*
14	267,87±2,69*	254,30±2,81*	252,53±3,26	264,87±3,72*
21	254,96±3,45*	264±3,45*	274±3,12*	274,87±2,92
Примечание*: n=10, p≥0,5				

В таблице 2.2.6.3.3 приведены результаты определения биохимических показателей сыворотки крови крыс после многократного введения Азициклина в трех разных дозах.

Результаты наших исследований показали, что в течение опыта признаков интоксикации у лабораторных животных не отмечалось. Все животные как опытной, так и контрольной группы были активными, волосяной покров блестящий и приглажен. Реакция на внешние раздражители сохранена. Признаков гибели и токсикоза животных, не наблюдали, что дает основание утверждать об отсутствии у препарата в указанных дозах эффекта кумуляции по токсическому признаку. Препарат Азициклин в выше указанных дозах не оказывал влияния на изменение живой массы.

С целью оценки функционального состояния печени определяли концентрацию общего белка и его фракций в сыворотке крови крыс, ферментный спектр включал определение активности индикаторных ферментов АсАт и АлАт. О состоянии функциональной активности почек судили по концентрации мочевины в сыворотке крови животных.

Анализ биохимических показателей крови животных разных групп при длительном введении препарата Азициклин не выявил статистически значимые

изменения белкового обмена, которое проявлялось бы достоверным снижением концентрации общего белка и его фракций в сыворотке крови животных опытных групп. В то же время следует отметить дозозависимую тенденцию к снижению уровня общего белка. Результаты биохимического анализа крови крыс после 21-суточного введения Азициклина приведены в таблице 2.2.6.3.3.

Таблица 2.2.6.3.3 - Влияние Азициклина на биохимические показатели крови в трех дозах при пероральном введении в течение 21 сут (n=10, p≤0,5)

Показатель	Дозы, мг/кг			Контроль (физ. раствор)
	450	225	90	
Общий белок, г/л	59,83±1,87	67,67±2,17	69,17±1,30	69,00±0,82
Креатинин, 259 микр/л	46,67±2,81	47,83±2,34	40,83±2,30	38,17±4,94
Мочевина, 259 микр/л	6,78±,49	7,15±0,42	6,38±0,26	6,33±0,51
Глюкоза, 259 микр/л	5,05±0,17	5,28±0,28	5,65±0,28	5,05±0,32
Билирубин общий, мкмоль/л	11,13±1,06	11,60±0,67	10,92±0,89	9,72±1,15
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,75±0,36	2,80±0,55	2,13±0,35	1,37±0,34
Аланин- аминотрансфераза (АлАт), МЕ/л	67,33±4,77	58,00±3,45	55,00±2,84	63,67±3,80
Аспартат- Аминотрансфераза (АсАт), МЕ/л	179,67±14,06	178,83±16,39	166,67±14,62	167,83±12,04
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	231,00±15,95	192,17± 12,53	207,67± 16,89	206,67±9,30
Альфа-Амилаза, общая, МЕ/л	555,50±29,24	553,83± 31,82	485,00± 76,19	678,50±73,54
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), МЕ/л	1894,33±231,80	1923,67± 102,81	1889,17± 165,53	1830,33± 101,31
Примечание: достоверность различий с соответствующим показателем контрольной группы, p≥0,5				

Следует отметить, что антиоксидант Эмиданол, входящий в состав Азициклина, обладает выраженным гепатопротекторным и антитоксическим эффектом.

Вместе с этим активность лактатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы оставалась в пределах физиологических границ.

При анализе биохимических показателей крови животных, позволяющих судить о влиянии препарата на печень и почки (АлАт, АсАт, ЛДГ, мочевины), не было выявлено достоверных изменений, что свидетельствовало о нормальном функционировании мочевыделительной и гепатобилиарной систем организма крыс. Биохимические показатели не претерпели статистически значимых изменений и находились в пределах физиологической нормы, однако в то же время следует отметить дозозависимую тенденцию к повышению уровня креатинина, общего и прямого билирубина. Описанные изменения носили более функциональный характер (повышение уровня ферментов было незначительным).

В группе животных, которым вводили минимальную дозу Азициклина, уровень фермента альфа-амилазы был самым низким: 485 против 678,5 МЕ/л в контроле, снижение концентрации альфа-амилазы не было дозозависимым. Микроскопическое исследование внутренних органов не выявило патологии в печени, почках, селезенке и сердце, что подтверждает вывод об отсутствии дистрофических изменений в этих органах.

В данном исследовании испытывали дозы препарата Азициклина, превышающие терапевтическую, а также курс обработки составил 21 сут, в то время как согласно рекомендациям по применению данного препарата, курс лечения обычно не превышает 3-5 кратных введений. Учитывая вышесказанное, при соблюдении режима дозирования появление побочных реакций маловероятно.

2.2.6.4 Раздражающее и аллергическое действие препарата Азициклина

Раздражающее действие препарата Азициклина изучали на 6 кроликах породы «Белый великан». Препарат наносился на выстриженные участки кожи кроликов, на одной части туловища, размером 4x4 см на протяжении 14 сут.

Реакцию кожи оценивали по шкале Суворова. В другой серии опыта, препарат наносили на другую сторону туловища, размером 4x4 см при экспозиции 4 ч, 5 раз в неделю, на протяжении 20-ти сут [16,17, 178].

Не отмечено покраснения кожи, утолщения кожной складки и выпадения подстриженной шерсти и шерсти, граничащей с выстриженными участками. При пальпации выстриженных участков кожи не наблюдали болезненной реакции у животных.

Оценку алергизирующего действия препарата Азициклина проводили при помощи конъюнктивальной пробы на кроликах.

Препарат Азициклин в количестве 3-х капель вводили в конъюнктивальный мешок одного глаза. Наблюдение за состоянием животных проводили в течение 14 сут.

Оценку раздражающего действия проводили через 1, 2, 3, 4 и 24 ч, 3- 7 и 14 сут визуально по изменению кровенаполнения конъюнктивы, наличию лакримации и состоянию роговицы по 10 бальной системе согласно таблице 2.2.6.4.1.

Таблица 2.2.6.4.1 - Оценка раздражающего действия препарата Азициклина на слизистые оболочки глаз

Интенсивность реакции	Раздражающий эффект	Оценка в баллах
Отсутствие реакции	Отсутствует	0
Слабая реакция	Слабый	2
Выраженная гиперемия	Слабо выраженный	4
Наличие лакримации	Умеренный	6
Наличие выделений	Выраженный	8
Длительная, ярко выраженная гиперемия, отек век	Сильно выраженный	10

При изучении раздражающего действия препарата на кожу и конъюнктиву глаза кроликов было установлено, что препарат Азициклин раздражающим

действием не обладает: через 1 и 7, 14 сут ни у одного из 6 взятых в опыт кроликов не было выявлено признаков воспаления.

Животные подопытных групп достоверно не отличались от животных контрольных групп на всем протяжении опыта.

Согласно классификации (ГОСТ 12.1.007-76) препарат Азициклин – малотоксичное соединение (4-й класс опасности).

2.2.7 Терапевтическая эффективность применения препарата

Азициклина при бактериальных болезнях телят

Результат этого этапа исследования опубликован в статье «Эффективность Азициклина при респираторных инфекциях телят бактериальной этиологии» [101].

2.2.7.1 Результаты терапевтической эффективности применения препарата Азициклина при остром бронхите телят бактериальной этиологии

В производственном эксперименте Псковской области в подопытной группе устойчивый лечебный эффект от применения препарата наблюдали у телят на второй и четвертый день выпаивания, что коррелировало со степенью тяжести (легкая, среднетяжелая и тяжелая). В контрольной группе лечебный эффект наступал на третий день лечения.

При использовании Азициклина пероральным способом, установлено, что доза 0,25 г на 10 кг массы тела животного, применяемая 3-кратно с интервалом 24 часа, является наиболее оптимальной для лечения телят с острым бронхитом, вызванным возбудителями бактериальной этиологии (улучшалось общее состояние животных, дыхание становилось мягче, хрипы не прослушивались, температура была в норме). На основании значения МИК установлена обычная доза, если МИК соответствует профилю чувствительности бактерий дикого типа.

Применение препарата Азициклина оказалось более эффективным, чем лечение по схеме, применяемой в хозяйстве. Испытуемый препарат обеспечивает более раннее выздоровление и высокую сохранность животных. Результаты изучения терапевтической эффективности Азициклина представлены в таблице 2.2.7.1.1.

Таблица 2.2.7.1.1 - Бактериологические результаты схемы применения Азициклина при остром бронхите телят

Микроорганизмы	5 сутки До лечения	15 сутки После лечения
1.Схема лечения: Азициклин		
<i>Staphylococcus aureus</i> , количество, Лес-, КОЕ/мл	$9,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^9$
<i>Staphylococcus aureus</i> , Лес+, КОЕ/мл	$6,0 \times 10^9$	Не обнаружено
<i>E. coli</i> , гемолиз -	$5,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
<i>E. coli</i> , гемолиз+	$8,0 \times 10^9$	Не обнаружено
2.Схема лечения: стандартная схема лечения		
<i>Staphylococcus aureus</i> , количество, Лес-, КОЕ/мл	$2,1 \times 10^9$	$4,1 \times 10^9$
<i>Staphylococcus aureus</i> , Лес+, КОЕ/мл	$5,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
<i>E. coli</i> , гемолиз -	$1,9 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
<i>E. coli</i> , гемолиз+	$2,0 \times 10^9$	Не обнаружено
Примечание: <i>S. aureus</i> Лес+ или Лес—лецитиназоположительный или лецитиназоотрицательный изолят; <i>E. Coli</i> , гемолиз+ - с гемолитической активностью, <i>E. Coli</i> , гемолиз- - отсутствие гемолитической активности.		

При выборе комбинации АМП необходимо стремиться к усилению антимикробной активности, расширению спектра антимикробного действия, снижению тяжести побочных эффектов с учетом циркуляции микоплазменной инфекции в хозяйстве.

Среди животных контрольной группы, получавших обычное лечение, молекулярно-биологическим методом обнаружена персистенция микроорганизмов рода *Mycoplasma bovis* и *Ureaplasma diversum* у телят контрольной группы до и после лечения.

Как отражено в таблице 2.2.7.1.1 при анализе характера изменений микрофлоры, изолированной из слизистых истечений носовых ходов телят до лечения и после. Установлено, что у телят, получавших Азициклин, произошла элиминация *S. aureus*, обладающих факторами вирулентности, а также у телят выявили увеличение количества облигатных *S. aureus*.

Среди животных контрольной группы, получавших обычное лечение, принятое в хозяйстве, обнаружены микроорганизмы *S. aureus*, обладающие факторами вирулентности.

При исследовании антимикробного действия комплексного препарата Азициклин на микроорганизмы, энтеропатогенную *E. coli* в пробах не обнаруживали, что указывает на высокую противомикробную активность препарата.

Азициклин не уступал по терапевтической эффективности схемы, применяемой в хозяйстве, а учитывая сроки выздоровления и кратность обработок – даже превосходил.

2.2.7.2. Результаты терапевтической эффективности применения препарата Азициклина при хронической бронхопневмонии и серозно-катаральной пневмонии телят

При исследовании различных доз Азициклина установлено, что доза 0,25 г/10 кг массы животного, применяемая пятикратно с интервалом 24 часа, является наиболее оптимальной для лечения телят с хронической бронхопневмонией и серозно – катаральной пневмонией, осложненной микоплазмами.

Применение препарата Азициклина оказалось более эффективным, чем лечение по схеме, применяемой в хозяйстве. Данный препарат обеспечивал более раннее выздоровление и высокую сохранность животных.

В подопытной группе терапевтический эффект препарата Азициклин наблюдали у телят на второй и четвертый день выпаивания, он зависел от степени тяжести течения (легкая, среднетяжелая и тяжелая). В контрольной группе телят лечебный эффект наступал на пятый день лечения.

Качественный и количественный состав микрофлоры, изолированной от телят, больных бронхопневмонией и серозно – катаральной пневмонией, осложненной микоплазмами, исследовали в динамике – в 5-суточном и 12 – суточном возрасте. Полученные данные представлены в таблице 2.2.7.2.1.

В таблице 2.2.7.2.1 при анализе характера изменений микрофлоры, изолированной из слизистых истечений носовых ходов до лечения у телят, установлено, что у телят, получавших Азициклин, произошла элиминация *S. aureus*, обладавших факторами вирулентности, а также выявили увеличение количества облигатных *S. aureus*.

Среди животных контрольной группы, получавших стандартное лечение, изменения в видовом составе микрофлоры не выражены. Обнаружена персистенция микроорганизмов рода *Mycoplasma bovis* и *Ureaplasma diversum* у телят контрольной группы.

У телят до лечения бактериологическим методом выявили наличие патогенных *S. aureus*, было отмечено выделение возбудителя после лечения. Увеличение количества облигатной микрофлоры у телят контрольной группы менее выражены, чем в подопытных.

Таблица 2.2.7.2.2- Влияние препарата Азициклина на производственные показатели при выращивании телят

Производственные показатели	Схема лечения	
	Схема с применением препарата Азициклин	Стандартная схема
Количество телят в группе, голов	10	10
Масса телят к 1,5-2 месяцам, кг	60 – 67*	50 – 60*
Среднесуточный прирост, кг	0,830±0,81**	0,710±0,86**
Пало телят, голов	1	3
Пало, %	6,66	20
Сохранность,%	93,34	80,0
Примечание : достоверность различий с соответствующим показателем контрольной группы, *- (P<0,05); ** - (P<0,01).		

Как видно из данных таблицы 2.2.7.2.2, применение комбинированного препарата Азициклин телятам, больным бронхопневмониями в течение пяти суток положительно повлияло на их сохранность и продуктивность.

Таблица 2.2.7.2.1 – Результаты применения Азициклина при хронической бронхопневмонии телят, осложненной микоплазмами

№ п\п	Лечение	Микроорганизм	Количество, КОЕ/мл	Характер изменений микрофлоры после лечения
1 . Схема лечения: Азициклин				
1	До лечения	<i>S. aureus</i> + МусПЦР	8,0x10 ⁷	Увеличение количества облигатной <i>S. aureus</i> на lg2, элиминация <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>Ureaplasma diversum</i> , преобладают лецитиназоотрицательного варианта <i>S. aureus</i> и <i>KOSt</i>
	После лечения	<i>S. aureus Lec+</i> <i>S. aureus Lec-, KOSt</i>	2,4x10 ⁹ 6,0x10 ⁹	
2	До лечения	<i>S. aureus</i> + МусПЦР	4,0x10 ⁹	Увеличение количества облигатной <i>S. aureus</i> на lg1, элиминация <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>Ureaplasma diversum</i> , преобладают лецитиназоотрицательного варианта <i>S. aureus</i> и <i>KOSt</i>
	После лечения	<i>S. aureus Lec+</i> <i>S. aureus Lec-, KOSt</i>	1,1x10 ¹⁰ 1,9x10 ⁹	
3	До лечения	<i>S. aureus</i> + МусПЦР	1,1x10 ¹⁰	Персистенция <i>S. aureus</i> , обладающего факторами вирулентности, элиминация <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>Ureaplasma diversum</i> и <i>KOSt</i>
	После лечения	<i>S. aureus Lec-</i> , <i>KOSt</i>	1,2x10 ¹¹ 1,4x10 ¹⁰	
4	До лечения	<i>S. aureus</i>	8,2x10 ⁸	Увеличение количества облигатной <i>S. aureus</i> на lg2 – lg3
	После лечения	<i>S. aureus Lec+</i> <i>S. aureus Lec-, KOSt</i>	1,6x10 ⁹ 1,2x10 ¹⁰	
5	До лечения	<i>S. aureus</i>	8,2x10 ⁸	Увеличение количества облигатной <i>S. aureus</i> на lg2 – lg3
	После лечения	<i>S. aureus Lec+</i> <i>S. aureus Lec-, KOSt</i>	1,6x10 ⁹ 1,2x10 ¹⁰	

Продолжение таблицы 2.2.7.2.1 - Результаты применения Азициклина при хронической бронхопневмонии телят, осложненной микоплазмами

2. Схема лечения: стандартная схема лечения				
6	До лечения	<i>S. aureus</i> + <i>МусПЦР</i>	$8,0 \times 10^6$	Увеличение количества облигатной <i>S. aureus</i> на <i>lg1</i> , персистенция <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>Ureaplasma diversum</i>
	После лечения	<i>S. aureus</i> + <i>МусПЦР</i>	$1,2 \times 10^7$	
7	До лечения	<i>S. aureus</i>	$1,3 \times 10^7$	Уменьшение количества облигатной <i>S. aureus</i> на <i>lg1</i>
	После лечения	<i>S. aureus</i>	$4,0 \times 10^6$	
8	До лечения	<i>S. aureus</i> + <i>МусПЦР</i>	$1,3 \times 10^7$	Уменьшение количества облигатной <i>S. aureus</i> на <i>lg1</i> персистенция <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>Ureaplasma diversum</i>
	После лечения	<i>S. aureus</i> + <i>МусПЦР</i>	$4,0 \times 10^6$	
9	До лечения	<i>S. aureus Lec+</i>	$1,6 \times 10^9$	Увеличение количества облигатной <i>S. aureus</i> на <i>lg2 – lg3</i> и <i>KOSt</i>
	После лечения	<i>S. aureus Lec-</i> , <i>KOSt</i>	$1,1 \times 10^{10}$	
10	До лечения	<i>S. aureus Lec+</i>	$1,6 \times 10^9$	Увеличение количества облигатной <i>S. aureus</i> на <i>lg2 – lg3</i> и <i>KOSt</i>
	После лечения	<i>S. aureus Lec-</i> , <i>KOSt</i>	$1,4 \times 10^{10}$	

Условные обозначения: *S. aureus Lec+* или *Lec*—лецитиназоположительный или лецитиназоотрицательный изолят; *KOSt* коагулазаотрицательные *Staphylococcus sp.*; *МусПЦР* – наличие *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum* выявлено в ПЦР

В группе животных с применением Азициклина процент сохранности был на 13,34 % больше по сравнению с группой животных, где применялась стандартная схема лечения. Выпаивание препарата Азициклин позволило увеличить среднесуточный прирост массы телят в опытной группе животных на 120 г или на 16,9% по сравнению с контрольной группой животных со стандартной схемой лечения.

Установлена целесообразность применения комплексного препарата Азициклина для антибактериальной терапии больных телят с респираторной патологией, ассоциированных с атипичными возбудителями *U. diversum* и *M. bovis*.

2.2.7.3 Влияние антибактериального препарата Азициклина на клинические и биохимические показатели крови здоровых и больных телят с респираторной патологией

Проводили исследование проб крови у больных телят с бронхопневмонией до применения препарата Азициклин у подопытных и контрольных групп телят. Подопытные группы телят, отличающиеся кратностью введения препарата. Курс терапии составил 3 -5 дней в зависимости от динамики выздоровления. Результаты данных представлены в таблице 2.2.7.3.1.

Режимы дозирования Азициклина определяли для легких и среднетяжелых степеней тяжести течения болезни. Сухой кашель наблюдали у телят со средней тяжестью бронхопневмонии.

Бронхопневмония легкой степени тяжести сопровождалась повышением СОЭ в крови телят в среднем в 2 раза по сравнению с таковой у здорового молодняка. Отмечается у больных телят снижение уровня эритроцитов, что связано с гипоксией вследствие бронхопневмонии. Отмечено незначительное увеличение содержания уровня сегментоядерных нейтрофилов, что связано с воспалительным процессом в макроорганизме. Доля сегментоядерных нейтрофилов достоверно увеличивалась в крови телят с тяжелой формой болезни.

Гематологические показатели у молодняка с легкой степенью болезни нормализовались на 5-7 день после начала терапии, у среднетяжелых животных – на 7-9 день после лечения.

Таблица 2.2.7.3.1 - Влияние препарата Азициклина на клинические показатели крови больных телят с респираторными симптомокомплексами

Показатель крови	Группа животных			
	Больные телята (1сут) (до начало терапии)	После применения препарата Азициклин		Контрольная группа
		5 сут	7 сут	
Лимфоциты,%	40,31±3,26	45,4±3,4*	43,5±2,66*	56,25±3,4
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	408±47	468±38	425±56	425±56
Лейкоциты, (WBC),10 ⁹ /л	10,70±0,67	9,59±0,49	8,70±0,46	8,70±0,78
Эритроциты (RBC), 10 ¹² /л	5,70±0,67	6,90±0,49	6,0±0,46	7,5±0,67
Юные Нейтрофилы,%	1,50±0,81	1,18±0,55	1,24±0,63	0,18±0,09
Палочкоядерные нейтрофилы,%	12,50±0,80	3,90±0,57	3,95±0,42	3,90±0,57
Сегментоядерные Нейтрофилы,%	38,50±1,61	35,90±0,60	36,50±0,61	35,90±0,66
СОЭ, мм/ч	1,5± 0,49	0,7±0,2	0,6±0,1	0,6±0,1
Гемоглобин, г/л	119±7,0	104±3,0	107±4,0	108±4,0
Примечание: * P≤0,01 относительно животных контрольных группы				

В таблице 2.2.7.3.1 после применения препаратов наблюдаем увеличение уровня эритроцитов, отражающей компенсаторную реакцию со стороны макроорганизма; содержание сегментоядерных нейтрофилов в лейкоцитарной формуле отражает снижение воспалительного процесса, что указывает на постепенное выздоровление.

Для изучения влияния комбинированного препарата Азициклина на биохимические показатели телят, отбирали сыворотку крови после применения

препарата в указанных дозировках режимах экспозиции. Данные результатов исследования представлены в таблице 2.2.7.3.2.

Таблица 2.2.7.3.2 - Влияние препарата Азициклина на биохимические показатели крови телят

Показатели	Больные телята (1сут) (до начало терапии)	После применения препарата Азициклин		Контрольная группа
		5 сут	7 сут	
ALB (альбумины), г\л	30± 0,23	31± 0,19	30± 0,19	31± 0,19
ALKP (щелочная фосфатаза), МЕ/л	64±0,17	78±0,29	72±0,29	70±0,29
AMYL (амилаза), МЕ/л	21± 0,24	25 ±0,31	22 ±0,31	22 ±0,21
AST (аспартатаминотрасфераза), МЕ/л	150 ±0,19	145±0,23	143±0,29	142±0,19
BUN (мочевина), ммол/л	3,23± 0,29	2,52±0,21	2,23±0,21	3,6-9,3
Ca (кальций), ммол/л	2,23±0,21	3,18±0,17	2,13±0,21	2,13±0,11
СК (креатинкиназа), МЕ/л	125±0,22	110± 0,19	108± 1,23	107± 1,13
CREA (креатинин), мкмол/л	110±0,65	98± 1,23	99± 1,23	98± 1,13
GGT(гамма – глутамилтранспептидаза), МЕ/л	115±1,22	64 ±1,98	67 ±1,98	66 ±1,88
GLU (глюкоза), ммол/л	2,63 ±0,33	3,8 ±0,21	3,4 ±0,21	3,2 ±0,11
LIPA (липаза), МЕ/л	32± 0,48	45±0,54	43±0,02	42±0,02
Mg (магний), ммол/л	0,6±0,05	0,8±0,02	0,7±0,02	0,6±0,02
NH ₃ (аммиак), ммол/л	96± 0,94	60± 0,73	63± 0,73	63± 0,53
PHOS (фосфор), ммол/л	1,0± 0,53	1,7 ±0,23	1,5 ±0,23	1,5 ±0,13
TBIL (общий билирубин),мкмол/л	1,2 ±1,05	0,54 ±1,07	1,2 ±1,07	1,2 ±1,02
TP (общий белок), г/л	146,61±0,024	65, 44±0,34	69, 44±0,34	65, 44±0,22
Na ⁺ (натрий), ммол/л	122 ±2,32	132± 3,11	142± 3,11	132± 3,09
K ⁺ (калий), ммол/л	2,1±0,65	3,0± 0,72	2,9± 0,72	2,9± 0,62
Cl ⁻ (хлориды), ммол/л	86±1,76	91±1,98	89±1,76	91±1,28
Содержание общего белка, г/л	64,44± 0,11	45,61±0,024	48,61±0, 24	48,61±0, 24

Наблюдается положительная динамика биохимического состава крови животных. После применения препарата Азициклина уровень общего белка на 5-сут и 7-сут снижается на 18,83 и 15,83 усл.ед. у подопытных животных, принимающих Азициклин трехкратно и пятикратно, соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в данном эксперименте наилучшую терапевтическую эффективность показала доза 0,25 г/10 кг массы животного, применяемая трехкратно и пятикратно с интервалом 24 ч в зависимости от динамики выздоровления.

Однако, в случае тяжелого течения респираторных инфекций фармакокинетика изменяется (сильное влияние оказывает органная недостаточность) и доза препарата может быть другой. Более того, необходимо учитывать, что со временем чувствительность патогенов может снизиться (с повышением МИК), тем самым уменьшая вероятность клинического успеха при рекомендуемых режимах дозирования.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований позволяют заключить, что возможно применение Азициклина для лечения телят с бактериальными болезнями телят.

2.2.8. Экономическая эффективность от применения оптимальных схем лечения при бактериальных инфекциях крупного рогатого скота

Результат этого этапа исследования опубликован в отчёте о выполнении тематического плана научно-исследовательских работ по заказу Минсельхоза России за счёт средств федерального бюджета в 2016 году [187].

Экономическое обоснование эффективности применения диагностических, лечебных и профилактических препаратов (табл. 2.2.8.1).

Экономический ущерб от ассоциативного урогенитального микоплазмоза складывается из вынужденного убоя заболевших животных, значительного снижения мясной, молочной продуктивности, аборт, рождения нежизнеспособного молодняка. Нами был изучен экономический ущерб и определён экономический эффект от применения оптимальных схем лечения.

Таблица 2.2.8.1 - Расчетные данные для экономического обоснования при ассоциированном микоплазмозе крупного рогатого скота

Показатели	Единицы Измерения	Количество
1. Среднегодовое поголовье животных	голов	1705
2. Заболело животных	голов	23
3. Из них коров дойных	голов	23
4. Вынуждено убито	голов	3
5. Из них коров дойных	голов	3
6. Средняя масса одной головы	ц	3,2
7. Среднесуточный удой здоровой коровы	кг	21
8. Среднесуточный удой больной коровы	кг	18,6
9. Средняя продолжительность сервисного периода	дни	145
10. Коэффициент возможной заболеваемости	число	0,42
11. Недополученное молоко в пересчёте на кормодни от одной заболевшей коровы	ц	6
12. Закупочная цена 1ц живой массы	руб.	11500
13. Закупочная цена 1ц молока	руб.	2200
14. Денежная выручка от сдачи одной головы на убой	руб.	36800
15. Ветеринарные затраты:		
а) ПЦР диагностика		6468
в) лечебно-профилактические мероприятия	руб	56000
г) прочие расходы		9500

Определение экономического ущерба

А. От вынужденного убоя животных по формуле

$$У_1 = М * Ж * Ц - Сф,$$

где М – количество убитых животных, голов; Ж – средняя живая масса одного животного, ц; Ц – закупочная цена 1 ц живой массы, руб.; Сф – выручка от реализации продуктов убоя, руб.

$$\text{Расчет: } У_1 = 3 * 3,2 * 11500 - 29052 = 81348 \text{ руб.}$$

Б. От недополучения молока, вследствие сдачи на убой дойных коров:

$$У_2 = М_c * Н_m * Ц,$$

где М_с – количество убитых дойных коров, голов; Н_м – количество недополученного молока от убитой коровы, 1 ц; Ц – цена 1 ц молока, руб.

$$\text{Расчет: } У_2 = 3 * 6 * 2200 = 39600 \text{ руб.}$$

В. Общий фактический ущерб:

$$У_0 = У_1 + У_2,$$

где Y_1, Y_2 – виды экономического ущерба в рублях от убоя животных, не до получения молока.

Расчет: $Y_0 = 81348 + 39600 = 120948$ руб.

Г. Ущерб на одно заболевшее животное:

$$K_{y1} = Y_0 : Z,$$

где Y_0 – фактический экономический ущерб, руб.; Z – количество заболевших животных, голов.

Расчет: $K_{y1} = 120948 : 23 = 5258,6$ руб.

Д. Ущерб на одно животное стада:

$$K_{y2} = Y_0 : M_0,$$

где Y_0 – фактический экономический ущерб, руб.; M_0 – количество животных в стаде, голов.

Расчет: $K_{y2} = 120948 : 1705 = 70,9$ руб

Ветеринарные затраты

А. Общие ветеринарные затраты, руб.:

ПЦР диагностика.....	6468
лечебно-профилактические мероприятия.....	56 000
прочие расходы	9500

$$Z_v = 71968 \text{ руб.}$$

Б. Ветеринарные затраты на одно заболевшее животное:

$$K = Z_v : Z$$

где Z_v – ветеринарные затраты, руб.; Z – количество заболевших, голова.

Расчет: $K_{y3} = 71968 : 23 = 3129$ руб.

В. Ветеринарные затраты на одно животное стада:

где Z_v – ветеринарные затраты, руб.; M_0 – количество животных в стаде, голов.

Расчет: $K_{y4} = 71968 : 1705 = 42,2$ руб.

Предотвращенный экономический ущерб

$$P_{y1} = (M_0 * K_{y1} * K_{z1}) - Y_0,$$

где M_0 – количество животных в стаде, голов; K_{y1} – ущерб на одно заболевшее животное, руб.; $K_{з1}$ – коэффициент возможной заболеваемости; $У_0$ – фактический экономический ущерб, руб.

$$\text{Расчет: } П_{y1} = (1705 * 5258,6 * 0,42) - 120948 = 3644735,5 \text{ руб.}$$

Экономический эффект

где $П_{y1}$ – предотвращенный экономический ущерб, руб.; $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.

$$\text{Расчет: } Э_в = 3644735,5 - 71968 = 3572767,5 \text{ руб.}$$

Экономический эффект на один рубль ветеринарных затрат

$$Э = Э_в : З_в$$

где $Э_в$ – экономический эффект, руб.; $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.

$$\text{Расчет: } Э_p = 3572767,5 : 71968 = 49,6 \text{ руб.}$$

Таким образом, экономический ущерб от ассоциативного урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота за год составил – 109680 руб. Применение разработанных схем лечения в хозяйстве при микоплазмозе крупного рогатого скота позволило предотвратить экономический ущерб на сумму 3572767,5 руб., при этом экономический эффект 49,6 руб на один рубль затрат составил.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Особенностями российского животноводства является высокая концентрация и содержание значительного количества поголовья на животноводческих комплексах, что приводит к пассажированию и усилению вирулентности микроорганизмов [12, 59, 164, 188, 191].

По данным многих авторов одной из важнейших факторов благополучия и популяционной устойчивости продуктивных животных к возбудителям оппортунистических инфекций в условиях масштабного сельскохозяйственного производства является обеспечение гомеостаза и снижение стрессового воздействия на организм животных [15, 31, 33, 39, 47, 40, 60, 64, 130, 142].

В условиях интенсивного ведения животноводства в Северо-Западном ФО РФ постоянно растет количество различных лабораторных исследований, как взрослого поголовья, так и молодняка.

По литературным данным бактериологический метод является «золотым стандартом», остается востребованным и рекомендуется к использованию в лабораторной практике в комплексе с другими методами исследования [86, 87, 121, 134, 137].

Нами был изучен спектр микроорганизмов, изолированных при маститах и урогенитальных инфекциях коров, респираторных патологиях телят, а также фенотипическая вариабельность бактерий, циркулирующих в хозяйствах.

В ходе нашей работы бактериологическим методом выделены гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*) и классические *Klebsiella pneumoniae* (*Сkp*), что согласуется с результатами других авторов. Многие авторы отмечают в настоящее время классические *Klebsiella pneumoniae* (*Сkp classical K. pneumoniae*) и гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*) [59, 96, 164, 165, 224, 263, 310, 331, 352, 388].

Важно изучать не только распространенные патогены, но и редко встречающиеся, например, *S. maltophilia* и *Acinetobacter spp.*, поскольку это

также может стать проблемой, связанной с качеством молока коров, а также со здоровьем населения [85, 218, 268, 271, 315, 372, 380, 392].

На фоне широкого распространения «проблемных» индикаторных бактерий нами выявлен новый эмерджентный микроорганизм *Stenotrophomonas maltophilia*. В результате нашей работы были изучены бактерии *Stenotrophomonas maltophilia*, изолированные из слизистых истечений носовых ходов при респираторных патологиях у сельскохозяйственных животных, которые оказались патогенными для белых мышей, что позволило предположить их этиологическое значение.

Исходя из полученных результатов исследований, мы считаем, что необходимо продолжить лабораторный контроль за бактерией *Stenotrophomonas maltophilia* и изучение ее роли в патологии животных. Полученные нами данные подтверждаются работами ряда авторов. Многими авторами выделена бактерия *Stenotrophomonas maltophilia* от коров с хроническим кашлем и другими респираторными патологиями в Германии, из маститного молока коров в Японии, а также получены изоляты и от других животных [202, 235, 367, 380].

В ходе наших исследований изоляты *Acinetobacter spp.* не были выделены из биоматериала от крупного рогатого скота. Наши данные подтверждают данные других авторов В. Walther, С. Ewers, что по сравнению с медициной данные про *A. baumannii*, полученные в ветеринарии, относительно ограничены [372, 248].

Зарубежные авторы отмечают, что штаммы *Acinetobacter* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) были установлены как этиологически значимые при маститах, пневмонии и сепсисах у животных (крупного рогатого скота) [372, 248].

Acinetobacter baumannii регулярно обнаруживается в образцах молока, однако большинство выявленных микроорганизмов по чувствительности к противомикробным препаратам не относится к клинически значимым антибиотикам, что согласуется с аналогичным исследованием из Кореи (Gurung et al., 2013) [272].

В ходе нашей работы возникали трудности, связанные с получением чистых культур, с длительным культивированием на питательных средах, с атипичными

морфологическими, культурально-биохимическими свойствами, поэтому бактериологический метод идентификации патогенов занимает длительный период времени, о чем свидетельствуют работы и других авторов. Литературные данные подтверждают, что бактерии очень пластичны и легко изменяются под действием различных неблагоприятных факторов (антибиотиков, дезинфектантов, изменения температуры, старение культуры). Сроки выполнения бактериологического исследования и постановки окончательного диагноза в большинстве случаев являются основным препятствием для назначения первичной этиотропной терапии [27, 34, 46, 89, 90, 129, 146, 150, 215, 249].

Так, в ходе культивирования микоплазм с целью дальнейшей молекулярной идентификации мы их условно делили на три группы, отличающиеся по биохимическим свойствам: глюкозоферментирующие, аргининферментирующие и не ферментирующие ни глюкозу, ни аргинин.

В результате исследования нами получены чистые культуры микоплазм, которые не ферментировали ни глюкозу, ни аргинин. Молекулярно-генетическим методом идентифицировали их, как *Mycoplasma bovis*. Возможности применения культурального метода ограничены тем, что получить чистые культуры микоплазм удалось только из легких абортрованного плода, и это не позволяет получить полное представление об эпизоотической ситуации, что согласуется с результатами других авторов [21, 23, 160, 171].

Сложность выращивания микоплазм на бесклеточных питательных средах и возможность их перехода в некультивируемые формы существенно ограничивают применение бактериологического метода, что соответствует данным других авторов [24, 25, 26, 33, 150, 216, 290, 291].

Целесообразно применять комплексные лабораторные методы в выявлении новых и редко встречающихся высоковирулентных микроорганизмов, также при разработке и реализации программ вакцинации животных, когда генетические и антигенные профили вакцинных штаммов не совпадают с изолятами микроорганизмов, циркулирующих на конкретном животноводческом комплексе [13, 114, 129, 136].

В связи с этим необходимо постоянное совершенствование и создание новых наборов реагентов и методик для лабораторной диагностики инфекционных болезней, индикации и идентификации возбудителей с целью повышения информативности, специфичности и чувствительности лабораторных методов диагностики.

Наряду с фенотипическими методами бактериологической диагностики, нами был также использован протеометрический метод, основанный на использовании MALDI-TOF-MS. Нами проведена видовая идентификация выделенных от крупного рогатого скота культур грамотрицательных и грамположительных бактерий с атипичными биологическими свойствами с применением MALDI-TOF-MS - анализа.

Нами идентифицированы грамотрицательные бактерии 11 видов: *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и другие: *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas koreensis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia rettgeri* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

Установлен видовой состав CoNS, который представлен 6 видами микроорганизмов (*S. hemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. sciuri*, в том числе встречались CoNS с мукоидным фенотипом (M-колонии).

Одновременное применение бактериологических методов и метода с использованием MALDI-TOF-MS - анализа позволяет повысить обоснованность и быстроту принятия клинических решений. Мы полагаем, что на основании получаемых данных можно с наибольшей вероятностью выбирать своевременную этиотропную терапию, что согласуется с выводами других авторов [30, 31, 124, 161, 291].

В последнее время широкое распространение получили молекулярно-генетические методы исследования. В рутинной лабораторной практике используются наборы реагентов (тест-системы) для обнаружения *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Campylobacter spp.* в клиническом материале от животных с применением электрофоретической детекции и в

режиме реального времени от разных производителей (ФБУН «Центральным НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО Биофрактал, ООО «ВЕТ ФАКТОР» и др.), которые активно используются как в диагностических целях, так и в эпизоотологических исследованиях.

Однако, важное клиническое значение при эпизоотологическом надзоре за инфекциями, обусловленными возбудителями микоплазмоза, уреаплазмоза и кампилобактериоза имеет идентификация вида возбудителя - важнейшая составляющая в системе лечебно-профилактических мероприятий [41, 42, 78, 81, 82, 162, 225, 226, 298, 299, 303, 304, 305, 306].

Для лабораторной диагностики кампилобактериоза в ветеринарных лабораториях используют бактериологические, биологические, серологические и молекулярно-генетические методы. Молекулярная диагностика кампилобактериоза крупного рогатого скота проводилась нами с применением коммерческих тест-систем для ПЦР-диагностики микроорганизмов *Campylobacter sp.*, *Campylobacter jejuni* производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

С помощью системы «Уреаплазмоз (*Ureaplasma spp.*)» (ООО «Фрактал Био») нам не удалось провести видовую идентификацию возбудителя болезни крупного рогатого скота.

Отсутствие видовой идентификации возбудителя может привести к получению ложноположительного заключения о носительстве этиологически значимых микроорганизмов в исследуемом материале от крупного рогатого скота.

Необходимо помнить, что нельзя проводить санацию антибиотиками животных - носителей микоплазм, уреаплазм, кампилобактерий и других оппортунистических микроорганизмов, что обуславливает не рациональное применение антибиотиков и соответственно развитие антибиотикорезистентных микроорганизмов, что согласуется с данными других авторов. Многие авторы считают, что назначение антибиотиков способствует развитию резистентности к

ним, а стратегия по снижению антибиотикорезистентности должна включать рациональное их использование [54, 56, 175, 177, 178, 179, 180, 182].

Для идентификации микоплазм предлагаются тест-системы LSI VetMAX™ *Mycoplasma bovis* Гибридизационно – флуоресцентная в режиме «реального времени» и производится Life Technologies Corporation (Франция). В качестве диагностических предложены тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, производимые за рубежом UreDiv dtec-Qpcr Test (GPS, Испания) [352, 353].

В ходе исследований нами была проведена апробация ПЦР с лиофилизированными тест-системами на микрочипах с микрочиповом амплификатором «Ариадна», ГК «Люмэкс» (Санкт-Петербург) для определения и идентификации одного, двух или одновременного всех возбудителей *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*, *Campylobacter fetus*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila abortus*. Система данного производства позволяет создавать чипы под заказ с заданными набором тест- систем, их различное комбинирование и количество на микрочипе.

Нами установлены преимущества ПЦР в реальном времени с лиофилизированными и жидкими тест-системами на микрочипах для использования в лабораторных условиях с целью выявления ДНК атипичных микроорганизмов в биологическом материале, полученном от крупного рогатого скота. При молекулярном исследовании материала от коров с признаками вульвовагинита и нарушениями репродуктивной функции с использованием микрочипового амплификатора мы одновременно выделили и идентифицировали бактериальных патогенов таких, как *Mycoplasma bovis* (в 53,0% случаев), *Ureaplasma diversum* (38,0%), *Campylobacter fetus* (7,0%), *Chlamydophila pecorum* (2,0%).

Проведенный нами анализ результатов ПЦР-исследований атипичных пневмоний телят показал высокую частоту встречаемости микроорганизмов рода *Mycoplasma* (89%). При молекулярно-генетическом методе исследования клинического материала идентифицировали и дифференцировали *Mycoplasma bovis* – 28%, *Ureaplasma diversum* – 31% и другие виды микоплазм в 30% случаев

выделения. Аналогичные микроорганизмы обнаружены при обследовании отделяемого влагалища у стельных коров – матерей этих телят, а так же из легких абортированных плодов.

В случае выявления носительства *U. diversum* отбирали, как слизистые истечения из носовой полости у телят, кусочки легких абортированных телят. Положительные результаты составили 31,0%, что значительно выше, если сравнивать с приведёнными сведениями в литературных источниках [24, 25, 216].

В условиях животноводческих хозяйств, расположенных на территории Российской Федерации, *M. bovis*, *U. diversum* и *C.fetus* могут рассматриваться в качестве причины, обуславливающей снижение репродуктивных качеств и возникновения аборт у коров, атипичных бронхопневмонии у телят, которые приводят к гибели молодняка крупного рогатого скота. *M. bovis* вызывает контагиозный инфекционный мастит, что соответствует данным, приведенным в литературных источниках [21, 24, 25, 78, 81, 92, 150].

Нами установлено, что *Mycoplasma spp.* выделена в 66,6% из молока при маститах коров. В 33,3% случаев выявлена *Mycoplasma bovis*. Несмотря на то, что показана этиологическая значимость возбудителя, в ветеринарных лабораториях не применяются скрининговые молекулярно-генетические методы для обнаружения этих патогенов в маститном молоке.

Ограничена возможность применения тест-системы, производимая компанией ГК «Люмэкс», которая может быть использована только на приборе АриаДНА в формате микрочипов. В связи с этим остаётся востребованным создание тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, которая обладала бы высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, была бы совместима с оборудованием для ПЦР в реальном времени различных моделей и позволяла бы осуществлять видовую идентификацию как *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis*, *Campylobacter fetus* и *Chlamydophila pecorum* и других приоритетных патогенов [21, 23, 24, 25, 78, 81, 92, 150].

Разработанные диагностические наборы серии PathoProof Thermo SCIENTIFIC (США) для молекулярной диагностики оппортунистических

возбудителей маститов крупного рогатого скота возможно использовать в лабораторной диагностике, но их применение ограничивается использованием специального прибора-амплификатора и высокой стоимостью этих наборов. Набор PathoProof Major – 4 используется для скрининговых исследований, в том числе на образцах из цистерн молока, для детекции *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma bovis*. Набор PathoProof Mycoplasma – 8 подходит для выявления 6 видов микоплазмы в свежем и обработанном молоке: *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*. Набор PathoProof Complete – 15 предназначен для выявления основных возбудителей мастита у КРС и МРС: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp. (coagulase negative staphylococci)*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* (вкл. *E. faecalis*, *E. faecium*), *Klebsiella oxytoca* и/или *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium bovis*, *Prototheca spp.*, *Staphylococcal beta-lactamase gene* (ген устойчивости к пенициллину) *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma spp.*, дрожжевые грибы.

Диагностические наборы Multi-16 Bovine Mastitis Pathogen Nucleic Acid Test Kit Instruction Manual – ABI7500 (производства Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Китай) позволяют обнаруживать одновременно в одном образце маститного молока 16 возбудителей, перечисленных выше и дополнительно *Trueperella pyogenes*.

В ходе наших исследований мы предложили методологические подходы к созданию диагностических панелей с применением стрипов для молекулярно-биологического выявления условно-патогенных микроорганизмов, изолированных от животных при едином режиме амплификации.

Разработанные нами методологические подходы могут найти широкое применение в практике для диагностики некультивируемых форм грамотрицательных, грамположительных и атипичных возбудителей

микоплазмоза, кампилобактериоза и других оппортунистических инфекций КРС у животных разных возрастных групп.

Увеличение процента выделения и видового разнообразия возбудителей, изолированных от животных, несомненно, связано с повышением чувствительности новых методов, с внедрением в лабораторную диагностику новых экспресс-методов, с разработкой и внедрением тест-систем для диагностики.

В результате проведенных исследований урогенитальных инфекций нами выявлены различные варианты ассоциаций микроорганизмов в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ в 70% проб. Чаще всего обнаруживали микроорганизмов рода *Mycoplasma* в ассоциации с родом *Ureaplasma* и *Chlamydia* в 55,3 %. Микроорганизмы рода *Ureaplasma* в ассоциации с родом *Mycoplasma*, *Chlamydia* и *Campylobacter* в 10,0% [174].

При проведении лабораторных исследований этиологической структуры урогенитальных инфекций крупного рогатого скота в условиях Северо-Западного ФО РФ нами апробирована ПЦР в реальном времени с лиофилизированными и жидкими тест-системами на микрочипах. Установлена пригодность для использования в лабораторных условиях с целью выявления ДНК микроорганизмов в биологическом материале, полученном от крупного рогатого скота. Выделены и идентифицированы урогенитальные патогены такие, как *Mycoplasma bovis* (в 53% случаев), *Ureaplasma diversum* (38%), *Campylobacter fetus* (7%), *Chlamydophila pecorum* (2%).

Из биологического материала от телят с респираторными патологиями нами было выделено и идентифицировано 89 культур бактерий: *Escherichia coli* (33,70%), *K. pneumoniae* (22,47%), *Pseudomonas aeruginosa* (11,24 %), *Proteus spp.* (13,48%), *Staphylococcus spp.* (11,24 %), *Streptococcus spp.* (5,61%). Также получены изоляты редко встречающихся возбудителей инфекций респираторного тракта животных, которые занимают менее 5% от общего числа выделенных микроорганизмов: *Pseudomonas koreensis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia rettgeri* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

Совокупность методов классической бактериологии, MALDI–TOF–MS анализа и секвенирования 16 S РНК позволило нам определить широкий спектр микроорганизмов, трудноидентифицируемых классическими культуральными методами (коринебактерий, кампилобактерий, неферментирующих бактерий) и значительно сократить сроки проведения исследования.

По результатам бактериологических мониторинговых исследований секрета вымени больных маститом коров, проведенных в период 2015-2019 гг., установлено, что чаще всего в 53,0% случаев бактериальные инфекции протекают как ассоциированные инфекции, из них 42,0% вызваны двумя возбудителями, 7%-тремя и 4% - четырьмя патогенами. В остальных 47% случаев, бактериальные болезни регистрируются в виде моноинфекции.

По результатам исследований в секрете молочной железы больных маститом коров нами отмечено преимущество кокковой микрофлоры по сравнению с энтеробактериями – 31,2% и 64,5 % соответственно. В её числе патогенные стафилококки составили в среднем 29,4%, коагулазоотрицательные стафилококки – 3,5%, стрептококки – 28,7%, энтерококки – 2,8%.

В результате исследования к приоритетным патогенам были отнесены 35 культур *K. pneumoniae*. В настоящее время ряд исследователей отмечает формирование новой «гипервирулентной» группы *K. pneumoniae* (*hvKp*). Первые упоминания об инфекциях, вызванных подобными штаммами, появились в 80-х годах XX века. В большинстве сообщений акцентировано внимание на высоком уровне вирулентности *hvKp* штаммов, позволяющем им инфицировать здоровых людей. Одним из ярких отличительных признаков большинства *hvKp* штаммов является гипермукоидность (ГМ), которая ассоциирована с гиперпродукцией капсульных полисахаридов, что было подтверждено результатами наших исследований [58, 91, 96, 310, 164, 230, 224, 285].

Таким образом, в результате проведенной работы нами определен таксономический спектр бактериальных патогенов с определенными доминирующими видами микроорганизмов с их биологическими свойствами,

представлена антибиотикорезистентность и чувствительность к изученным антимикробным препаратам различных классов.

Нами подтверждена актуальность использования молекулярно-генетических методов (ПЦР, секвенирование) для идентификации изолятов с нетипичными свойствами, дифференциации фенотипически неразличимых видов; некультивируемых и медленно растущих бактерий; идентификация бактерий без предварительного культивирования, непосредственно в клиническом материале; идентификация редких видов бактерий, изолированных от животных.

На основе полученных экспериментальных данных нами разработан алгоритм лабораторной диагностики ассоциированной инфекции с этапом секвенирования при идентификации атипичных форм микроорганизмов в чистых или смешанных культурах, а также прямого метода их детекции в биологическом материале от крупного рогатого скота для повышения результатов достоверности видовой идентификации.

Актуальным направлением нашей работы является изучение видового спектра микроорганизмов с атипичными биологическими свойствами как стратегия формирования антибиотикорезистентности в структуре бактериальных болезней животных. Возбудители способны покидать природные биотопы, преодолевать межвидовые барьеры, распространять антимикробную резистентность и т.д., что является биологической угрозой (Указ Президента РФ от 11 марта 2019 г. № 97 «Об Основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу»).

Полученные нами данные согласуются с результатами многих авторов, и свидетельствуют о том, что в настоящее время становится актуальной проблема циркуляции возбудителей, обладающих множественной устойчивостью к АМП, изолированных от сельскохозяйственных животных. Отмечается возрастание этиологической роли полирезистентных микроорганизмов [36, 37, 101, 102, 153, 158, 168, 170, 176, 313].

Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам является одним из механизмов выживаемости бактерий и сохранения вида. Существует даже мнение, что резистентность можно отнести к факторам вирулентности бактерий, которые могут определять презентацию инфекции [37, 57,58, 91, 324, 376].

В современной инфекционной патологии продуктивных животных характерно увеличение удельного веса возбудителей с атипичными (измененными) свойствами метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA), *E. coli*, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), гипервирулентных *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp* –*hypervirulent K. pneumoniae*), распространение возбудителей, которые редко встречались раньше (*Stenotrophomonas maltophilia* и др.) [171, 224, 226, 324].

При определении чувствительности к АМП изолятов культур нами было установлено, что 73% исследованных микроорганизмов были устойчивы к 2 – 6 фармакологическим группам АМП. К двум группам АМП было устойчиво 5% штаммов. Остальные 68% были полирезистентными, из них 31% относились к экстремально резистентным. Таким образом, профили резистентности к АМП и выводы о механизмах резистентности, исходя из результатов тестирования, позволят дать рекомендации ветеринарным клиницистам по интерпретации клинической чувствительности на основе механизмов резистентности микроорганизмов.

В ходе наших исследований мы выделили MSSA (метициллинчувствительные стафилококки) – *S.aureus*, чувствительные к оксациллину (метициллину), что согласуется с авторами других работ (О.А. Артемьева, Д.А. Никанова, Е.Н. Катковская и др., 2016) [10].

Метициллин-резистентные изоляты *Staphylococcus aureus* (MRS – *methicillin-resistant Staphylococcus*) нами не были обнаружены в СЗ ФО РФ. Наши результаты отличаются от результатов зарубежных авторов. В последние годы чаще встречаются метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA), изолированные от животных. Стафилококки зоонозного происхождения (LA-

MRSA) труднее поддаются лабораторному контролю [207, 237, 309, 353, 362, 361, 363].

Многие авторы изучают наиболее важный механизм устойчивости грамотрицательных бактерий к цефалоспорином, связанный с продукцией бета-лактамаз, причем наибольшую угрозу представляют бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), способные гидролизовать цефалоспорины широкого спектра [59, 70, 154, 184, 193, 229, 235, 242, 373].

N.Coldham (2010 г) отметил, что *E.coli*, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра были выделены из 37,0 % проб, взятых на молочных фермах. На фермах, на которых применяли цефалоспорины III и IV поколений, вероятность выделения БЛРС-продуцирующих *E.coli* была в 4 раза выше [59, 235].

В ходе наших исследований мы включали клинические изоляты в экспериментальную выборку для изучения бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), согласно следующим критериям: присутствие в клиническом материале грамотрицательных бактерий в виде монокультуры; фенотипическая устойчивость выделенных бактерий к цефотаксиму и цефепиму. Микробный спектр представлен следующими приоритетными грамотрицательными микроорганизмами: *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

По результатам микробиологического анализа на чувствительность к цефалоспорином бактериальные культуры были отнесены к трём фенотипическим группам: чувствительные к исследуемым антибиотикам; резистентные, обладающие устойчивостью к тестируемым препаратам, а также, показывающие промежуточную чувствительность к одному из цефалоспоринов на фоне устойчивости к другому.

В ходе наших исследований у *K.pneumoniae* и *E.coli* отмечена приобретенная устойчивость к цефтазидиму и цефотаксиму чувствительность к этим же препаратам, но защищённым клавуланатом. Полученные нами данные согласуются с работами ряда авторов [59, 70, 154, 184, 193, 229, 235, 242, 378].

Установлена продукция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у 21 (8,4%) из 250 изолятов условно-патогенной микрофлоры, выделенной нами из клинического материала крупного рогатого скота.

Большинство классических полирезистентных штаммов *K. pneumoniae* являются продуцентами β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) в комбинации с резистентностью к фторхинолонам и аминогликозидам [57, 58, 263, 284, 285, 310, 371].

В ходе проведенной нами работы получены изоляты гипервирулентных *K. pneumoniae*, которые обладали гипермукоидным фенотипом и являлись продуцентами β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Возможность объединения в одном микроорганизме свойств антибиотикорезистентности и вирулентности приводит к неблагоприятному исходу болезни, что согласуется с полученными данными А.И. Лев, 2018, А.В. Забровской, 2019 [91, 235].

В ходе наших исследований отмечена антибиотикорезистентность к цефалоспорином 1-го и 2-го поколения у изучаемых грамотрицательных микроорганизмов в более 50,0% случаев выделения, а к цефтазидиму и цефотаксиму в 16,0% случаев.

По мнению многих авторов, основными типами карбапенемаз у энтеробактерий являются сериновые β -лактамазы групп KPC и OXA-48 и металло- β -лактамазы (MBL) группы NDM. Продукция карбапенемаз является основным и наиболее эффективным механизмом резистентности к карбапенемам у энтеробактерий [240, 241, 242, 257, 300, 369, 375].

В ходе наших исследований гены приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных и класса групп VIM, IMP и NDM у чистых культур, выделенных от крупного рогатого скота, не были обнаружены.

Однако, необходимо проводить дальнейшие исследования и лабораторный контроль за микроорганизмами, способными к продукции карбапенемаз, так как бактерии-продуценты карбапенемаз, выделенные от животных, могут быстро распространять гены резистентности среди микроорганизмов различных родов и семейств и быть фактором риска для человека [218, 286, 343].

В ходе наших исследований установлена резистентность к АМП изолятов *Stenotrophomonas maltophilia*, изолированных из слизистых истечений носовых ходов, обладающих природной резистентностью к широкому спектру антимикробных препаратов. Вид *Stenotrophomonas maltophilia* обладает природной резистентностью к карбапенемам, в результате чего, все выделенные изоляты (менее 5%) показали 100% резистентность к меропенему и имипенему. Наиболее активными антибиотиками в отношении *S. maltophilia* оказался левофлоксацин и моксифлоксацин.

Полученные нами данные согласуются с данными зарубежных авторов: *Stenotrophomonas maltophilia* повсеместно распространена, обладает резистентностью к макролидам, цефалоспорином, фторхинолонам, аминогликозидам, карбапенемам, хлорамфениколу, тетрациклинам и полимиксинам. Низкая проницаемость мембран *S. maltophilia* способствует устойчивости к β -лактамам. Предполагается, что приобретение генов резистентности происходит в окружающей среде, а после попадания в организм животного и человека, штаммы *S. maltophilia* сохраняют эти гены, поэтому такая устойчивость обусловлена не только использованием антибиотиков [202, 223, 243, 360].

В ходе проведенной работы нами установлены основные тенденции изменения этиологической структуры возбудителей оппортунистических инфекций: увеличение ведущей роли энтеробактерий, микоплазм, уреаплазм и повышение частоты встречаемости грамотрицательных неферментирующих бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*); увеличение роли гипервирулентных *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*), *K. pneumoniae* и *E. coli*, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), изолированных от животных и появление возбудителей, которые реже встречались раньше *Stenotrophomonas maltophilia*, что согласуется с результатами многих авторов [59, 70, 85, 154, 171, 184, 193, 229, 235, 242, 378].

Наряду с лабораторной диагностикой актуальным для борьбы с инфекциями животных является подбор антибактериальных препаратов и анализ

антибиотикограмм, изучение механизмов резистентности к АМП – основа рациональной фармакотерапии животных и выпуска безопасной продукции животноводства.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что практически ни один из использованных антибиотиков не подавлял роста и размножения большей части выделенных изолятов бактерий от одного животного. Необходимо одновременно определять чувствительность к антибиотикам у нескольких культур, изолированных от одного и того же животного.

Для анализа изменений чувствительности микроорганизмов и распространения резистентных штаммов впервые, с помощью географической информационной программы (ГИС) Qgis (версия 2.18) на карту Ленинградской области, разделенную на районы, были нанесены данные по изоляции микроорганизмов с различной устойчивостью к АМП [59, 74, 75].

В Российской Федерации создана система мониторинга резистентности AMRmap (Antimicrobia Resistens Cloud) – это онлайн платформа для обмена данными антибиоткорезистентности, что позволит автоматически интерпритировать данные о категории чувствительности микроорганизмов, выделенных от людей и животных. База данных AMRmap позволяет систематизировать, анализировать и прогнозировать тенденции к развитию антибиоткорезистентности и чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [57, 73].

База данных AMRmap включает регулярно пополняемые и обновляемые данные, накапливаемые в рамках эпидемиологических исследований антибиоткорезистентности, проводимых НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ) и Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). База данных AMRmap пополняется результатами эпизоотологического мониторинга ФГБУ Всероссийского государственного Центр качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»), проведенного в период 2017-2019 гг.,

которые доступны в открытом доступе на онлайн-платформе AMRcloud (<https://amrcloud.net/ru/project/vgnki/>) [112].

Полученные нами результаты исследований систематизированы, статистически обработаны и размещены на платформе AMRcloud (https://app.amrcloud.net/app_direct/AMRcloud/), что позволило составить целостное представление о формировании устойчивых штаммов микроорганизмов и проследить тенденции их распространения в рамках конкретного региона.

Система параметров и критериев данных в AMRcloud, а также возможность интерпретации результатов фенотипического определения чувствительности как по клиническим точкам отсечения EUCAST, CLSI, так и по эпидемиологическим точкам отсечения ECOFF удобны для сравнения пользовательских данных с международными, которые могут значительно отличаться по параметрам эксперимента.

ECOFF – это максимальное значение МИК (или наименьшее значение диаметра зоны подавления роста) конкретного АМП среди микроорганизмов в пределах одного вида, у которых отсутствует фенотипически выраженная устойчивость. Значения ECOFF используются для дифференциации микроорганизмов, обладающих и не обладающих приоритетными механизмами резистентности.

Анализируя современные руководства по определению чувствительности микроорганизмов к АМП, могут быть выбраны разные приемы для использования в зависимости от целей мониторинга (определение активности препаратов для лечения животных, выявления значимых маркеров резистентности). Для выявления эффективности АМП для терапевтических целей рационально использовать критерии ECOFF с учетом биологической активности микроорганизмов (<https://mic.eucast.org/search/>).

Для мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов, выделенных из пищевых продуктов, возможно применение для интерпретации

результатов клинических рекомендаций Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST).

Для определения клинических категорий чувствительности устанавливаются клинические пограничные значения МИК и диаметров зон подавления роста. С целью определения пограничных значений проводятся исследования взаимосвязи между величиной МИК антимикробного препарата в отношении возбудителя, фармакокинетическими/фармакодинамическими характеристиками препарата и эффективностью лечения.

Результаты наших экспериментов при сравнении загруженных на платформу AMRcloud данных подтверждает необходимость использования как минимум двух методов определения антибиотикочувствительности в рутинной практике ветеринарных лабораторий для корректной интерпретации результатов. Ручные методики (измерение зон диаметров задержки роста ДДМ, определение МПК с помощью панелей Sensititre), и автоматизированные системы (MicroScan WalkAway 40 plus) имеют свои преимущества и недостатки.

По результатам микробиологического анализа на чувствительность к цефалоспорином бактериальные культуры были отнесены к трём фенотипическим группам: чувствительные к исследуемым антибиотикам; резистентные, обладающие устойчивостью к тестируемым препаратам, а также, показывающие промежуточную чувствительность к одному из цефалоспоринов на фоне устойчивости к другому.

Полученные нами данные согласуются с результатами мониторинга устойчивости микроорганизмов, изолированных от животных, полученные сотрудниками ФГБУ «ВГНКИ». Такой расширенный подход к микробиологическому анализу позволяет значительно эффективнее проводить мониторинг резистентных штаммов и разрабатывать мероприятия по снижению резистентности микроорганизмов – возбудителей болезней крупного рогатого скота.

На сегодняшний день для оптимизации антибактериальной терапии совершенно недостаточно оценить уровень антибиотикорезистентности

возбудителей инфекции только фенотипическими методами. При сходных фенотипах, но различных механизмах устойчивости, клиническая эффективность антибактериальных препаратов может существенно различаться. Для формирования стратегии антибактериальной терапии в ветеринарной медицине необходима также информация о динамике распространения отдельных механизмов резистентности. Знание молекулярных механизмов резистентности является необходимым условием для разработки новых антибактериальных препаратов и средств диагностики устойчивости микроорганизмов [145, 158, 197, 258, 260].

Без уточнения механизма формирования резистентности невозможно правильно определить альтернативные АМП и разработать способы профилактики распространения возбудителей с антибиотикорезистентностью.

В настоящее время существует острая необходимость в проведении исследований по изучению частоты распространения различных механизмов резистентности патогенов, способных к широкому эпизоотологическому распространению.

Основным направлением профилактики нарастания антибиотикорезистентности является детекция механизмов развития резистентности и организации системы лабораторного контроля за устойчивыми микроорганизмами и генами, детерминирующими резистентность к АМП [119, 114, 117].

В условиях животноводческого комплекса необходимо проведение эффективного контроля для ограничения последующего распространения резистентности и контроля использования АМП.

При антибиотикотерапии следует рационально и обоснованно применять принципы ВОЗ по назначению важных в медицинском отношении противомикробных препаратов для фармакотерапии инфицированных животных с целью получения от них безопасных продуктов животноводства [22, 363].

Использование антимикробных препаратов может быть разрешено из более низкой категории/класса для лечения инфицированных животных или для

предотвращения распространения клинически диагностированной болезни в группах животных.

Согласно принципам ВОЗ в одну группу вошли антибиотики, которые обладают активностью в отношении широкого спектра распространенных чувствительных к ним бактериальных патогенов и с ними связана меньшая вероятность формирования резистентности по сравнению с антибиотиками других групп.

В другую группу относят классы антибиотиков, которые связаны с более высокой вероятностью формирования резистентности к ним, и в нее входит большинство высокоприоритетных препаратов.

К группе резерва относят классы антибиотиков, которые должны применяться исключительно для лечения подтвержденных или подозреваемых инфекций, вызванных бактериальными возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью. Использование может быть разрешено, если недоступны никакие другие препараты из более низкой категории/класса для лечения инфицированных животных или для предотвращения распространения клинически диагностированной болезни в группах животных [22, 363].

Лабораторный мониторинг резистентности микроорганизмов к противомикробным препаратам необходим для:

- оценки и определения основных причин резистентности к противомикробным агентам;
- выявление новых механизмов антибиотикорезистентности, сбора данных, необходимых для анализа риска здоровья животных и человека;
- оценки назначаемых противомикробных препаратов, обоснование рекомендаций по сохранению здоровья животных и человека, выработки рекомендаций по их безопасному использованию АМП;
- оценки и определения результативности действий, предпринятых для сдерживания резистентности к противомикробным агентам и для ретроспективных исследований.

Полирезистентная бактериальная инфекция животных обусловлена микроорганизмами, которые приобрели устойчивость к определенным антибиотикам по причине их частого и нерационального использования, и уже утратили свою клиническую эффективность при лечении инфицированного животного бактериальной инфекции.

Известно, что микроорганизмы, обладая определенным набором свойств: убиквитарность, полигостальность и экологическая и фенотипическая пластичности микроорганизмов, способны колонизировать разные биотопы. При нарушении иммунобиологических барьеров макроорганизма микроорганизм покидает природный биотоп, инфицирует внутренние органы. Проникновение бактерий в кровеносное русло обеспечивается не только их количественным показателем, но и нарушением иммунного статуса макроорганизма. Несвоевременный и не точно поставленный диагноз приводят к нерациональному применению антимикробных препаратов и к формированию антибиотикорезистентности. О.В. Ионов (2013), Т.В. Припутневич (2015), Н.А. Безбородова (2017) и другие исследователи указывают на эффективность идентификации условно-патогенных возбудителей с использованием ПЦР, с помощью MALDI–TOF–MS, основанной на анализе специфического маркера бактерий – профиля белковых спектров [13, 62, 146].

Многие авторы отмечают актуальность использования микробиологических основ для рациональной фармакотерапии животных и профилактики распространения антимикробной резистентности микроорганизмов [43, 44, 52, 59, 184, 229, 235, 239].

Борьба с антибиотикорезистентностью путем организационных мероприятий (например, исключением на определенное время антибиотиков) не может решить всех проблем. Запрет применения АМП в животноводстве только усугубит ситуацию в животноводческих комплексах, так как отсутствие воздействия на циркулирующие микроорганизмы приведет к массовым болезням, потери поголовья и повлечет за собой угрозу продовольственной безопасности страны. Решением проблемы является изучение формирования и

распространение полирезистентных возбудителей среди животных; механизмов резистентности; разработка системы контроля инфекционных болезней, рационального применения антимикробных препаратов с целью выпуска безопасной продукции животноводства.

Мероприятия по борьбе с резистентностью к АМП состоят из двух самостоятельных направлений: устранение факторов, способствующих с одной стороны, селекции резистентных микроорганизмов, с другой - распространению резистентных микроорганизмов во внешней среде и в восприимчивой популяции животных. Успешное решение этих задач в условиях животноводческих комплексов требует постоянного изучения эпизоотологических, микробиологических, фармакодинамических и молекулярно-генетических особенностей формирования резистентности у конкретного штамма микроорганизма. Применение международных рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов в повседневной работе внесет значительный вклад в качество результатов ветеринарных лабораторий.

Лабораторный контроль необходим для профилактики возникновения и распространения полирезистентных патогенов. Использование антибиотиков оказывает негативное влияние на микробиоценоз кишечника, вызывая дисбактериоз, развитие грибной флоры и таким образом воздействует на здоровье животных и качество продуктов, получаемое от них.

Наряду с необходимостью усовершенствования методов лабораторной диагностики, изучения факторов вирулентности оппортунистических микроорганизмов, целесообразно разрабатывать и совершенствовать лечебно - профилактические средства.

В настоящее время разработан и оптимизирован по составу композиционный препарат Азициклин (АВЗ, Россия), в состав которого входят Доксициклин, Азитромицин, Эмиданол. Антиоксидант Эмиданол обладает выраженным гепатопротекторным и антитоксическим эффектом при абсорбции доксициклина и азитромицина из ЖКТ и прохождении через печень, когда при лечебных дозах достигаются высокие пиковые концентрации в кровотоке.

Азициклин является антибиотиком широкого спектра действия класса макролидной и тетрацеклиновой групп. Помимо антибактериальной активности, препарат обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими и мукорегулирующими свойствами за счет азитромицина.

Нами установлено, что композиционный антимикробный препарат Азициклин, обладает антимикробным действием в отношении изолятов *in vitro* и терапевтическим эффектом при лечении телят с респираторной патологией с учетом микоплазменных микроорганизмов и рекомендован к регистрации и применению в производстве. Установлено, что препарат Азициклин по степени воздействия на организм относится к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76).

Определены параметры острой и подострой токсичности препарата Азициклина на лабораторных животных.

Азициклин не обладал раздражающим действием при нанесении на кожу и конъюнктиву глаза, аллергизирующие свойства не установлены.

При исследовании различных доз Азициклина установлено, что доза 0,25г на 10 кг массы животного, применяемая 3-кратно с интервалом 24 ч, является наиболее оптимальной для лечения телят с острой бронхопневмонией, острым бронхитом и острым трахеобронхитом, ассоциированными микоплазмами (улучшалось общее состояние животных, дыхание становилось мягче, хрипы не прослушивались, температура была в норме).

При хроническом бронхите и гнойно-катаральной пневмонии 5-кратное введение препарата с интервалом 24 ч введение препарата в дозе 0,25г на 10 кг массы животного.

Указанные дозы и схемы препарата Азициклина обеспечивают терапевтический эффект у телят при болезнях органов дыхания на уровне 92,8-100%.

Введение Азициклина телятам после возникновения клинических проявлений болезни респираторной системы, характеризующихся

бронхопневмонией, позволило удержать сохранность телят до возраста 2-х мес на уровне 81,25%.

Таким образом, применение эффективных антибактериальных препаратов в соответствии с принципами рациональной антибиотикотерапии животных позволяет получить хороший терапевтический эффект, уменьшая вероятность появления резистентных форм микроорганизмов.

Нами рассчитан экономический эффект от применения эффективных схем лечения при ассоциативных микоплазменных инфекциях крупного рогатого скота в хозяйстве, который составил 49,6 руб на один рубль затрат и разработаны мероприятия по оздоровлению поголовья скота.

Рекомендуемый нами препарат Азициклин доказал свою высокую эффективность и безопасность во время доклинических и клинических испытаний и может быть использован в практической работе ветеринарными врачами.

Полученные нами новые данные о доклинических исследованиях легли в основу изменений в Инструкции по применению препарата Азициклина, а также будут использованы для регистрации их в Россельхознадзоре.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Обоснована система бактериологического мониторинга полирезистентных возбудителей, предусматривающая применение классических микробиологических, протеомных (MALDI-TOF-MS) и молекулярно-генетических методов исследования (полимеразная цепная реакция, секвенирование). Данные методы повышают достоверность видовой идентификации и дифференцирующую способность, что позволяет наблюдать за структурой популяции возбудителей в динамике инфекционного процесса. Установлено распространение этиологически значимых полирезистентных *E. coli*, гипервирулентных *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*) и эмерджентных грамотрицательных неферментирующих *Stenotrophomonas maltophilia*, изолированных от животных.

2. Апробирована ПЦР в реальном времени с лиофилизированными тест-системами на микрочипах для одновременного обнаружения пяти и более микроорганизмов, их видовой идентификации и дифференциации при едином режиме амплификации. Выявлен спектр патогенных микроорганизмов, вызывающих поражение репродуктивного тракта: *Mycoplasma bovis* (42,0%), *U. diversum* (49,0%), *Campylobacter fetus* (7,0%), *Chlamydomphila pecorum* (2,0%). При атипичных пневмониях телят обнаружены *Mycoplasma bovis* в 28,0% случаев и *Ureaplasma diversum* – 31,0%.

3. В секрете молочной железы больных инфекционным маститом коров отмечали преимущественно кокковую микрофлору (56,1%) по сравнению с энтеробактериями (7,0 %). Патогенные стафилококки составили, в среднем, 23,6%, коагулазоотрицательные стафилококки (*CoNS*) – 8,3%, стрептококки – 12,2%, энтерококки – 12,0%, *Mycoplasma spp.* - 66,6%. При контагиозных маститах коров из секрета молочной железы выделена *Mycoplasma bovis* (33,3%).

4. При урогенитальных инфекциях бактериологическим методом выделены микроорганизмы, обладающие патогенными свойствами: *E. coli* (в 23,9% случаев), *K. pneumoniae* (18,3%), *Proteus spp.* (13,4%), *C. fetus* (10,6%), *Ps.aeruginosa* (9,0 %) и *Staphylococcus spp.* (12,0%). Проведенный анализ

результатов показал высокую частоту встречаемости *Mycoplasma spp.* (91,0%) при урогенитальных инфекциях.

5. У телят с респираторной патологией в 27,7 % случаев выделяли *E. coli*, 7,47% - *K. pneumoniae*, *Proteus spp.* – 13,48%, 10,08 % - *Ps. aeruginosa*, 5,04% - *Streptococcus spp.*. Из 33,0% изолятов *Staphylococcus spp.* преобладали CoNS в 22,0%, а также *S. aureus* (11,0% случаев). По результатам комплексных исследований в биоматериале от телят с респираторной патологией выделена *Mycoplasma spp.* в 89,0% случаев.

6. Обнаружены гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp* – *hypervirulent K. pneumoniae*) с гипермукоидным фенотипом. У *K.pneumoniae* и *E.coli* установлена приобретенная устойчивость к бета-лактамам АМП. Изоляты бактерий *S.maltophilia* обладали природной резистентностью ко всем бета-лактамам соединениям, включая карбапенемы. Наличие у микроорганизмов атипичных биологических свойств (мукоидный фенотип, наличие бета-лактамаз) способствует формированию и распространению антибиотикорезистентности у микробов.

7. При определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам установлено, что 73,0% исследованных микроорганизмов были устойчивы к 2 – 6 фармакологическим группам АМП, из них к двум группам АМП было устойчиво 5,0% штаммов, остальные 68,0% оказались полирезистентными, в том числе 31,0% - экстремально резистентными. При изучении механизмов резистентности установлена продукция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у 21 из 250 (8,4%) изолятов патогенной микрофлоры, выделенной из клинического материала крупного рогатого скота.

8. Внедрение в практику ветеринарных лабораторий микробиологического и молекулярно-генетического контроля за механизмами резистентности микроорганизмов, ранжирование, экстраполирование и выборочное репортирование результатов антибиотикограмм позволяет профилактировать возникновение и распространение антибиотикорезистентности

возбудителей бактериальных болезней, а также проводить рациональную фармакотерапию животных.

9. Препарат Азициклин по степени воздействия на организм относится к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76). Определены параметры острой и подострой токсичности, раздражающего, алергизирующего действия препарата Азициклина на животных.

10. Препарат Азициклин при остром бронхите и бронхопневмонии телят при 3-х кратном введении в дозе 0,25 г на 10кг массы животного с интервалом 24 ч, а при хроническом бронхите и гнойно- катаральной пневмонии при 5-кратном введении с интервалом 24 ч, обеспечивает терапевтический эффект при болезнях органов дыхания телят.

11. Экономический эффект от применения эффективных схем лечения крупного рогатого скота при ассоциативных бактериальных инфекций в хозяйстве составил 49,6 руб. на один рубль затрат.

5 РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В диссертации предложены теоретические и практические подходы к созданию комплексных методов диагностики, которые следует внедрять в лабораторную ветеринарную практику повсеместно, что позволит расшифровать этиологию многих бактериальных болезней животных.

Результаты наших исследований позволяют расширить диагностический спектр бактерий для их идентификации и дифференциации с использованием наборов микрочипов с лиофилизированными тест-системами «АриаДНА-Аборт-КРС», разработанными ГК «Люмэкс» с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, что позволит увеличить процент обнаружения микроорганизмов с целью своевременного проведения противоэпизоотических мероприятий.

Рекомендуем использовать методологические подходы к разработке и апробации диагностических панелей со стрипами для одновременной детекции *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Chlamidia spp.* и их видовой идентификации микоплазм (*Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma diversum* и др.).

Российская система контроля за антибиотикорезистентностью микроорганизмов, изолированных от животных нуждается в совершенствовании и расширении исследований, направленных на изучение механизмов ее формирования. Дальнейшее внедрение лабораторного контроля за антимикробной резистентностью микроорганизмов в рутинную работу ветеринарных лабораторий необходимо для получения информации о антибиотикочувствительности, для разработки и внедрения более эффективных подходов к лечению инфекций животных, предотвращения возникновения и распространения антимикробной резистентности. Оценка уровня бета-лактамазной активности микроорганизмов позволит сократить необоснованное

использование антибактериальных препаратов из группы бета-лактамов в ветеринарной медицине.

Рекомендовать ежегодное проведение мониторинга уровня антибиотикорезистентности возбудителей бактериальных инфекций в животноводческих комплексах для разработок алгоритмов рациональной антимикробной терапии с учетом данных локальной резистентности.

При изучении вопросов проведения рациональной антибиотикотерапии на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей рекомендовать уделять внимание данным по локальной антибиотикорезистентности в сравнении с наиболее частыми и наиболее затратными антимикробными препаратами, применяющимися в регионе.

Организовать семинары для врачей бактериологов по рациональному определению антибиотикорезистентности грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, особенностей природной и приобретенной резистентности и применяемых (как наиболее распространенных, так и имеющихся в наличии) антимикробных препаратов в ветеринарной практике.

Внедрение в ветеринарную практику комбинированных антимикробных препаратов открывает перспективу для дальнейшего расширения линейки комбинированных антимикробных препаратов и способов лечения животных, препятствующих выработке механизмов устойчивости у микроорганизмов, исходя из принципа сочетания антибиотика, расширяя спектр действия антибиотиков или усиливая действие на определенную группу микроорганизмов.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Основные научные положения работы и ее практические результаты рекомендуется использовать в производственных условиях ветеринарным специалистам, при подготовке к занятиям и в учебном процессе со студентами, аспирантами и научными работниками, а также при повышении квалификации и переподготовке кадрового состава ветеринарного и зоотехнического профиля.

Полученные результаты могут использоваться при планировании противоэпизоотологических мероприятий, предусматривающие комплекс

диагностических исследований с целью расшифровки этиологической структуры бактериальных болезней и выяснения этиологической роли каждого инфекционного агента.

Предложенные нами комплексные лабораторные методы диагностики могут быть использованы на практике с целью повышения качества видовой идентификации труднодиагностируемых микроорганизмов (неферментирующих бактерий, коринебактерий, микоплазм), а также проведения прямой индикации патогенов в клиническом материале. Предлагаем применять алгоритм бактериологической диагностики с применением протеомных и молекулярно-генетических методов (полифазный лабораторный анализ). Мониторинг изменений в спектре бактерий обуславливает изменения в стратегии применения антибактериальных препаратов.

В результате мониторинговых исследований выделен полирезистентный штамм *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом, депонированный в коллекции микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ» регистрационный номер ВКШМ-Б-288М и предложен в качестве антигена-штамма для изготовления биологических препаратов. Выделен штамм *Campylobacter fetus subsp.fetus* и предложен для изготовления в качестве производственного штамма при изготовлении биологических препаратов для профилактики и диагностики кампилобактериоза.

При выборе антимикробного препарата для рациональной фармакотерапии инфицированных животных или для предотвращения распространения клинически диагностированной болезни в группах животных необходимо учитывать наиболее активный и наименее токсичный препарат из более низкой категории/класса, т.е. менее приоритетный для медицины согласно рекомендациям ВОЗ.

В практику ветеринарных лабораторий с целью контроля механизмов антибиотикорезистентности микроорганизмов предлагаем внедрять фенотипические и генотипические методы, что позволит сократить необоснованное использование антибактериальных препаратов, получить

качественную продукцию животноводства и профилактировать распространение антибиотикорезистентности в условиях масштабного сельскохозяйственного производства.

Подготовлен проект-инструкция к комбинированному антибактериальному препарату Азициклин. Комбинированный препарат Азициклин показал свою высокую эффективность и безопасность во время доклинических и клинических испытаний и может быть рекомендован для лечения болезней телят с бактериальной этиологией, ассоциированной микоплазмами и уреоплазмами.

Полученные результаты позволят создать «карту микробной резистентности» микроорганизмов в ветеринарии и сельском хозяйстве Российской Федерации, ограничить распространение резистентности эпизоотологически и эпидемически значимых социально опасных микроорганизмов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБ	Антибиотик
АБ-резистентность	Антибиотикорезистентность
АБТ	Антибактериальная терапия
АМП	Антимикробный препарат
АМР	Антимикробная резистентность
БП	Биопленка
БЛРС	Бета-лактамазы расширенного спектра
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
ИВБ	инфекционно-воспалительные болезни
ЕД	Единица действия
КОЕ	Колонии образующие единицы
КОС(СoNS)	Коагулазоотрицательный стафилококк
КПС	Коагулазоположительный стафилококк
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
МИК	Минимальная ингибирующая концентрация
МЛУ	Множественная лекарственная устойчивость
НГОП	Неферментирующие грамотрицательные палочки
МБК	Минимальная бактерицидная концентрация
МЭБ	Всемирная организация по охране здоровья животных (Международное эпизоотическое бюро)
УПМ	Условно-патогенные микроорганизмы
ПСБ	Пенициллин-связывающие белки
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
СЗ ФО	Северо-Западный Федеральный округ
ФАО	Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН

AMP	Антимикробные пептиды (Antimicrobial peptidis)
MRSA	Метициллинрезистентный стафилококк
MSSA	Метициллинчувствительный стафилококк
QS	Quorum sensing, чувство кворума
ECOFF	Эпидемиологические точки отсечения (epidemiological cut-off values)
EUCAST	Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам
EPI	Антибактериальных молекулы, блокирующие механизм эффлюкса EPI (efflux pump inhibitor)
ESBL	Бета-лактамазы расширенного спектра (Extended-spectrum beta-lactamases)
MALDI- TOF MS	Матрично активированная лазерная/ ионизация – времяпролетная масс-спектрометрия
MBL	Метало- β -лактамаза (Metallo- β -lactamases)
CLSI	Институт по клиническим и лабораторным стандартам США
CPE	Enterobacterales, продуцирующие <i>карбапенемазы</i> (Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae)
сут	сутки
рис	рисунок
табл	таблица
ч	час
мин	минуты
с	секунды
мл	миллилитры
кг	килограмм
г	грамм
мкг/кгЛ	микрограмм на килограмм

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеенко, В.С. Качественный состав молока коров со скрытой формой мастита / В.С. Авдеенко, А. В. Филатова, С.Н. Тресницкий, Н.В. Пименов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. –2018. –№ 7. – С. 12-18.
2. Алексеева, С.М. Вариационная характеристика по спектру чувствительности и устойчивости к антибиотикам патогенных и условно-патогенных микробов / С.М. Алексеева // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. - №3(24). – С.7-12.
3. Алехин, Ю.Н. Нозологическая структура болезней органов дыхания у телят / Ю.Н. Алехин, М.С. Жуков // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины.- 2018.- Т. 54. -№ 4.- С. 6-9.
4. Алехин, Ю.Н. Коррекция рубцового пищеварения у телят в период реконвалесценции респираторной патологии / Ю.Н. Алехин, В.В. Субботин, Н.В. Данилевская, М.С. Жуков, А.Ю. Лебедева // Ветеринария, зоотехния и биотехнология.- 2018.- № 1. -С. 31-38.
5. Алехин, Ю.Н. Влияние современных технологий на развитие и здоровье телят / Ю. Н. Алехин, С. Р. Ужахов // Молочная промышленность. – 2015. – № 10. – С. 67-68.
6. Алехина, Г.Г. Пробиотики – новый подход к старым проблемам / Г.Г. Алехина, А.Н. Суворов // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 6. – С. 36–39.
7. Акулинич, О.Л. Профилактика акушерской патологии и нарушений обмена веществ у коров в условиях промышленного комплексов / О.Л. Акулинич, Д.С. Ятусевич // Учёные записки УО «Витебская ордена «Знак почёта» государственная академия ветеринарной медицины». - 2014. - т. 50. - № 2-1. - С. 118-120.
8. Андрюков, Б.Г. Молекулярно-генетические механизмы сохранения патогенного потенциала возбудителей природно-очаговых сапронозов / Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, М.П. Бынина, И.Н. Ляпун // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии- 2019- №4- С. 115-126.
9. Анганова, Е.В. Проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных болезней животных и птиц / Е.В. Анганова, А.М. Аблов, А.С. Батомункуев, А.А. Плиски // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. – №2 (28). – С.55-58
10. Артемьева, О.А. Фенотипическая устойчивость к антибиотикам у штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока коров / О.А. Артемьева, Д.А. Никанова, Е.Н. Колодина, В.В. Романова, Ф.А. Бровко, Н.А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология – 2019 - том 54- № 6 - С. 1257-1266
11. Баландин, С. В. Антимикробные пептиды беспозвоночных. Часть 2. Биологические функции и механизмы действия / С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова // Биоорганическая химия- 2016- том 42- № 4- С. 381–400.

12. Багманов, М.А. Терапия и профилактика патологий органов размножения и молочной железы у коров: монография/ М.А. Багманов, Н.Ю. Терентьева, Р.Н. Сафиуллов - Казань, 2012-187с.

13. Безбородова, Н.А. Сравнение лабораторных методов диагностики инфекций, вызываемых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами / Н.А. Безбородова, Н.А. Ким // Эффективное животноводство. – 2018. – № 2(141). – С. 46–47.

14. Белобородова, Н.В. Алгоритмы антибиотикотерапии: руководство для врачей./ Белобородова Н.В., Богданов М.Б., Черненькая Т.В.// М., 2000.- 193 с.

15. Бузолева, Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды: Автореф. дис. ... д.б.н. - Владивосток, 2001. - 47 с.

16. Беленький, М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. - 2-ое изд. переработ. доп.- Ленинград: Мед. литература, 1963. - 162 с.

17. Беленький, М.Л. Методы определения токсичности и опасности химических веществ/ М. Л. Беленький., 1970. - 71 с.

18. Бондаренко, В.М. Ингибиторы полимеразной цепной реакции / В.М. Бондаренко, А.Р. Мавзютов, А.Т. Латкин // журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.- 2003- №3.-С. 93-98.

19. Бондаренко, В.М. Влияние лактобацилл на бактериальные биопленки условно патогенных бактерий / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, О.Г. Орлова // Лечение и профилактика. – 2014. – № 2(10). – С. 28–35.

20. Бородина, В.А. Биологические свойства коринебактерий, изолированных из молока коров при мастите./ Бородина В.А., Смирнова Л.И., Сухинин А.А., Макавчик С.А. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- №1- 2020 - С. 60-63. - DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.1.60

21. Борхсениус, С.Н. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов и др. — Санкт-Петербург: Наука, 2002. — 319 с.

22. Борьба с устойчивостью к антибиотикам с точки зрения безопасности пищевых продуктов в Европе. Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. Режим доступа: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0011/144695/e94889R.pdf

23. Ваганова, А.Н. Оценка метода ПЦР в реальном времени для индикации *Ureaplasma diversum* в клиническом и патологическом материале от крупного рогатого скота /Ваганова А.Н., Фрейлихман О.А., Борисенко С.В., Рока В.В., Вербов В.Н.// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2018.- № 3.- С. 37-39.

24. Ваганова, А.Н. Снижение репродуктивных качеств у коров, являющихся носителями *Ureaplasma diversum*./ Ваганова А.Н., Фрейлихман О.А., Борисенко С.В., Рока В.В., Вербов В.Н.// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2018. -№ 4.- С. 34-37.

25. Василевский, И.В. Некоторые пути решения проблемы антибиотикорезистентности на современном этапе /Василевский И.В.// Медицина, 2008.- № 1.- С. 92 – 97.
26. Васильев, Д.А. L-формы возбудителей зооантропонозов/ Д.А. Васильев, Л.В. Карпунина, Щербаков, Л.С. Назарова, И.Г. Швиденко, С.Н. Золотухин – Ульяновск: Изд-во УГСХА им. П.А. Столыпина, 2013 г. – 118 с.: ил.
27. Вахитов, Т.Я. Влияние метаболитов пробиотических и патогенных бактерий на антагонистическую активность *Lactobacillus acidophilus* Д№75/ Вахитов Т.Я., Вербицкая Н.Б., Добролеж О.В., Полевая Е.В., Кобатов А.И.//Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.- 2013.- № 92.- С. 312-327.
28. Гависова, А.А. Современный взгляд на проблему уреаплазменной инфекции / Гависова А.А., Твердикова М.А., Тютюнник В.Л. / // Эффективная фармакотерапия. — 2013. — № 18. — С. 8-13.
29. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам» Женева, Всемирная Организация Здравоохранения, 1998 Режим доступа: http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_Russian.pdf
30. Глотов, А.Г. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко // Сиб. вестн. с.-х. науки. - 2008. - № 3. - С. 72-78.
31. Глотов, А.Г. Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах / А.Г Глотов, Т.И Глотова, О.В. Семенова, К.В. Войтова// Ветеринария. -2014. - №4. - С.7-10.
32. Голошва, Е.В. Влияние биотических и абиотических факторов на биопленкообразование бактерий / Е.В. Голошва // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2017. – № 2. – С. 50–61.
33. Гончаров, А.Е. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации / А.Е. Гончаров, Л.П. Зуева, В.В. Колоджиева, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова. – Москва, 2014. – 45 с.
34. Госманов, Р.Г. Лабораторная диагностика инфекционных болезней/ Р.Г. Госманов, Р.Х. Равилов, А.К. Галиуллин, Ф.М. Нургалиев, Г.Г. Идрисов - Санкт-Петербург, 2018. (1-е, Новое) -186с.
35. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1, 2): дата введения 1976-03-10. - Москва: Госстандарт, 1976. - 7 с.
36. Глумчер, Ф.С. Грамположительная полирезистентная инфекция / Ф.С. Глумчер // Острые и неотложные состояния в практике врача. - №1(9) - 2008.
37. Глумчер, Ф.С. Полирезистентная инфекция: актуальность, определение, механизмы, наиболее распространенные патогены, лечение,

профилактика /Ф.С. Глумчер, С.А.Дубров, Ю.Л.Кучин // Наука і практика—№ 1(2)- 2014- С. 129-149.

38. Григолия, С. Б. Коррекция микробиоценоза при болезнях телят инфекционной этиологии дисс. канд.вет.наук: 06.02.02/ Григолия Софья Борисовна - 2013 -123с.

39. Григорьев, А.В. Совершенствование этиотропной терапии острого бронхита телят / А.В. Григорьев, С.В. Новикова, В.Е. Абрамов [и др.] // Ветеринария. 2015. – № 5. – С. 17–19.

40. Гриценко, В.А. Роль персистентных свойств микроорганизмов в патогенезе эндогенных бактериальных инфекций / В.А. Гриценко, Ю.Б. Иванов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2. – С. 35–39.

41. Гришина, В.А. Кампилобактериоз домашних животных. / В.А. Гришина, Т.М. Красовская, А.В. Гришина // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2010. - №3 - С.62-64.

42. Гришина, В.А. Биологические свойства кампилобактерий, выделенных у животных и людей / В.А. Гришина, В.А. Кузьмин // Иппология и ветеринария. - 2011. - С. 112 - 114.

43. Данилова, Н.В. Мультирезистентность бактерий к ветеринарным антибиотикам в образцах навоза и помета сельскохозяйственных животных/ Н.В.Данилова, П.Ю.Галицкая, С.Ю.Селивановская // Ученые записки казанского университета. Серия Естественные науки. – 2016. – Т.58, кн.4. – С.507-516.

44. Данилевская, Н.В. Особенности применения антибиотиков в ветеринарной практике / Н.В. Данилевская // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. - 2010. - №3(7) - С.37-41.

45. Джупина, С.И. Эпизоотический процесс и его контроль при факторных инфекционных болезнях / С. И. Джупина. – Москва: РУДН, 2002. – 212 с.

46. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. (European Convention for Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123)). - Strasbourg, 1986. - 346 с.

47. Егорова, С.А. Патогенный потенциал микроорганизмов рода *Klebsiella* как возбудителей острых кишечных инфекций / С.А. Егорова, С.А. Кафтырева, М.А. Макарова // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008. –№ 2 (22). – С. 535–536.

48. Енгашев, С.В. Доклинические и клинические исследования препарата Ципровентор - нового комплексного антибиотика для ветеринарии / С.В. Енгашев, Д.Н. Филимонов, Л.А. Неминущая, В.И. Дорожкин // Ветеринария. – 2016. – № 12. – С. 49-51.

49. Епанчинцева, О.С. Микробный пейзаж содержимого матки и секрета молочной железы коров при послеродовой патологии / О.С. Епанчинцева, С.О. Семеруненко // Вестник ветеринарии. - 2012. - № 4 (63). - С. 42-44.

50. Епанчинцева, О.С. Профилактика и терапия послеродового эндометрита у коров / О.С. Епанчинцева, К.И. Грибкова // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. - 2013. - № 1 (30). - С. 11-15.

51. Ефанова, Л.И. Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам при смешанных инфекциях/ Л.И. Ефанова, А.С. Транькова, В.В. Давыдова // Материалы 1 съезда ветеринарных фармакологов. – Воронеж, 2007. – С. 280-285.

52. Ефанова, Л.И. Иммунный статус телят и качество молозива при факторных инфекциях/ Л.И. Ефанова, О.А. Манжурина, В.И. Моргунова, М.И. Адолина // Ветеринария. – 2012. - №10. – С. 28-31.

53. Жерносенко, А.А. Усовершенствованный способ лечения послеродового эндометрита у коров / А.А. Жерносенко, О.С. Епанчинцева, К.И. Петров // Ветеринарный врач. - 2016. - № 6. - С. 48-53.

54. Жебрун, А.Б. Биоразнообразие и эволюция циркулирующих популяций бактерий и вирусов. Новые проблемы медицинской микробиологии / А.Б. Жебрун, С.Л. Мукомолов, О.В. Нарвская, Г.Я. Ценева, Л.А. Кафтырева, И.В. Мокроусов // Журн. микробиол.-2011.- №5- С.93-98.

55. Жаров, А.В. Роль иммунодефицитов в патологии животных/ А.В. Жаров // Ветеринарная патология - 2003. - № 3. - С.7 -12.

56. Забровская, А.В. Чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства / А.В. Забровская // Farm Animals.- 2013.-№ 1.- С. 78-83.

57. Забровская, А.В. Предотвращение возникновения и распространения штаммов микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам / А.В. Забровская // Иппология и ветеринария. - 2018. - №2-(28).- С. 64-70.

58. Забровская, А.В. Эпизоотологический анализ распространения антибиотикорезистентных штаммов возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации: автореферат дис.... доктора ветеринарных наук: 06.02.02 / Забровская Анна Владленовна - 2019. - 41 с.

59. Золотарева, Н.А. Иммунодефицит: профилактика и борьба с ними / Н.А. Золотарева // Ветеринарная патология. - 2003. - № 2. - С. 55 - 56.

60. Зорников, Д.Л. Основы противинфекционной иммунологии/ Д.Л. Зорников, Н.В. Литусов / Екатеринбург, Издво УГМУ, 2016. – 34 с.

61. Изучение биологических свойств возбудителей инфекционных болезней животных, выделяемых на территории Российской Федерации, и сравнение их с находящимися в коллекциях возбудителей болезней, в том числе, общих для человека и животных с целью оценки изменчивости их культуральных и морфологических свойств, патогенности, а также изучения их устойчивости к факторам внешней среды и дезинфекционным средствам. Изыскание новых эффективных средств и методов дезинфекции: методические рекомендации / Джавадов Э.Д., Сухинин А.А., Макавчик С.А., Кузьмин В.А., Фогель Л.С.,

Смирнова Л.И., Орехов Д.А.- Санкт-Петербург, ФГБОУ ВО СПбГУВМ- 2021. - 35с.

62. Ионов, О.В. Роль метода ПЦР в диагностике врожденных и нозокомиальных инфекций у новорожденных / О.В. Ионов, И.В. Никитина, О.В. Бурменская, О.С. Непша, Д.Ю. Трофимов, А.Е. Донников, С.Д. Митрохин, Т.В. Припутневич, Л.А. Любасовская, Д.Н. Дегтярев // Акушерство и гинекология.– 2013. – № 11. – С.59–64.

63. Исакова, М.Н. Микробиологический фон при воспалении молочной железы у высокопродуктивных коров / М.Н. Исакова, М.В. Ряпосова, Н.А. Безбородова, О.А. Брицина // Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2017. – № 2. – С. 63–67.

64. Караулов, А.В. Механизмы приобретения вирулентности условно-патогенными микроорганизмами и формирования пула нозокомиальных штаммов в микробиоценозах слизистых открытых полостей организма/ В.А. Алешкин, Н.Л. Бондаренко, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, Ю.В. Несвижский, А.В. Алешкин, О.Ю. Борисова, Е.Г. Овсянникова, О.В. Рубальский, А.Л. Пылев, С.С. Бочкарева, В.Г. Сердюков, Е.Е. Рубальская, А.Д. Воропаев, Р.С. Махмудов // Астраханский медицинский журнал-2018.- №2 - С.17-31. - DOI: 10.17021/2018.13.2.17.31

65. Кисленко, В.Н. Экология патогенных микроорганизмов: Учеб. пособие/ В.Н. Кисленко // Новосибирский государственный аграрный университет.- Новосибирск, 2009.- с.294.

66. Козлов, Р.С. Практическое руководство по мониторингу антибиотикорезистентности с использованием платформы AMRcloud. Практическое руководство / Р.С. Козлов, А.Г. Виноградова, А.Ю. Кузьменков, И.В. Трушин [и др.] - Смоленск: СГМУ, 2021. -160с.: ил.

67. Козлова, А.Д. Применение метода ПЦР для выявления возбудителей инфекционных болезней в сперме крупного рогатого скота / А.Д. Козлова, Н.С. Горбачева, О.В. Клименкова, Е.А. Яралова, С.П. Яцентюк // Перспективы и актуальные проблемы развития высокопродуктивного молочного и мясного скотоводства: материалы Международной научно-практической конференции. Витебск, 25-27 мая 2017 г. / УО ВГАВМ; редкол: Н.И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. - Витебск, 2017. – С. 89-95.

68. Козлова, А.Д. Дифференциация *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Mycoplasma californicum* и выявление *Ureaplasma diversum* методом ПЦР в реальном времени / А.Д. Козлова, Н.С. Горбачева, Р.Ф. Хаерова, М.С. Красникова, Е.А. Лазарева, С.П. Яцентюк // Сельскохозяйственная биология. - 2019.- Т. 54. № 2.- С. 378-385.

69. Комаров, А.А. Исследование устойчивости к антимикробным средствам зоонозных бактерий, выделенных от продуктивных животных и из пищевой и кормовой продукции/ А.А. Комаров, С.Ю. Карабанов, Д.А. Макаров, О.Е. Иванова, А.Н. Богомазова, Н.А. Кирсанова, Е.С. Рябова, И.А. Тимофеева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2019. -Т. 21.- № 1.- С. 37.

70. Корниенко, М.А. Биохимические и генетические особенности реализации патогенности госпитальными штаммами *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus*: дисс. канд. биол. наук: 03.02.07 / Корниенко Мария Андреевна. – Москва, 2016. – 186с.

71. Косинцева, Е.А. Взаимосвязь бактериальной обсеменённости половых путей высокопродуктивных стельных коров с заболеваемостью неонатальными диареями новорожденных телят: дисс. канд. вет. наук: 06.02.01 / Елена Александровна Косинцева. - Екатеринбург, 2015. - 132 с.

72. Кузнецова, М.В. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*/ Кузнецова М.В., Николаева Н.В., Розанова С.М., Карпунина Т.И. // Журн. микробиол.- 2011-№ 4- С. 8-14.

73. Кузьменков, А.Ю. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности/ А.Ю.Кузьменков, И.В.Трушин, А.А.Авраменко, М.В.Эйдельштейн, А.В.Дехнич, Р.С.Козлов //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017. – Т.19. - №2. – С.84 – 90.

74. Кузьмин, В.А. Особенности создания ветеринарной геоинформационной системы на современном этапе/ В.А.Кузьмин, А.В.Святковский, Л.С.Фогель, С.А.Чунин, В.В.Пономарев, Ю.Н.Соколова // в книге: Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Тезисы докладов международного научнопрактического конгресса. – 2006. – С.128-132.

75. Кузьмин, В.А. Геоинформационные системы (ГИС) как инструмент прогнозирования устойчивости продовольственной ситуации в регионе / В.А. Кузьмин, А.Ю. Туманский, Л.П. Нилова, И.А. Хахаев, С.А. Чунин // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2015. – Т.1. - №8. – С.613-616.

76. Кузьмич, Р.Г. Биопленка микроорганизмов как фактор формирования резистентности к антибиотикам / Р.Г. Кузьмич, Е.С. Макарова, О.В. Тонко и др. // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена знак Почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2017. – № 2. – С. 76–80.

77. Кукеса, В.Г., Клиническая фармакология: учебник / под ред. В.Г. Кукеса.- Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008.- 1056 с.

78. Куриленко, А.Н. Бактериальные и вирусные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А.Н. Куриленко, В.Л. Крупальник., Н.В. Пименов.- Москва: Колос, - 2005. – 296 с.

79. Краснов, Я.М. Современные методы секвенирования ДНК (обзор)/ Я.М. Краснов, Н.П. Гусева, Н.А. Шарапова, А.В. Черкасов // Проблемы особо опасных инфекций - 2014 - выпуск 2 - С.73-79.

80. Красиков, А.П. Ассоциативные инфекционные болезни телят: Монография / А.П. Красиков, В.И. Афанасенко. - Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2008-275с.

81. Красиков, А.П. Микоплазмы человека и животных и их эпидемиологическое и эпизоотологическое значение: монография / А.П.

Красиков, Н.В. Рудаков. - Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник», 2016. - 608 с.: ил.

82. Красиков, А.П. Комплексная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота / А.П. Красиков, И.Г. Алексеева // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. - 2015. - №1(1) - URL: <http://e-journal.omgau.ru/index.php/2015-god/1/16-statya/73-00024>

83. Красникова, Л.В. Функциональные продукты из молочной сыворотки с использованием антагонистически активных штаммов ацидофильных лактобактерий / Л.В.Красникова, В.В. Маркелова, Н.Б. Вербицкая, О.В. Добролеж // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология.- 2012.- № 1 (325) - С. 41-43.

84. Красочко, П.П. Молекулярно-генетические, иммунологические и физические основы борьбы с инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота: автореф дис.... док. биол. наук: Красочко Павел Петрович - Щелково - 2018 г.- 47с.

85. Кротова, А.Л. Биологические свойства культур *Stenotrophomonas maltophilia*, изолированных от сельскохозяйственных животных с респираторными патологиями / А.Л. Кротова, С.А. Макавчик, Н.А. Антипова, М.А. Копылова, А.А. Сухинин // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2020. - № 3.- С. 36-40. - DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.3.36

86. Лабинская, А.С. ред. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 3. Том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова. - Москва: Бином; 2013.- с.228.

87. Лавренова, В. А. Обзор препаратов для лечения и профилактики маститов коров / Лавренова В.А.// Ценовик- №10 -2017 – С. 117-121.

88. Лазарева, Е.А. Скрининговые исследования спермы быков в ПЦР для выявления патогенов / Е.А. Лазарева, А.Д. Козлова, М.С. Красникова, С.М. Борунова, С.П. Яцентюк // Ветеринария. – 2019. - № 10. - С. 42-47.

89. Лаптев, Г.Ю. Исследование вагинальной слизи высокопродуктивных коров в послеотельный период посредством ПЦР в реальном времени / Г.Ю. Лаптев, Н.И. Новикова, Л.А. Ильина, Е.А. Ёылдырым, В.А. Думова, Е.А. Корочкина // Российский ветеринарный журнал. - 2014.- № 3.- С. 10-12.

90. Лев, А.И. Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам: дис.... канд. биол. наук: 03.02.03 / Лев Анастасия Игоревна – Оболенск, 2018. –182 с.

91. Леванова, Л.А. Значение биологических свойств клебсиелл в формировании нарушений микробиоценоза кишечника / Л.А. Леванова, Ю.В. Захарова //Фундаментальная и клиническая медицина. – 2016. – Т. 1. – № 1. – С. 46–50.

92. Ленченко, Е.М. Исследование биопленок и фенотипических признаков бактерий / Е.М. Ленченко, А.Н. Антонова // Ветеринария. – 2017. – № 10. – С. 31– 34.

93. Ленченко, Е.М. Этиологическая структура и дифференциальная диагностика бактериальных болезней телят / Е.М. Ленченко, И.А. Кондакова, Ю.В. Ломова // *Аграрная наука*. – 2017. – № 5. – С. 27-30.

94. Лещинский, И.И. Макролиды - препараты выбора для борьбы с микоплазмозами животных. *Российский ветеринарный журнал* / И.И. Лещинский // *Сельскохозяйственные животные*. - 2009. - № 1.- С.44-45.

95. Лоренгель, Т.И. Научно-практическое обоснование применения пробиотического препарата при выращивании телят/ Т.И. Лоренгель, В.И. Плешакова, А.В. Конев // В сборнике: *Инновации в научно-техническом обеспечении агропромышленного комплекса России. Материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции*. – Курск- 2020.- С. 325-329.

96. Макавчик, С.А. Эффективность определения *Mycoplasma bovis* в молоке коров при маститах с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на микрочипе с лиофилизированными тест-системами/ С.А. Макавчик // *Международный вестник ветеринарии*. - 2019.- № 2.- С. 11-16.

97. Макавчик, С.А. Гипермукоидные фенотипы *Klebsiella pneumoniae* и проблемы антибиотикотерапии сельскохозяйственных животных/ С.А. Макавчик // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2019.-№4.- С. 48-51. - DOI:10.17238/issn2072-6023.2019.4.48.

98. Макавчик, С.А. Биологические свойства *Staphylococcus haemolyticus* как возбудителя мастита сельскохозяйственных животных/ С.А. Макавчик, Л.И. Смирнова, А.А. Сухинин // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. - 2019. - № 4. - С.54-56.- DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4.54.

99. Макавчик, С.А. Виды коагулазонегативных стафилококков, выделенных из маститного молока коров, и их антимикробная восприимчивость *in vitro*/ С.А. Макавчик, А.Л. Кротова, А.А. Сухинин, Н.А. Антипова, И.В. Белкина // *Проблемы медицинской микологии*.- 2020. -Т. 22. № 3.- С. 101.

100. Макавчик, С.А. Этиологическая структура возбудителей мастита коров и их характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам в Северо-Западном регионе / С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, А.Л. Кротова, Л.В. Селиванова, Е.И. Приходько // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии* -2020. –№1- С.66-72. - DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.1.66

101. Макавчик, С.А. Эффективность Азициклина при респираторных инфекциях телят бактериальной этиологии/ С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, С.В. Енгашев, Е.С. Енгашева // *Ветеринария*. - 2020. - №5 - С. 24 - 27. - DOI: 10.30896/00424846. 2020.23.5.2427

102. Макавчик, С.А. Механизмы резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от крупного рогатого скота / С.А. Макавчик, А.Л. Кротова, Ж.Е. Баргман, А.А. Сухинин, Е.И. Приходько // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии* - 2020 г. - № 4 - С.41-47.- DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41

103. Макавчик, С.А. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение

антимикробных препаратов: монография / С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, С.В. Енгашев, А.Л. Кротова – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2021 г. – 152 с. : ил.

104. Макавчик, С.А. Антитела и их иммунологическая активность: учебно-методическое пособие / С.А. Макавчик, И.В. Белкина, А.А. Сухинин, А.Н. Семина, Е.И. Приходько, Л.И. Смирнова, В.О. Виноходов – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2019. - 41 с.

105. Макавчик, С.А. Антигены как индукторы иммунного ответа: учебно-методическое пособие / С.А. Макавчик, И.В. Белкина, А.А. Сухинин, Е.И. Приходько, Л.И. Смирнова, А.Н. Семина, В.О. Виноходов – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2019. - 20 с.

106. Макавчик, С.А. Иммунологические реакции: Учебное пособие / С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, И.В. Белкина, Е.И. Приходько, Л.И. Смирнова, В.О. Виноходов – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2019. - 109 с.

107. Макаров, В.В. Сапронозы, факторные и оппортунистические инфекции (к истории этиологических воззрений в отечественной эпидемиологии и эпизоотологии) / В.В. Макаров // Ветеринарная патология. – 2008. – № 1. – С. 7–17.

108. Макаров, В.В. Факторные болезни: так что же это такое? / В.В. Макаров // Ветеринарный консультант. – 2008. - № 6.– С. 3-7.

109. Макаров, В. В. Основы учения об инфекции (учебное пособие) / В. В. Макаров, А. К. Петров, Д. А. Васильев. - Москва/Ульяновск, РУДН/УлГАУ- 2018. - 160 с., илл.

110. Макаров, Д.А. Опыт использования онлайн-платформы Amrcloud для ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности зоонозных бактерий/ Д.А. Макаров, С.Ю. Карабанов, Е.А. Крылова, Ю.И. Поболелова, О.Е. Иванова, М.А. Гергель, А.В. Куликовский, А.В. Сухоедова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2020. - Т. 22. -№ 1. -С. 53-59.

111. Манжурина, О.М. Современные тенденции антибиотикорезистентности микробиоты домашних и диких животных/ О.М. Манжурина, А.М. Скогорева, Б.В. Ромашов Н.Б. Ромашова // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2017. - №1(52). – С. 41 – 45.

112. Маркелова, Н.Н. Возможные пути преодоления антибиотикорезистентности нозокомиальных патогенов *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* / Н.Н. Маркелова, Е. Ф. Семенов // Антибиотики и химиотерапия – 2018. – 63(11—12) –С.45-54.

113. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. - 16-е изд., перераб., испр. и доп. - М.: Новая волна, 2012.- 1216 с.

114. Маянский, А.Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 1. – С. 101–108.

115. Методические рекомендации по профилактике и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе и птиц / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, В.А. Кузьмин, Л.С. Фогель, Д.А. Орехов, Л.Ю. Карпенко, Ф.Л. Кан // Санкт-Петербург: ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017г.- 23с.

116. Методические рекомендации: Лабораторные методы диагностики инфекций, вызываемых *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*»/ С.А. Макавчик, А.Н. Ваганова, А.А. Сухинин, В.Н. Вербов, С.В. Борисенко, В.В. Рока // Санкт-Петербург: изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2020.- 49с

117. Методические рекомендации по диагностике и профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота / С.В. Герасимов, С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, В.А. Гришина, И.Г. Идиатулин // Санкт-Петербург: изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017 г. – 17 с.

118. Методические указания МУК 4.12.1890-04 «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» // Клиническая антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т.6. - №4. – С. 306-359.

119. Методические рекомендации «Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами» /В. Б. Белобородов, В. Г Гусаров, А. В. Дехнич, М. Н. Замятин, Н. А. Зубарева, С. К. Зырянов, Д. А. Камышова, Н. Н. Клишко, Р. С. Козлов, В. В. Кулабухов, Ю.С. Полушин, В. А. Руднов, С. В. Сидоренко, И.В. Шлык, М.В. Эдельштейн, С. В. Яковлев // Вестник анестезиологии и реаниматологии.- Том 17- № 1- 2020.- DOI. 10.21292/2078-5658-2020-17-1-52-83

120. Методические рекомендации по выделению, культивированию и идентификации микоплазм, ахлеплазм и уреаплазм. — Москва : ВАСХНИЛ – ВИЭВ, 1982. — 47 с.

121. Методы статистической обработки медицинских данных: Методические рекомендации для ординаторов и аспирантов медицинских учебных заведений, научных работников / сост.: А. Г. Кочетов, О. В. Лянг., В. П. Масенко, И. В. Жиров, С. Н. Наконечников, С. Н. Терещенко - Москва: РКНПК, 2012. - 42 с.

122. Мищенко, В.А.. Влияние физиологического и иммуно-биологического статуса крупного рогатого скота на уровень поствакционного иммунитета/ В.А. Мищенко, А.В. Кононов, А.В. Мищенко, В.В. Думова, Т.Б. Никешина, Д.К. Павлов и др. // Ветеринария Кубани.- 2008.- № 2.- С. 12-13.

123. Мищенко, В.А. Проблема иммунодефицитов у крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, А. В. Кононов [и др.] // Ветеринарная патология. - 2006. - N 11. - С. 17-20.

124. Морз, С. А. Быстрый молекулярный анализ для диагностики инфекционных заболеваний / С.А. Морз // Молекулярная медицина.- 2005.- №3. - С.51.

125. Муравьева, В.В. Сравнительная оценка видовой идентификации вагинальных изолятов дрожжевых грибов методом MALDI–TOF–MS и

традиционными (биохимическим и фенотипическим) методами / В.В. Муравьева, Т.В. Припутневич, М.Г. Завьялова, А.С. Анкирская, Е.Н. Ильина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т.16, №1. – С.1 – 7.

126. Назарова, Л. С. Клиническая микробиология с основами иммунологии: учебное пособие / Л. С. Назарова // ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ» - Саратов, 2011. - 282 с.

127. Наркевич, И.А. Система фармаконадзора: международный опыт и перспективы в России/ И.А. Наркевич, О.Д. Немятых, З.А. Кулдыркаева и др.// Фармация. 2016.- № 7.- Т. 65. - С. 3-7.

128. Никулина, Н.Б. Неспецифическая бронхопневмония телят : учебное пособие / Н.Б.Никулина, С.В. Гурова, В.М. Аксенова; М-во с.-х. РФ, федеральное гос. бюджетное образов. учреждение высшего образов. «Пермский гос. аграрно-технолог. ун-т им. акад. Д.Н. Прянишникова». – Пермь : ИПЦ «Прокрость», 2017. – 72 с.

129. Николаенко, В.П. Фармако-токсикологическая характеристика нового комплексного антибактериального препарата / В.П. Николаенко, И.Н. Шестаков, А.В. Михайлова // Ветеринария. –2017. – №2. – С.53-56

130. Окулич, В.К. Роль микробных биоплёнок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе / В.К. Окулич, Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2012. - № 4.-С. 70-82.

131. Окулич, В.К. Микробиологические и иммунологические аспекты инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями, образующими биопленку / В.К. Окулич // Вестн. ВГМУ. - 2016. - Т. 15, № 5. - С. 52-63.

132. Окулич, В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с. : ил

133. Определитель бактерий Берджи: в 2 т.: пер.с англ./ под ред. Дж. Хоулта [и др.]. –М.:Мир, 1997.

134. Оробец, В.А. Эффективность терапии желудочно-кишечных болезней телят/ В.А. Оробец, О.И. Севостьянова // В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии. Сборник научных трудов Международной учебно-методической и научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня основания ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина».- 2019.- С. 152-154.

135. Оробец, В.А. Фармакологическая коррекция метаболических процессов у высокопродуктивных животных/ В.А. Оробец, И.В. Киреев, О.И. Севостьянова // В сборнике: Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности. Сборник научных статей по материалам 85-й Международной Научно-практической конференции «Аграрная наука - Северо-Кавказскому федеральному округу». 2020.- С. 314-321.

136. Орлова, С.Т. Культивирование микоплазм — ретроспектива и перспективы / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // Российский ветеринарный журнал. — 2018. — № 5. — С. 6-13.

137. Панин, А. Н. Проблема резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных/А. Н. Панин, А. А. Комаров, А. В. Куликовский, Д. А. Макаров// Ветеринария, зоотехния и биотехнология -2017-№5- С.18-24.

138. Патент № 2733144 Российская Федерация, МПК С12N 1/20 (2020/02); А61К 39/0266 (2020/02); С12R 1/22(2020/02) Штамм *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae*, обладающий способностью к биопленкообразованию: № 2019145273 заявл 25.12.2019, опубл 29.09.2020 Бюл. № 28/ Макавчик С.А., Сухинин А.А., Смирнова Л.И., Забровская А.В., Егорова С.А., Михайлов Н.В. – 4с.

139. Патент № 2642249 С2 Российская Федерация, МПК А61К 39/02 (2017.08); С12N 1/02 (2017.08); С12N 1/20 (2017.08): Способ инактивации возбудителя кампилобактериоза крупного рогатого скота: №2016112210, заявл 31.03.2016, опубл. 24.01.2018 Бюл. № 3/ Сухинин А.А., Гришина В.А., Герасимов С.В., Макавчик С.А.- 6с.

140. Патент № 2644654 С2 Российская Федерация, МПК А61К 39/105 (2006.01); А61К 31/53 (2006.01). Способ получения гидроокись алюминиевой масляной тео-вакцины против кампилобактериоза: № 2016129877 заявл 20.07.2016, опубл 13.02.2018 Бюл. № 5/ Сухинин А.А., Герасимов С.В., Макавчик С.А.-6с.

141. Патент на изобретение № 2371190 Российская Федерация, МПК А61К 35/66 (2006.01) А61Р 1/14 (2006.01), Средство для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта цыплят: № 2006137178/13 от 23.10.2006 опубл. 27.10.2009 Бюл. №30 / Макавчик С.А., Сухинин А.А., Вербицкая Н.Б., Виноходов В.О.- 9с.

142. Пашкова, Т.М. Роль факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов в инфекционном процессе: дис. ...доктор биол. наук : Пашкова Татьяна Михайловна - Уфа, 2018.- 276с.

143. План мероприятий на 2019-2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Утвержден распоряжением Правительства Российской Федерации от 30 марта 2019 г. № 604-р. <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71677266>

144. Поляк, М.С. Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии / М.С. Поляк. – Санкт-Петербург: Анатолия, 2012. - 256 с.

145. Попов, Д. А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз / Д. А. Попов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2019. - Т. 21, № 2 - С. 125-133.

146. Поздеев, О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей / О.К. Поздеев, Р.В. Федоров //Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007 – 720 с.

147. Порт Е.В. Изучение адгезивных свойств штаммов синегнойной палочки/ Е.В.Порт// Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Серия «Медицина» - 2004. - С.11-15.

148. Припутневич, Т.В. Внедрение масс-спектрометрии для улучшения качества микробиологической диагностики в практике акушерства, гинекологии и перинатологии / Т.В. Припутневич, А.С. Анкирская, Е.Н. Ильина, В.В. Муравьева, Л.А. Любасовская, А.Р. Мелкумян, М.Г. Завьялова, В.В. Зубков, И.В. Никитина // Лаборатория. – Москва, 2012 . – №2. – С.52.

149. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации / Под ред. С. В. Яковлева, Н. И. Брико, С. В. Сидоренко, Д. Н. Проценко. - М.: Перо, 2018. - 156 с.

150. Пыж, А.Э. Вклад сине-зеленых пигментов *Pseudomonas aeruginosa* в гемолитическую активность культуральной жидкости/ А.Э. Пыж, В.Н. Никандров // Журнал микробиологии. -2011. -№ 1 – С. 19-25.

151. Прямчук, С.Д. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp., выделенных в России в 2003-2007 гг. / С.Д. Прямчук, Н.К., Фурсова, И.В. Абаев, Ю.Н. Ковалев, Н.А. [и др.] // Антибиот. Химиотер. – 2010. – Т. 55, № 9-10. – С. 3-10.

152. Перцева, Т.А. Клинически значимые возбудители инфекций дыхательных путей / Т.А.Перцева, Р.А. Бонцевич // Клиническая иммунология. Аллергия. Инфектология. -2006.- №4 - С.31-34.

153. Пушкарева, В.И. Паразитизм в простейших как стратегия существования патогенных бактерий в почвах и водоемах/ В.И. Пушкарева // Успехи соврем. биол.- 2006. - № 4.- С. 323 - 333.

154. Рекомендации по оптимизации антимикробной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии (Пособие для врачей)/ Л.С. Страчунский, Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. - Т.4, № 4- С. 390.

155. Родин, В.Б. Перекрёстная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, сопряженная с резистентностью к дезинфектантам / В.Б. Родин, Е.Н. Кобзев, Е.В. Дегушева [и др.] // Дезинфекционное дело.- 2011. - №4- С. 20–6.

156. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты): часть вторая : под ред. А. Н. Миронова. - Москва: Гриф и К, 2013. - 536 с.

157. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: часть первая : под ред. А. Н. Миронова. - Москва: Гриф и К, 2012. - 944 с.

158. Сипайлова, О.Ю. Антимикробные низкомолекулярные пептиды: факторы неспецифической защиты организма животных / О.Ю. Сипайлова, Д.В. Нестеров // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. - 2013. - № 12. -С. 169-172.

159. Сидоренко, С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины / С.В. Сидоренко // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4. – № 2. – С. 38–41.
160. Сидоренко, С.В. Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к цефалоспориновым антибиотикам / С. В. Сидоренко, А. Г. Березин, Д. В. Иванов // Антибиотики и химиотерапия. - 2011. - 49(3). - С. 6-16.
161. Сизенцов, А.Н. Оценка эффективности совместного применения антибиотиков и пробиотиков в условиях *in vitro* / А.Н. Сизенцов, Г.В. Карпова, В.Ф. Володченко, А.А. Тимофеева // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 3.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26374> (дата обращения: 28.10.2020).
162. Смирнова, Л.И. Особенности проявления и диагностики уреаплазменной инфекции крупного рогатого скота в условиях промышленного животноводства / Л.И. Смирнова, Л.В. Темникова // Международный вестник ветеринарии. – 2009. – № 3. – С. 6–9.
163. Смирнова, Л.И. Санитарно-микробиологическое значение и методы выявления *Pseudomonas aeruginosa*: Учебно-методическое пособие / Л.И. Смирнова, С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, Е.И. Приходько, И.В. Белкина – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2019. - 23 с.
164. Смирнова, Л.И. Роль бактерий рода *Klebsiella* при ассоциированных инфекциях коров и телят в условиях промышленного комплекса/ Л.И.Смирнова, А.В. Забровская, Е.И. Приходько, В.Э. Ярикова, Д.М. Гегирова// Международный вестник ветеринарии. – 2014. – №3. – С.7-11.
165. Смирнова, Л.И. Биологические свойства микроорганизмов вида *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, выделенных из молока коров при мастите/ Смирнова Л.И., Забровская А.В., Егорова С.А., Приходько Е.И., Ярикова В.Э., Гегирова Д.М. // Международный вестник ветеринарии. – 2014. - №2. – С.12-16.
166. Смирнова, Л.И. Атипичные свойства *Streptococcus dysgalactiae* – возбудителей мастита коров / Л.И. Смирнова, Е.И. Приходько, С.А. Макавчик // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии- № 4 - 2020 .- С. 56-59. - DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.56
167. Смирнова, Л.И. Атипичные биологические свойства и чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов—возбудителей мастита. Л.И. Смирнова, С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, В.А. Кузьмин, Л.С. Фогель // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - № 4 - 2020.- С. 62-66.- DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.62
168. Страчунский, Л.С. β-лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза / Л.С. Страчунский // Клинический Микробиол Антибак Химотер. – 2005. – Т. 1, №. 7. – С. 92–96.
169. Страчунского, Л.С. Антибактериальная терапия / Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — Москва: Полимаг, 2000. — 190 с.

170. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // Биопрепараты. - 2011. - № 2. - С. 4-44.

171. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2013–2014/ М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Микотина, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2017.– Т. 19. – № 1. – С. 49-56.

172. Сухинин, А.А. Полимеразная цепная реакция для выявления *Ureaplasma diversum* у крупного рогатого скота / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, Л.И. Смирнова, Е.И. Приходько // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2017. – №1. – С. 45–47.

173. Сухинин, А.А. Бактериологический и молекулярно-генетический метод для выделения и идентификации *Mycoplasma bovis* у крупного рогатого скота / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, Л.И. Смирнова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2016.- № 4.- С. 80-83.

174. Сухинин, А.А. Применение теотропина как инактиватора при производстве инактивированной вакцины против кампилобактериоза крупного рогатого скота/ А.А. Сухинин, С.В. Герасимов, В.А. Гришина, С.А. Макавчик// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2016. - № 3.- С. 68-71.

175. Сухинин, А.А. Сорбционная экстракция нуклеиновых кислот с магнитными частицами в лабораторной диагностике инфекционных болезней / А.А.Сухинин, С.А.Макавчик, О.В.Прасолова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2015. - № 3 - С. 70-74.

176. Сухинин, А.А. Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота в Северо-Западном регионе / А.А.Сухинин, С.А. Макавчик, С.В.Герасимов, О.В. Прасолова // Ветеринария - 2015. - № 12. - С. 21-24.

177. Сухинин, А.А. Аспекты применения полимеразной цепной реакции (Real-time PCR) для лабораторной диагностики инфекционных болезней/ А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, С.В. Герасимов, О.В. Прасолова // Межведомственная научно-практическая конференция «Инфекционные болезни - актуальные проблемы, методы борьбы и профилактика», сб. мат., - Москва, 2015. - с. 59.

178. Сухинин, А.А. Кампилобактериоз в этиологической структуре бактериальных инфекций репродуктивного тракта крупного рогатого скота в Северо-Западном регионе / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, С.В. Герасимов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- 2017. - № 4. - С. 40-42.

179. Сухинин, А.А. Перспективы применения мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real - time PCR) в ветеринарии / А.А.Сухинин, С.А.Макавчик, О.В. Прасолова // международный

Ветеринарный Конгресс International VETistanbul Group Congress-2015., сб. мат. - СПб, 2015. - С. 344.

180. Сухинин, А.А. Применение полимеразной цепной реакции в молекулярной диагностике инфекционных болезней животных / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, О.В. Прасолова, М.В. Виноходова // Санкт-Петербург: Изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017,— 96 с.

181. Скородумов, Д.И. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных / Д.И. Скородумов, В.В. Субботин, М.А. Сидоров, Т.С. Костенко Т.С.: - Москва: «ИзографЪ» - 2005. - 441с.

182. Сомов, Г.П. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды / Г.П. Сомов, Л.С. Бузолева // Владивосток: ОАО «Полиграфкомбинат» - 2004. - 168 с.

183. Соловей, Н.В. Полирезистентная синегнойная инфекция/ Н. В. Соловей, И. А. Карпов //Монография: LAP LAMBERT Acad. Publ.- 2014. -204с

184. Тец, Г.В. Совместное действие антибиотиков и дезоксирибонуклеазы на бактерии/ Г.В. Тец, К.Л. Артеменко // Антибиотики и химиотерапия.- 2006.- Т.51, №6.- С.3-6.

185. Тржецинский, С.Д. Фармакология противомикробных, противопаразитарных, противовирусных лекарственных средств. (Смысловой модуль 6, VII семестр) : учеб.- метод. пособие для студентов фармац. факультета заочной форм обучения (специальность «Фармация») / С. Д. Тржецинский, Е. В. Гречаная, Г. В. Мазулин [и др.]. – Запорожье : [ЗГМУ], 2016. – 104 с.

186. Туркутюков, В.Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам / В.Б. Туркутюков // Тихоокеан. мед. журн. - 2011. - № 2. - С. 28-31.

187. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ : учеб. пособие / Р. У Хабриев ; под ред. Р.У. Хабриева ; 2-е издание. - Москва : Медицина, 2005. - 832 с.

188. Хаитов, Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие / Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 280 с.

189. Харсеева, Г.Г. Биопленки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса / Г.Г. Харсеева, Я.Н. Фролова, А.Ю. Миронов // Успехи современной биологии. – 2015. – № 4. – С. 346–354.

190. Хлопицкий, В.П. Комплекс диагностических и лечебно-профилактических мероприятий при воспалительных заболеваниях органов репродукции у коров / В.П. Хлопицкий, А.А. Сидорчук, С.В. Васенко, Х.С. Горбатова, А.В. Филатов, А.Ч. Джамалдинов // Ветеринария. - 2016. - № 7. - С.42-46.

191. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины». Отчёт о выполнении тематического плана научно-исследовательских работ по заказу Минсельхоза России за счёт средств федерального бюджета в 2016 году // Санкт-Петербург. - 2016. - 112 с.

192. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины». Отчёт о выполнении тематического плана научно-исследовательских работ по заказу Минсельхоза России за счёт средств федерального бюджета в 2020 году // Санкт-Петербург. - 2020. - 112 с.

193. Фурсова, Н.К. Лекарственная устойчивость микроорганизмов/ Н.К. Фурсова // Учебное пособие. МО, Щёлково: Издатель Мархотин П.Ю., 2012 – 248с.

194. Чеботарь, И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета / И.В. Чеботарь // Вестн. Рос. акад. мед. наук. - 2012. - Т. 67, № 12. - С. 22-29.

195. Чеботарь, И.В. Нейтрофилы и биопленка: диалектика взаимоотношений/ И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова // Журнал микробиологии.- 2013. - № 6- С.105-11.

196. Ческидова, Л.В. Экспериментальная и клиническая фармакология пенных терапевтических аэрозолей для лечения воспалительных заболеваний половых органов у коров и свиноматок: дис.... доктора ветеринарных наук: 06.02.03 / Ческидова Лилия Валерьевна - 2017. - 330 с.

197. Шабунин, С.В. Респираторные болезни телят: современный взгляд на проблему / С.В. Шабунин, А.Г. Шахов, А.Е. Черницкий, А.И. Золотарев М.И. Рецкий // Ветеринария – 2015. - № 5- С.3 - 13.

198. Шкарин, В.В. Современные представления о механизмах устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам / В.В. Шкарин, А.С. Благоданова, О.В. Ковалишена // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.- 2011. - № 3 - С. 48–53.

199. Щепёткина, С.В. Разработка системы контроля антибиотикорезистентности в условиях сельскохозяйственного производства / С.В. Щепёткина, В.П. Терлецкий, О.Б. Новикова // В книге: I-й Российский Микробиологический конгресс. Сборник тезисов. Под редакцией Т.А. Решетиловой.- 2017. - С. 135.

200. Щепёткина, С.В. Решение проблемы антибиотикорезистентности в условиях производства / С.В. Щепёткина //Сельскохозяйственные вести- 2016. - 2- С. 55-57.

201. Эйдельштейн, М.В. Выявление β -лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. Пособие для врачей / М.В. Эйдельштейн //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 2. – С. 183-189.

202. Эйдельштейн, М. В. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015-2016»/ М. В. Эйдельштейн, Е. А. Шек, М. В. Сухорукова и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2019. -Т. 21, № 2. - С. 168-178.

203. Яковлев, В.П.. Рациональная антимикробная фармакотерапия: руководство для практикующих врачей / В.П.Яковлев. С.В.Яковлев и др.- М.: Литтерра, 2003.- 1008 с.
204. Яцентюк, С.П. Использование метода ПЦР для выявления возбудителей инфекционных болезней в сперме крупного рогатого скота/ С.П. Яцентюк, Н.С. Горбачева, Е.А. Яралова, А.Д. Козлова // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. - 10(70) – P. 331-337. - DOI: 10.18551/rjoas.2017-10.47.
205. Adamek, M. Genotyping of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and their pathogenic potencial / M. Adamek, J. Overhage, S. Bathe// Plos One. - 2011.- V.6 –Iss.11- Art.e27615.- P. 1-11.
206. Ageevets, V.A. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia / V.A. Ageevets, I.V. Partina, E.S. Lisitsyna, E.N. Пина, Y.V. Lobzin // Int J Antimicrob Agents. - 2014. - № 44: 2- P. 152-155.
207. Aguilar, B. Cell death as a trigger for morphogenesis / B. Aguilar, A. Ghaffarizadeh, C.D. Johnson, G.J. Podgorski, I. Shmulevich, N.S. Flann // PLoS One. - 2018. - 13(3):e0191089. - DOI.10.1371/journal.pone.0191089.
208. Ahmed, AA. Antimicrobial agent resistance in bacterial isolates from patients with diarrhea and urinary tract infection in the Sudan / A.A.Ahmed, H. Osman, A.M. Mansour, H.A. Musa, A.B. Ahmed, Z. Karrar //Am J Trop Med Hyg - 2000- 63- P. 259-263.
209. Aires-de-Sousa, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview / M. Aires-de-Sousa // Clin Microbiol Infect. – 2017. – V.23, N.6. – P. 373–380.
210. Alonso, A. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology / A. Alonso, G. Morales, R. Escalante // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2004. - V.53. -№3- P. 432-434.
211. Albin, S. *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the airways of animals with chronic respiratory disease. / S. Albin, C. Abril, M. Franchini, D. Hüsey, G. Filioussis //Schweiz Arch Tierheilkd. -2009. -151-P. 323-328.
212. Alibert-Franco, S. Efflux pumps of gram-negative bacteria, a new target for new molecules / S. Alibert-Franco, A. Mahamoud, J. M. Bolla, A. Davin-Regli, J. Chevalier, E. Garnotel //Current Topics Med Nhem. – 2010. -№ 10 (18) –P. 1848—1857.
213. Anderson, N. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / N.W. Anderson, B.W. Buchan, K.M. Riebe, L.N. Parson, S. Gnacinski, N.A. Ledebor // J Clin Microbiol. - 2012. - Vol. 50, N 3.-P. 1631 -38.
214. Anueyiagu, K.N. Isolation, identification of *Staphylococcus aureus* from bovine milk and its antibiotics susceptibility / International Journal of Livestock Production// K.N. Anueyiagu, A.W. Isiyaku – 2015. - 6(6)- P. 74-77. - DOI: 10.5897/IJLP2015.0248.
215. Antoci, E. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among subjects working on bovine dairy farms / E.

Antoci, M.R. Pinzone, G. Nunnari, S. Stefani, B. Cacopardo // Infez Med. – 2013. – V.21, N.2. – P.125-129.

216. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis* / X. Meng [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. - 2011. - Vol. 77, N 23. - P. 8272-8279.

217. Argue, B. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population/ B. Argue, K.K. Chousalkar, P.J. Chenoweth // Australian Veterinary Journal- 2013.- 91(3) –P. 99-101. - DOI:10.1111/avj.12009.

218. Ayrapetyan, M. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria/ M. Ayrapetyan, T.C. Williams, J.D. Oliver // Trends Microbiol. – 2015. - 23(1) – P. 7-13. - DOI. org/10.1016/j.tim.2014.09.004.

219. Bal, A.M. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions / A.M. Bal, G.W. Coombs, M. T.G. Holden, J.A. Lindsay, G.R. Nimmo, P. Tattevin, R.L. Skov // J Glob Antimicrob Resist. - 2016. - N.6. - P.95-101.

220. Bassetti, M. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections/ M. Bassetti, E. Righi // Current Opinion in Critical Care. - 2015. - Vol. 21, № 5. - P. 402-411.

221. Bayssari, Al C. Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon/ C. Al Bayssari, F. Dabbousi, M. Hamze, J.-M. Rolain // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2015. - DOI:10.1093/jac/dku469.

222. Bonomo, R.A. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter species* and *Pseudomonas aeruginosa* / R.A. Bonomo // Clinical Infectious Diseases. - 2006. - V.43.- Suppl.2. - P.4956.

223. Bos, M.E. Livestock-associated MRSA prevalence in veal calf production is associated with farm hygiene, use of antimicrobials, and age of the calves / M.E. Bos, H. Graveland, L. Portengen, J.A. Wagenaar, D.J. Heederik // Prev Vet Med. – 2012. – V.105, N.1-2. – P.155-159.

224. Bamford, R.A., Smith A., Metz J., Glover G., Titball R.W., Pagliara S. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy/ R.A. Bamford, A. Smith, J. Metz, G. Glover, R.W. Titball, S. Pagliara // BMC Biol. – 2017. - 15(1)- P. 121. - DOI. org/10.1186/s12915-017-0465-4.

225. Brandt, K.M. Evaluation of multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for typing livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / K.M. Brandt, A. Mellmann, B. Ballhausen, C. Jenke, P.J. van der Wolf, E.M. Broens, K. Becker, R. Köck // PLoS One. – 2013. – V.8, N.1. – P.54425.

226. Brooke, J.S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen / Brooke, J.S. // Clinical Microbiology Reviews.-2012. - 25 (1) - P. 2-41.

227. Bialek-Davenets, S. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups/ S.Bialek-Davenets, A.Coriscuolo,

F.Ailloud [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2014. – Vol.20 (11). – P.1812-1820.

228. Boonyayatra, S. PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary *Mycoplasma* species causing mastitis / S. Boonyayatra, L.K. Fox, T.E. Besser, A. Sawant, J.M. Gay, Z.A. Raviv // Journal of Dairy Science.- 2012. - 95(1)- P. 196-205. - DOI: 10.3168/jds.2011-4531.

229. Bürki, S. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovi*/ S. Bürki, J. Frey, P. Pilo // Veterinary Microbiology. - 2015. - 179(1-2) – P. 15-22. - DOI:10.1016/j.vetmic.2015.02.024.

230. Carmen, G. Biofilm Matrix Exoproteins Induce a Protective Immune Response against *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection / G. Carmen [et al.] // Infect. Immun. - 2014. - Vol. 82, N 3. - P. 1017-1029.

231. Canton, R. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe / R. Canton, M. Akova, Y. Carmeli, C.G. Giske, Y. Glupczynski, M. Gniadkowski, D.M. Livermore, V. Miriagou, T. Naas, G.M. Rossolini [et al.] // Clin Microbiol Infect- 2012. - 18: 5-P. 413-431.

232. Castillo-Juárez, I. Role of quorum sensing in bacterial infections / I. Castillo-Juárez, T. Maeda, E.A. Mandujano-Tinoco [et al.] // World J Clin Cases. – 2015. – Vol. 3, No. 7. – P. 575-598.

233. Chapman, J.S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance and co-resistance / J.S. Chapman // Int. Biodeter. Biodegrad. – 2003. - 51-P. 271–6.

234. Cheng, H.Y. *RmpA* regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43/ H.Y.Cheng, Y.S.Chen, Wu C.Y., H.Y. Chang, Y.C. Lai, H.L. Peng // J.Bacteriol. – 2010. – Vol.192. – P.3144-3158.

235. Clemmons, B.A. Vaginal and Uterine Bacterial Communities in Postpartum Lactating Cows / B.A. Clemmons, S.T. Reese, F.G. Dantas, G.A. Franco, T.P.L. Smith, O.I. Adeyosoye, K.G. Pohler, P.R. Myer // Front Microbiol. - Jun, 2017. - v. 8. - P. 1047-1055.

236. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Available at: www.clsi.org.

237. Coldham, N. Epidemiology of ESBL *E.coli* on cattle farms. VLA&GVS/AGV National Conference 2010 University of Warwick 22-24 September 2010. New Horizons– working together. Abstracts. Режим доступа: http://www.vla.defra.gov.uk/neww/new_conf_vla2010.htm#farm.

238. Crossman, L. C. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants / L. C.Crossman, V. C. Gould, J. M. Dow [et al.] // Genome Biol. -2008. -9 (4) - P.74.

239. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva: World Health Organization; 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>. Accessed December 20, 2019.

240. Cuny, C. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany / C. Cuny, R. Köck, W. Witte // Int J Med Microbiol. – 2013. – V.303, N.6-7. – P.331–337.
241. Dawgul, M. Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm / M. Dawgul [et al.] // Acta Pol. Pharm. - 2014. - Vol. 71, N 1. - P. 39-47.
242. Diene, S.M. Carbapenemase genes and genetic platform in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species/ S.M.Diene, J.M.Rolain //Clinical Microbiology and Infection. – 2014. – Vol.20. – P.831-838.
243. Doumith, M. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK / M. Doumith, M. J. Ellington, D. M. Livermore [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy.- 2009. - Vol. 63, № 4. - P. 659-667.
244. Doyle, D. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases / D. Doyle, G. Peirano, C. Lascols [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. - 2012. - Vol. 50, №. 12. - P. 3877-3880.
245. Edelstein, M. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spec -trum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals / M. Edelstein, M.Pimkin, I. Palagin, I. Edelstein, L. Strachounski // Antimicrob Agents Chemother – 2003. - 47: 12- P. 3724-3732.
246. Enoch, D.A. Non-fermentative Gram-negative bacteria / D.A. Enoch, C.I. Birkett, H.A. Ludlam // Int J Antimicrob Agents- 2007. - 29 (3) - P. 33-41.
247. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). MIC distributions and ECOFFs <https://mic.eucast.org/search/>.
248. EUCAST. Экспертные правила определения чувствительности к антибиотикам EUCAST. Доступно по адресу: https://www.eucast.org/expert.org/expert_rules_and_intrinsic_resistence/
249. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA Journal. - 2018- 16(2)- P. 5182.- DOI:10.2903/j.efsa.2018.5182
250. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. EFSA Journal. – 2019. - 17(2)- P. 5598. - DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5598
251. ECDC. Surveillance Atlas on Infectious Disease. Available at: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. Accessed January 12, 2020.
252. Ewers, C. OXA-23 and ISAbal-OXA-66 class D β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals / C. Ewers, P. Klotz, U. Leidner, I. Stamm, E. Prenger-Berninghoff, S. Göttig, T. Semmler, S. Scheufen // Int J Antimicrob Agents – 2017. - 49 - P.37–44. - DOI.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.033
253. Errington, J. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life/ J. Errington, K. Mickiewicz, Y. Kawai, L.J. Wu // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci - 2016. - 371(1707)- P. 20150494. - DOI. org/10.1098/rstb.2015.0494.

254. Ferrer, M. Antibiotic use and microbiome function/ M. Ferrer, C. Méndez-García, D. Rojo, C. Barbas, A. Moya // *Biochem Pharmacol.* -2017. - 134 - P. 114-126. - DOI.org/10.1016/j. bcp.2016.09.007.

255. Fraser, B.C. Associations of various physical and blood analysis variables with experimentally induced *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves/ B.C. Fraser, D.E. Anderson, B.J. White, M.D. Miesner, J. Lakritz, D. Amrine, D.A. Mosier // *American Journal of Veterinary Research*- 2014. - 75(2) - P. 200-207. - DOI: 10.2460/ajvr.75.2.200.

256. Fisher, R.A. Persistent bacterial infections and persister cells / R.A.Fisher, B.Gollan, S. Helaine // *Nat Rev Microbiol.* – 2017. - 15(8) - P. 453-464. - DOI.org/10.1038/nrmicro.2017.42.

257. Flemming, H. C. The biofilm matrix/ H. C. Flemming, J. Wingender // *Nat Rev Microbiol.* - 2010.- Vol. 8. № 9. - P. 623-633.

258. Gaeti, J.G. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil / J.G. Gaeti, M.V. Lana, G.S. Silva, L. Lerner, C.G. de Campos, F. Haruni, E.M. Colodel, E.F. Costa, L.G. Corbellini, L. Nakazato, C.A. Pescador // *Tropical Animal Health and Production.*-2014. - 46(6)- P. 1059-1063. - DOI: 10.1007/s11250-014-0614-5.

259. Gazin, M. Evaluation of GeneO hmVanR and Xpert vanA/vanB molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci / M .Gazin, C. Lammens, H.Goossens [et al.] // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* - 2012. - Vol. 31, № 3. - P. 273-276.

260. Garmo, M.T. Reproductive performance, Udder Health and Antibiotic Resistance in mastitis Bacteria isolated from Norwegian Red cows on Conventional and Organic Farming/ M.T.Garmo, S. Waage, S.Sviland. B.I.F. Henriksen, O.Osteras, O.Reksen// *Acta Veterinaria Scandinavica.* – 2010. – Vol.52. – P.11. - DOI: 10.1186/1751/0147-52-11.

261. Ghanem, M.E. *Mycoplasma* infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis/ M.E. Ghanem, H. Higuchi, E. Tezuka, H. Ito, B. Devkota, Y. Izaike, T. Osawa // *Theriogenology.* – 2013. - 79(1) - P.180-185. - DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.09.027.

262. Giske, C. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumonia* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin / C.Giske, G.Gezielus, L.Samuelsen. [et al.] // *Clinical microbiology and infection.* - 2011. - Vol. 17, № 4. - P. 552-556.

263. Gniadkowski, M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation / M. Gniadkowski // *Clinical Microbiology and Infection.* - 2008. - Vol. 14. - P. 11-32.

264. Gostev, V. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya, O. Dmitrenko, O. Khokhlova, T. Yamamoto, Y. Lobzin, I. Ryabchenko, S. Sidorenko // *Infect Genet Evol.* – 2017. – V. 53. – P.189–194.

265. Greissl, C. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in *Enterobacteriales* by a new multiplex immunochromatographic test / C. Greissl, A. Saleh, A. Hamprecht // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 38, № 2. - P. 331-335.

266. Graage, R. Septicaemia in piglets associated with a positive finding of a methicillin-resistant *S. aureus* strain / R. Graage, M. Ganter, J. Verspohl, B. Strommenger, K.H. Waldmann, W. Baumgartner, I. Hennig-Pauka // *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere*. - 2014. - № 42 (3). - P. 163-168.

267. Graveland, H. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans / H. Graveland, B. Duim, E. van Duijkeren, D. Heederik, J.A. Wagenaar // *Int J Med Microbiol*. - 2011. - V.301, N.8. - P.630-634.

268. Gregory, L. / Interference of *Mycoplasma* spp. or *Ureaplasma* spp. in Ovine Semen Quality/ L. Gregory, H. Rizzo, N.C. Gaeta, G. Tortorelli, M.V. Cardoso, E. Mettifogo, M. Buzinhani, J. Timenetsky // *Journal of Microbiology Research*. - 2012. - V. 2. - № 5. - P. 118-122.

269. Grohn, Y.T. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows/ Y.T.Grohn, D.L.Wilson, R.N.Gonzalez, J.A.Hertl, H.Schulte H. et al.//*J.Dairy Sci*. - 2004. - 87. - P.3358-3374.

270. Gualerzi, K.O. Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance / K.O. Gualerzi [et al.]. -New York : Wiley. - 2013. - 576 p.

271. Guimaraes, A.M. Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas / A.M. Guimaraes, A.P. Santos, N.C. do Nascimento, J. Timenetsky, J.B. Messick // *PLoS One*. - 2014. - V.9, N.3, e91445.

272. Guion, C.E. Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR/ C.E. Guion, T.J. Ochoa, C.M. Walker, F.Barletta, T.G.Cleary// *Journal of Clinical Microbiology*. - 2008. - P.1752-1757. - DOI:10.1128/JCM.02341-07.

273. Gurung, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea / M. Gurung, H.M. Nam, M.D. Tamang, M.H. Chae, G.C. Jang, S.C. Jung, S.K. Lim // *J Dairy Sci*. - 2013. - 96- P.1997-2002. - DOI.org/10.3168/jds.2012-5965

274. Haenni, M. Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France/ M. Haenni, D. Hocquet, C. Ponsin, P.Cholley, C. Guyeux, J.-Y.Madec, X. Bertrand// *BMC Veterinary Research*. - 2015. -Vol.11. - P.9. - DOI 10.1186/s12917-015-0324-x.

275. Harms, A. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure / A. Harms, E. Maisonneuve, K. Gerdes // *Science*. - 2016. - 354(6318). - DOI.org/10.1126/ science.aaf4268.

276. Hou, D. Identification of swine influenza A virus and *Stenotrophomonas maltophilia* co-infection in Chinese pigs / D. Hou, Y. Bi, H. Sun [et al.] // *Virology*. - 2012. - 9 - P. 169.

277. Haapala, V. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds/ V. Haapala, T. Pohjanvirta, N. Vähänikkilä, J. Halkilahti, H. Simonen, S.

Pelkonen, T. Soveri, H. Simojoki, T. Autio // *Veterinary Microbiology*. - 2018. - 216- P. 60-66. - DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.02.005.

278. Han, J. Conditions and mutations affecting *Staphylococcus aureus* L-form formation / J. Han, W. Shi, X. Xu, S. Wang, S. Zhang, L. He, X. Sun, Y. Zhang // *Microbiology*. - 2015. - 161(1)- P. 57-66. - DOI.org/10.1099/mic.0.082354-0.

279. Hayshi, T. Microbiology : Breaking the barrier between commensalisms and pathogenicity / T. Hayshi. – Science. – 2006. – Vol. 313 - № 5788. – P. 772–773.

280. Hoibya, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hoibya, T. Bjarnsholt, M. Givskov [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2010. – Vol. 35, No. 4. – P. 322– 332.

281. Huh, K. Continuous increase of the antimicrobial resistance among gram-negative pathogens causing bacteremia: a nationwide surveillance study by the Korean Network for Study on Infectious Diseases (KONSID) / K. Huh, J. Kim, S.Y.Cho // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* — 2013. — Vol.76, N4.— P.477—482.

282. ISO 20776-1:2019. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases; 2019. 19 p.

283. Johnson, EH, An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats / E.H. Johnson, R. Al-Busaidy, M.S. Hameed // *J. Vet. Med.* – 2003. - 50- P. 102–104.

284. Kaufmann, S.H.E. Basiswissen Immunologie/ S.H.E. Kaufmann // Springer Berlin Heidelberg. – 2014. – P. 114. - DOI.org/10.1007/978-3-642-40325-5.

285. Kawai, Y. Lysozyme counteracts β -lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria / Y. Kawai, K. Mickiewicz, J. Errington// *Cell* – 2018 - 172(5)- P.1038–1049. - DOI.org/10.1016/j.cell.2018.01.021.

286. Kinross, P. Livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013 / P. Kinross, A. Petersen, R. Skov, E. Van Hauwermeiren, A. Pantosti, F. Laurent, A. Voss A6, J. Kluytmans, M.J. Struelens, O. Heuer, D.L. Monnet // *Euro Surveill.* – 2017. – V.22, N.44.

287. Klibi, A. Detection and characterization of methicillinresistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia / A. Klibi, A. Maaroufi, C. Torres, A. Jouini // *International Journal of Antimicrobial Agents*. - 2018. - 52(6) - P.930-935. - DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.07.026.

288. Komarov, A.A. Activities of the russian federation on amr monitoring and control in veterinary field/ A.A. Komarov, D.A. Makarov, O.E. Ivanova, S.Y. Karabanov, E.E. Davydova, E.V. Krylova, E.V. Krylova, A.V. Kulikovskiy, S.V. Lenev // В сборнике: Oie global conference on antimicrobial resistance. putting standarts into practice. - 2018. - P. 74.

289. Komisarova, E.V. Isolation and genome analysis of bacteriophages infecting hypermucoviscous highly virulent strains of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 serotypes / E.V. Komisarova, V.P. Myakinina, V.M. Krasilnikova, V.V. Verevkin,

A.A. Kislichkina, N.V. Volozhantsev // Сборник тезисов «Centennial Celebration of Bacteriophage Research», Institute Pasteur, Paris, France. April 24-26. - 2017. - P. 138.

290. Kyselková, M. Tetracycline resistance genes persist in soil amended with cattle feces independently from chlortetracycline selection pressure/ M. Kyselková, L. Kotrbová, G. Bhumibhamon, A. Chroňáková, J. Jirout, N. Vrchotová, H. Schmitt, D. Elhottová // Soil Biol. Biochem. – 2015. – V. 81. – P. 259–265. – DOI: 10.1016/j.soilbio.2014.11.018.

291. Kim, J.-S. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state/ J.-S. Kim, N. Chowdhury, R.Yamasaki [et al.] // Environmental Microbiology.- 2018. - 20(6)- P. 2038-2048.

292. Kim, J.S. Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. / J.-S. Kim, T.K. Wood // mBio. – 2017. – 8(2), e00354-17. – DOI.org/10.1128/mbio.00354-17.

293. Kishimoto, M. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex/ M. Kishimoto, S. Tsuchiaka, S.S. Rahpaya, A. Hasebe, K. Otsu, S. Sugimura, S. Kobayashi, N. Komatsu, M. Nagai, T. Omatsu, Y. Naoi, K. Sano, S. Okazaki-Terashima, M. Oba, Y. Katayama, R. Sato, T. Asai, T. Mizutani // J Vet Med Sci. – 2017. – V. 79. – № 3. – P. 517–523.

294. Klingenberg, C. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response / C. Klingenberg, E. Aarag, A. Rønnestad [et al.] // Pediatr Infect Dis J. – 2005. – Vol. 24, No. 9. – P. 817-22.

295. Kuehl, B. MALDI-ToF mass spectrometry-multivariate data analysis as a tool for classification of reactivation and non-culturable states of bacteria / B. Kuehl, S.-M. Marten, Y. Bischoff, G. Brenner-Weiß, U. Obst // Anal Bioanal Chem. - 2011-401(5) - P. 1593-1600. - DOI.org/10.1007/s00216-011-5227-5.

296. Larsen, J. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011 / J. Larsen, A. Petersen, M. Sørnum, M. Stegger, L. van Alphen, P. Valentiner-Branth, L.K. Knudsen, L.S. Larsen, B. Feingold, L.B. Price, P.S. Andersen, A.R. Larsen, R.L. Skov // Euro Surveill. – 2015. – V.20, N.37.

297. Lebeaux, D. From in vitro to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections/ Lebeaux D., Chauhan L., Rendueles O., Beloin C. // Pathogens. - 2013. - V. 2. - P.288- 256.

298. Lleo, M.M. Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy/ M.M. Lleo, V. Ghidini, M.C. Tafi [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 2014 - 354(2) - P. 153-160.

299. Locatelli, C. Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk of dairy cows and effect of swine population density / C. Locatelli, P. Cremonesi, L. Bertocchi, M.G. Zanoni, A. Barberio, I. Drigo, G. Varisco, B. Castiglioni, V. Bronzo, P. Moroni // J Dairy Sci. – 2016. – V.99, N.3. – P.2151-2156.

300. Liu, Y. Induction of *Escherichia coli* O157:H7 into the viable but non-culturable state by chloraminated water and river water, and subsequent resuscitation /

- Y. Liu, C. Wang, G. Tyrrell, S.E. Hrudehy, X.-F. Li // *Environ Microbiol Rep.* – 2009 - 1(2) - P. 155-161. - DOI.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00024.x.
301. Mah, T.-F.C. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents / T.-F.C. Mah, G.A. OToole // *Trends Microbiol.* - 2001. - N 9. - P. 34-39.
302. Makavchik, S.A. Identification Bovis bacteria by polymerase chain reaction and sequencing / S.A. Makavchik, A.A. Sukhinin, S.R. Abgaryan, I.V. Belkina // *Dusunen Adam* - 2018. - 10 (1) - P. 2004-2012.
303. Makavchik, S. Results of vaginal samples in cows in the post partum period/ S. Makavchik, A. Sukhinin, Y. Danko, V. Kuzmin // *Reproduction in Domestic Animals*.- 2019. -T. 54. -№ S3. - P. 98.
304. Manili, J. *Escherichia coli* virulence factors/ J. Mainil // *Veterinary Immunology and Immunopathology.* – 2013. – Vol.152. – P.2-12.
305. Mariani-Kurkdjian, P. Extended-spectrum beta-lactamase producing-*Enterobacteriaceae* / P. Mariani-Kurkdjian, C. Doit, E. Bingen // *Arch. Pediatr.* -2012 Nov. - Vol. 19, N 3. - P. 93-96.
306. Markova, Yu.A Mechanisms of bacterial polyhostality/ Markova Yu.A., Romanenko A.S., Shafikova T.N. // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*.- Vol. 3, No. 2- 2007. - P. 15- 23.
307. Marques, L.M. Genome Sequence of *Ureaplasma diversum* Strain ATCC 49782 / L.M. Marques, A.M. Guimarães, H.B. Martins, I.S. Rezende, M.S. Barbosa, G.B. Campos, N.C. do Nascimento, A.P. Dos Santos, A.T. Amorim, V.M. Santos, J.B. Messick, J. Timenetsky // *Genome Announc.* – 2015. – V.3. – № 2. – P. 314–315.
308. Marouf, S.A. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis genitalium* in cattle and buffalo in Egypt using dot ELISA and PCR with anti-microbial trials / S.A. Marouf, Kh.F. Mohamed, J. El-Jakee // *European Journal of Biological Sciences* – 2011. – 25 –P. 136-146.
309. Maunsell, F. Oral inoculation of young dairy calves with *Mycoplasma bovis* results in colonization of tonsils, development of otitis media and local immunity / F. Maunsell, M.B. Brown, J. Powe, J. Ivey, M. Woolard, W. Love, J.W. Simecka // *PLoS ONE.* – 2012. - 7(9): e44523. - DOI: 10.1371/journal.pone.0044523.
310. Maunsell, F. *Mycoplasma bovis* infections in cattle / F.P. Maunsell, A.R. Woolums, D. Francoz, R.F. Rosenbusch, D.L. Step, D.J. Wilson, E.D. Janzen // *J Vet Intern Med.* — 2011. — V.25, N.4. — P. 772-783.
311. Mercier, R. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria / R. Mercier, Y. Kawai, J. Errington // *eLife.* – 2014. – 3. - DOI.org/10.7554/elife.04629.
312. Mercier, R. Crucial role for membrane fluidity in proliferation of primitive cells / R. Mercier, P. Domínguez-Cuevas, J. Errington // *Cell Rep.* – 2012. - 1(5)- P. 417-423. - DOI.org/10.1016/j.celrep.2012.03.008.
313. Mutters, N.T. Comparison of livestock-associated and health care-associated MRSA-genes, virulence, and resistance / N.T. Mutters, C.P. Bieber, C. Hauck, G. Reiner, V. Malek, U. Frank // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2016. – V.86, N.4. – P.417–421.

314. Munoz, M.A. Cleanliness scores as indicator of *Klebsiella* exposure in dairy cows / M.A. Munoz, G.J. Bennett, C. Ahlstrom, H.M. Griffiths, Y.H. Schukken, R.N. Zadoks // *Journal of Dairy Science*. - 2008. - Vol. 91. - P.3908-3916.
315. Morton, J.M. Isolation of *Mycoplasma* spp. and serological responses in bulls prior to and following their introduction into *Mycoplasma bovis*-infected dairy herds/ J.M. Morton, K.L. Bosward, P.A. Sheehy, A.M. Parker, J.K. House // *Journal of Dairy Science*. - 2018. - 101(8) - P. 7412-7424. - DOI:10.3168/jds.2018-14457.
316. Nascimento-Rocha, J.M. Assessment of cow and farm level risk factors associated with *Ureaplasma diversum* in pasture-based dairy systems - A field study / J.M. Nascimento-Rocha, B.D.F. Oliveira, E. Arnhold, R.N.G. Pôrto, S.F. Lima, M.L. Gambarini // *An Acad Bras Cienc*. — 2017. — V.89, N.3. — P. 1779-1783.
317. Nikaido, H. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria / H. Nikaido, J. M. Pagès // *FEMS Microbiol Rev*. - 2012. - 36 (2) - P. 340—363.
318. Official database of NARMS project. Available at: www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoringsystem/narms-now-integrated-data. Accessed December 24, 2019.
319. Oliveira-Garcia, D. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces/ D. Oliveira-Garcia, M. Dall'Agnol, M. Rosales, A. C. Azzuz, N. Alcantara, M. B. Martinez [et al.]// *Cell Microbiol*. - 2003. - 5 (9)- P. 625—636.
320. OIE. List of antimicrobial agents of veterinary importance, July 2019. Available at: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_July2019.pdf. Accessed December 24, 2019.
321. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Annual review of microbiology*. - 2000. - Vol. 54.- P. 49–79.
322. Orman, M.A. Establishment of a method to rapidly assay bacterial persister metabolism / M.A. Orman, M.P. Brynildsen // *Antimicrob Agents Chemother*. - 2013. - 57(9). - P. 4398-4409. - DOI.org/10.1128/aac.00372-13.
323. Otto, M. Virulence factors of the coagulase- negative staphylococci / M. Otto // *FrontBiosci*. - 2004.- Vol. 9.- P. 841–886.
324. Pedersen, K. Usage of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance among bacteria from mink/ K. Pedersen, A.S. Hammer, C.M. Sorensen, O.E. Heuer // *Veterinary Microbiology*. - 2009. - Vol.133. - №1-2. - P.15-22.
325. Randich, A.M. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes / A.M. Randich, Y.V. Brun // *Front Microbiol*. - 2015. - 6- P. 580. - DOI.org/10.3389/fmicb.2015.00580.
326. Ragland, S.A. From bacterial killing to immune modulation: recent insights into the functions of lysozyme / S.A. Ragland, A.K. Criss // *PLoS Pathog*. - 2017. - 13(9), e1006512. - DOI. org/10.1371/journal.ppat.1006512.

327. Rai, M. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria / M. K. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle, A. K. Gade // *J Appl Microbiol.* - 2012. - 112 (5) - P. 841—852.
328. Ramamurthy, T. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria / T. Ramamurthy, A. Ghosh, G.P. Pazhani, S. Shinoda // *Front Public Health.* – 2014. - 2- P. 103. - DOI.org/10.3389/fpubh.2014.00103.
329. Roberts, J.A. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient// J.A. Roberts, J. Lipman // *Crit Care Med.* -2009. - 37(3) -P.840-851.
330. Rosenstein, R. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization / R. Rosenstein, F.Götz// *Biochimie.* 2000. - Vol. 82. - P. 1005-1014.
331. Pantaleo, M. Immunological aspects of metritis in dairy cows: a review / M. Pantaleo, A. Rizzo, G. D'Onghia, G. D'Onghia, M. Roncetti, M. Piccinno, M. Mutinati, M.R. Terlizzi, R.L. Sciorsci // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* - 2014. - v. 14. - I. 3. - P. 196-205.
332. Parker Gaddis, K.L. Genomic selection for producer-recorded health event data in US dairy cattle / K.L. Parker Gaddis, J.B. Cole, J.S. Clay, C. Maltecca // *J. Dairy Sci.* - May, 2014. - v. 97. - I. 5. - P. 3190-3199.
333. Parker, A.M. Comparison of culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma species* in bovine milk, semen and swab samples / A.M. Parker, J.K. House, M.S. Hazelton, K.L. Bosward, P.A. Sheehy // *PLoS ONE.* – 2017. - 12(3), e0173422. - DOI:10.1371/journal.pone.0173422.
334. Parker, A.M. A review of *Mycoplasma* diagnostics in cattle/ A.M. Parker, P.A. Sheehy, M.S. Hazelton, K.L. Bosward, J.K. House // *Journal of Veterinary Internal Medicine.* – 2018. - 32(3) - P. 1241-1252. - DOI: 10.1111/jvim.15135.
335. Paczosa, M.K. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense / M.K. Paczosa, J. Meccas // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2016. – Vol. 80, No. 3. – P. 629-661.
336. Perez-Casal, J. Status of the development of a vaccine against *Mycoplasma bovis* / J. Perez-Casal, T. Prysliak, T. Maina, M. Suleman, S. Jimbo // *Vaccine.* — 2017. — V.35, N.22. — P. 2902-2907.
337. Pfeifer, Y. Minireview. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gramnegative bacterial pathogens /Y. Pfeifer, A. Cullik, W. Witte // *International Journal of Medical Microbiology.* – 2010. – Vol.300. – P.371-379.
338. Piras, C. Changes in protein expression profiles in bovine endometrial epithelial cells exposed to *E. coli* LPS challenge / C. Piras, Y. Guo, A. Soggiu, M. Chanrot, V. Greco, A. Urbani, G. Charpigny, L. Bonizzi, P. Roncada, P. Humblot // *Mol. Biosyst.* - 2017. - Jan, 31. - v. 13. - I. 2. - P. 392-405.
339. Pienaar, J.A. The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: a general review / J.A. Pienaar, A. Singh, T.G. Barnard // *Afr J Lab Med.*-2016. - 5(1)- P. 368. - DOI.org/10.4102/ajlm.v5i1.368.
340. Pinto, D. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli / D. Pinto, V. Almeida, M. Almeida Santos, L. Chambel // *J Appl Microbiol.* – 2011. – 110 (6) - P.1601-1611. - DOI.org/10.11117j.1365-2672.2011.05016.x.

341. Prunner, I. Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows / I. Prunner, H. Pothmann, K. Wagener, M. Giuliadori, J. Huber, M. Ehling-Schulz, M. Drillich // *Theriogenology*. - Dec, 2014. - v. 82. - I. 9. -P. 1316-1322.
342. Potgieter, M. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases / M. Potgieter, J. Bester, D.B. Kell, E. Pretorius // *FEMS Microbiol Rev* 2015. - 39(4) - P.567-591. - DOI. org/10.1093/femsre/fuv013.
343. Popov, V.A. Comparative characteristics of modern methods for carbapenemase products/ V.A. Popov // *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. – 2019. - vol. 21, no. 2. - P. 125-133.
344. Randich, A.M. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes / A.M. Randich, Y.V. Brun // *Front Microbiol*. – 2015. - 6 – P. 580. - DOI.org/10.3389/ fmicb.2015.00580.
345. Rhodes, A. Surviving sepsis campaign:international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 / A. Rhodes, L. E. Evans, W. Alhazzani [et al.] // *Intensive Care Medicine*. - 2017. - Vol. 43, № 3. - P. 304-377.
346. Rivers, B. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy / B. Rivers, T.R. Steck // *Urological Research* – 2001. - 29(1)- P. 60-66. - DOI. org/10.1007/s002400000151.
347. Russell, A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusion / A.D. Russell // *J. Appl. Microbiol*. – 2002. - 92 - P. 171–3.
348. Salomonsen, C.M. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from haemorrhagic pneumonia in mink// C.M. Salomonsen, G.E. Themuda, L. Jelbak, S. Molin, N. Hoiby, A.S. Hammer // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – Vol.163. - №1-2. – P.103-109.
349. Santos, S.B. Recovery of Mollicutes from the reproductive tract of dairy cattle in the state of Pernambuco, Brazil /Santos S.B., Pinheiro-Júnior J.W., Mota A.R., Santos A.S., Alves B.H.L.S., Oliveira J.M.B., Silva L.B.G., Mota R.A. // *Pesq. Vet. Bras*. — 2015. — V.35, N.6 — P. 491-496.
350. Sadikot, R.T. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia / R.T. Sadikot, T.S. Blackwell, J.W. Christman, A.S. Prince // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2005. - 171(11) - P.1209-23.
351. Schaack, S. Promiscuous DNA : horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution // S. Schaack, C. Gilbert, C. Feschotte // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2010. – Vol. 25, № 9. – P. 537–546.
352. Simmons, W.L. Mycoplasma Biofilms Ex Vivo and In Vivo / W.L. Simmons, K. Dybvig // *FEMS Microbiol. Lett*. - 2009. - Vol. 295, N 1. - P.77 - 81.
353. Sfeir, M. M. EDTA-modified carbapenem inactivation method: a phenotypic method for detecting metallo-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*/ M. M. Sfeir, J. A. Hayden, K. A. Fauntleroy [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. -2019. - Vol. 57, № 5. - DOI:10.1128/JCM.01757-18.
354. Sheldon, I.M. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease / I.M. Sheldon, J.G. Cronin, G.D. Healey, C.

Gabler, W. Heuwieser, D. Strey, J.J. Bromfield, A. Miyamoto, C. Fergani, H. Dobson // *Reproduction*. - Sep, 2014. - v. 148. - I. 3. - P. 41-51.

355. Shivakumar, V. Biofilms community behavior by bacteria / V. Shivakumar, D. Chakravorty // *Resonance*. - 2014- P.1005-1016.

356. Shon, A.S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed / A.S. Shon, R.P. Bajwa, T.A. Russo // *Virulence*. - 2013. - Vol. 4, No. 2. - P. 107-118.

357. Schulze-Geisthövel, S.V. Survey on the risk awareness of German pig and cattle farmers in relation to dealing with MRSA and antibiotics / S.V. Schulze-Geisthövel, E.V. Tappe, R.M. Schmuthausen, J. Lepkojic, K. Röttgen, B. Petersen // *Infect Ecol Epidemiol*. - 2016. - N.6. - P.29817.

358. Smirnova, L.I. Bacteriological monitoring of the pathogens of mastitis in dairy complex of the north-west region of the Russian Federation / L.I. Smirnova, S.A. Makavchik, A.A. Sukhinin, E.I. Prikhodko, A.V. Zabrovskaya // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. - 2019. - T. 10. - № 1. - P. 2013-2020.

359. Sosa, C. Identification of species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma diversum* from Argentinian dairy herds / Sosa C., Tirante L., Chaves J., Pol M., Ambrogi A., Giraudo J.A., Tamiozzo P. // *Rev Argent Microbiol*. - 2018. - V. 50. - № 1. - P. 31-35.

360. Subrt, N. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus* / N. Subrt, L.R. Mesak, J. Davies // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2011. - 66(5) - P. 979-984. - DOI: 10.1093/jac/dkr043.

361. Sukhinin, A.A. Method for inactivating infectious agent of *Campylobacter fetus subspecies fetus* by teotropina compounds / A.A. Sukhinin, S.V. Gerasimov, V.A. Grishina, S.A. Makavchik // В сборнике: Global Science and Innovation materials of the VII International Scientific Conference. - 2016. - P. 278-280.

362. Suvorova, A.O. Microchip real-time PCR analyzer for clinical diagnostic / A.O. Suvorova // VII Всероссийская конференция «Менделеев 2013», Санкт-Петербург. - 2013. - Т.2. - P. 15-16.

363. Suvorova, O. Rapid determination of sexually transmitted infections by real-time polymerase chain reaction using microchip analyzer / O. Suvorova, M. Slyadnev, A. Perchik, D. Navolotskii, N. Mushnikov // *Engineering*. - 2012. - V. 4. - P. 1-3.

364. Toleman, M. A. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes / M. A. Toleman, P. M. Bennett, D. M. Bennett, R.N. Jones, T. R. Walsh // *Emerg Infect Dis*. - 2007. - 13 - P.559-565.

365. Talukder, A.A. Isolation, identification and resistance pattern of microorganisms associated with mastitis in Buffalo / A.A. Talukder, H.H. Rahman, S.M. Jamil Mahmud, F. Alam, S.K. Dey // *J. Microbiol.* - 2013- 30(1-2)- P. 1-5.

366. Tanzin, T. Antibiotic resistance profile of bacteria isolated from raw milk samples of cattle and buffaloes / T. Tanzin, K.H.M.N.H. Nazir, M.N. Zahan, M.S. Parvej, K. Zesmin, M.T. Rahman // *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. - 2016. - 3(1) - P. 62-67. - DOI: 10.5455/javar.2016.c133.

367. Thaker, H.C. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat / H.C. Thaker, M.N. Brahmhatt, J.B. Nayak // *Veterinary World*. – 2013. - 6(1) - P. 10-13. - DOI: 10.5455/vetworld.2013.10-13.

368. The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines, 2019 (including the 21st WHO Model List of Essential Medicines and the 7th WHO Model List of Essential Medicines for Children). Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330668/9789241210300-eng.pdf?ua=1>).

369. Tiwari, J.G. Trends In Therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis: An Overview / J.G. Tiwari, C.Babra, H.K. Tiwari, V. Williams, S.D. Wet [et al.] // *J Vaccines Vaccin*. – 2013.- 4- P. 176.

370. Thomas, A. Isolation of *Mycoplasma species* from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium / A. Thomas, H. Ball, I. Dizier, A. Trolin, C. Bell, J. Mainil, A. Linden// *Vet Rec*. -2002. - V.151, N.16. - P.472-476.

371. Tramuta, C. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples / C. Tramuta, D. Lacerenza, S. Zoppi, M. Gorla, A. Dondo, E. Ferroglio, P. Nebbia, S. Rosati // *J Vet Diagn Invest*. - 2011. -V.23, N.4. - P.657-664.

372. Travassos, L. H. Phenotypic properties, drug susceptibility and genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains from seven hospitals in Rio de Janeiro / L. H. Travassos, M. N. Pinheiro, F. S. Coelho, J. L. M. Sampaio, V. L. C. Merquior, E. A. Marques // *Brazil J Appl Microbiol*. - 2004. - 96 (5) - P. 1143—1150.

373. Van Dijk, K. et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin / K.Van Dijk [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2014- vol. 20, no. 4- P. 345-349.

374. Van der Zwaluw, K. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods / K.Van der Zwaluw, K. de Haan, A. Pluister [et al.] // *PloS one*. - 2015. -Vol. 10, № 3, e0123690.

375. Voltarelli, D.C. Anested-PCR strategy for molecular diagnosis of mollicutes in uncultured biological samples from cows with vulvovaginitis/ D.C.Voltarelli, B.K. de Alcântara, M. Lunardi, A.F. Alfieri, R. de Arruda Leme, A.A. Alfieri // *Anim Reprod Sci*. – 2018. – V. 188. – P. 137–143.

376. Vuotto, C. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* / C. Vuotto, F. Longo, M.P. Balice [et al.] // *Pathogens*. – 2014. – Vol.3, No. 3. – P. 743-758.

377. Walther, B. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* among horses entering a veterinary teaching hospital: the contemporary/ B. Walther, K.S. Klein, A.K. Barton, T.

Semmler, C. Huber, S.A. Wolf, K. Tedin, R. Merle, F. Mitrach, S. Guenther, A. Lübke-Becker, H. Gehlen // "Trojan horse". PLoS One. – 2018. – 13:e0191873. – DOI.org/10.1371/journal.pone.0191873.

378. Warnes, S.L. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health / S.L. Warnes, C.J. Highmore, C.W. Keevil // MBio. – 2012.- Nov. - Vol. 3 - N 6.

379. Weber, D.J. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants / D.J. Weber, W.A. Rutala, E.E. Sickbert-Bennett // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007.- 51 -P. -4217–24.

380. Willemsen, I. New diagnostic microarray (Check-KPC ESBL) for detection and identification of extended-spectrum beta-lactamases in highly resistant *Enterobacteriaceae* / I. Willemsen, I. Overdeest, N. al Naiemi [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2011.- vol. 49, no. 8- P. 2985-2987.

381. White, D.J. Emergence and transfer of antibiotic resistance/ D.J.White, P.F.McDermott //Journal of Dairy Science. – 2001. – Vol.84. – P.151-155.

382. Williams, J. J. Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy/. Williams J. J., Hergenrother P. J. //Trends Microbiol -2012- 20 (6)- P. 291—298.

383. Wittum, T.E. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases present in *Escherichia coli* from the faces of cattle in Ohio, United States/ T.E. Wittum, D.F.Mollenkopf, J.B.Daniels, A.E.Parkinson, J.L.Mathews //Foodborne Pathogens and Disease. – 2010. – Vol.7. - №12. – P.1575-1579.

384. Wingender, J. The biofilm matrix / J. Wingender, H.C. Flemming // Nature Rev Microbiol. – 2010. - 13- P.623-33.

385. Winther, L. Association of *Stenotrophomonas maltophilia* infection with lower airway disease in the horse: a retrospective case series / L. Winther, R.M. Andersen, K.E. Baptiste, B. Aalbæk, L. Guardabassi //Vet J. – 2010. - P. 358–363.

386. White, D.J. Emergence and transfer of antibiotic resistance/ D.J.White, P.F. McDermott //Journal of Dairy Science. – 2001. – Vol.84. – P.151-155.

387. Wood, T.K. Strategies for combating persister cell and biofilm infections/ T.K. Wood // Microb. Biotechnol. - 2017. - 10(5)- P. 1054-1056.

388. Woodford, N. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non *Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? / N.Woodford, D.W.Wareham, B. Guerra, C.Teale // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2014. – Vol.69. – P.287-291.

389. Xiao, L. Suppression of antimicrobial peptide expression by *Ureaplasma species* / L. Xiao, D.M. Crabb, Y. Dai, Y. Chen, K.B. Waites, T.P. Atkinson // Infect Immun. - 2014. - V.82, N.4. - P.1657-1665.

390. Xiao, X. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and Qpcr / X. Xiao, C. Tian, Y. Yu, H. Wu// Can J Microbiol. - 2013. - 59(3) - P. 157-163. - DOI.org/10.1139/cjm-2012-0577.

391. Yi, Y. Analysis of the Genetic Diversity in MethicillinResistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Subclinical Mastitis Case in Xinjiang,

China / Y. Yi, L. Su, B. Li, S. Li, B. Zhang, Y. Su // Foodborne Pathog Dis. – 2018. – V.15, N.9. – P.568-575.

392. Zamani, H. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes / H. Zamani, A. Salehzadeh // Turk J. Med. Sci. – 2018. – Vol. 23. – No. 48(1). – P. 162–167.

393. Zhao, B. Li. Y. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* / B. Li, Y. Zhao, C. Liu [et al.] // Future Microbiol. – 2014. – Vol. 9, No. 9. – P. 1071-1081.

394. Zhao, X. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens / X. Zhao, J. Zhong, C. Wei, C.-W. Lin, T. Ding // Front Microbiol. -2017.- 8- P. 580. - DOI. org/10.3389/fmicb.2017.00580.

395. Zhao, S. Whole Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial resistance Phenotypes in *Campylobacter* / S.Zhao, Y.Chen, C.Li., S.Mukherjee, S.Young [et al.] //Applies and Environmental Microbiology. – 2016. – Vol.82. - №2. – P.459-466.

396. Zhao, J. Multilocus Sequence Types and Virulence Determinants of Hypermucoviscosity-Positive *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Community-Acquired Infection Cases in Harbin, North China / J. Zhao, J. Chen, M. Zhao, X. Qiu, X. Chen, W. Zhang, R. Sun, J.O. Ogotu, F. Zhang //Jpn. J. Infec.t Dis. – 2016. – Vol. 69. – No. 5. – P. 357-360.

397. Zordan, S Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Veterinary Clinics, Germany /Sabrina Zordan, Ellen Prenger-Berninghoff, Reinhard Weiss, Tanny van der Reijden, Peterhans van den Broek, Georg Baljer, and Lenie Dijkshoorn // Emerg Infect Dis.- 2011. - 17(9)- P. 1751–1754. - DOI: 10.3201/eid1709.101931.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А – Патенты

Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2733144

**Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*,
обладающий способностью к биопленкообразованию**

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019145273
Приоритет изобретения 25 декабря 2019 г.
Дата государственной регистрации в
Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 29 сентября 2020 г.
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 25 декабря 2039 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности



Г.П. Нелиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ИЗМЕНЕНИЕ**

В ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

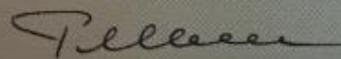
№ 2733144

Изменение сведений об авторе(ах)

Автор(ы): *Макавчик Светлана Анатольевна (RU), Сухинин Александр Александрович (RU), Смирнова Любовь Ивановна (RU), Егорова Светлана Александровна (RU), Михайлов Николай Венерович (RU), Забровская Анна Владленовна (RU)*

Запись внесена в Государственный реестр изобретений Российской Федерации
15 февраля 2021 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Изrael



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2642249

Способ инактивации возбудителя кампилобактериоза
крупного рогатого скота

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины (ФГБОУ ВО СПбГ АВМ) (RU)*

Авторы: *Сухинин Александр Александрович (RU), Гришина Валентина Александровна (RU), Герасимов Сергей Вадимович (RU), Макавчик Светлана Анатольевна (RU)*

Заявка № 2016112210

Приоритет изобретения 31 марта 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 24 января 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 31 марта 2036 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Излиев


РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2644654

Способ получения гидроокись алюминиевой масляной теовакцины против кампилобактериоза

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины (RU)*

Авторы: *Сухинин Александр Александрович (RU), Герасимов Сергей Вадимович (RU), Макавчик Светлана Анатольевна (RU)*

Заявка № 2016129877

Приоритет изобретения 20 июля 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 13 февраля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 20 июля 2036 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев



ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Нормативно-техническая документация

Приложение 4

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И
ЗАКАВКАЗЬЯ

№ 1884/11 от 31 МАЙ 2018

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «хранение» штамм:

название штамма: *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*

Дата депонирования: 27.04.2018г.

Депозитор: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Назначение штамма: может быть использован в качестве производственного штамма при изготовлении биологических препаратов для последующего применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ – Б - 288М

Директор

Киш Л.К.



**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ
И ОБРАЗОВАНИЯ**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛИКВИДАЦИИ
МИКОПЛАЗМОЗОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ, В ТОМ ЧИСЛЕ ПТИЦ**

Санкт-Петербург
2017

УДК: 616.98-084:579.887:636

Сухинин А.А., Макавчик С.А., Кузьмин В.А., Фогель Л.С., Орехов Д.А., Карпенко Л.Ю., Кан Ф.Л. – Методические рекомендации по профилактике и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц. – СПб.: изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017 г. – 23с.

В Методических рекомендациях на основании литературных данных и результатах собственных исследований авторов представлены материалы по этиопатогенезу микоплазменной инфекции, дана характеристика: эпизоотологических особенностей, клинических признаков и патологоанатомических изменений, лабораторной диагностики, иммунитета, общей и специфической профилактики, лечебных и оздоровительных мероприятий при микоплазмозах у сельскохозяйственных животных и птиц. Микоплазмы способны достаточно долго находиться в организме инфицированного животного, не проявляя себя, поэтому для своевременного и точного подтверждения диагноза необходимо применение высокочувствительных и специфичных методов. Новизной данных Методических рекомендаций является совершенствование авторами пробоподготовки био- и патологического материала, проведения метода ПЦР, а также применение эпизоотологического картографирования на модели микоплазмоза КРС в Ленинградской области с использованием геоинформационных систем (ГИС).

Методические рекомендации предназначены для студентов биологических и ветеринарных факультетов вузов, слушателей факультетов повышения квалификации, аспирантов, научных работников и практических ветеринарных врачей.

Методические рекомендации составлены в соответствии с требованиями федерального государственного образовательного стандарта высшего профессионального образования по специальности 36.05.01 Ветеринария.

Рецензент: зав. кафедрой паразитологии им. В.Л. Якимова
ФГБОУ ВО СПбГАВМ, доктор биологических наук **Белова Л.М.**

Методические рекомендации одобрены и рекомендованы к изданию методическим советом ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», протокол № 1 от 18 января 2017г.

Методические рекомендации одобрены и рекомендованы к изданию научно-техническом Советом при Комитете по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области, протокол № 2 от 10.02.2017г.

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

**ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ
И ОБРАЗОВАНИЯ**

**ФГБОУ ВО «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Утверждаю:
Заместитель Председателя Правительства
Ленинградской области - председатель
комитета по агропромышленному и
рыбохозяйственному комплексу



С. В. Яхнюк

« _____ » 2017 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**



Санкт-Петербург
2017

УДК: 616.98-084:579.887:636

**Герасимов С.В., Макавчик С.А., Сухинин А.А., Гришина В.А.,
Идиатулин И.Г.** (ФГБОУ ВО СПбГАВМ – Методические рекомендации по
диагностике и профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота. –
СПб.: изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017 г. – 17 с.

В Методических рекомендациях на основании литературных данных и результатах собственных исследований авторов представлены материалы по этиопатогенезу кампилобактериозной инфекции, дана характеристика: эпизоотологических особенностей, клинических признаков и патологоанатомических изменений, лабораторной диагностики, иммунитета, общей и специфической профилактики, лечебных и оздоровительных мероприятий при кампилобактериозах у сельскохозяйственных животных.

Методические рекомендации предназначены для студентов ветеринарных факультетов вузов, слушателей факультетов повышения квалификации, аспирантов, научных работников и практических ветеринарных врачей.

Новизной данных Методических рекомендаций является разработка авторами метода серологической диагностики, а также совершенствование специфической профилактики кампилобактериоза крупного рогатого скота.

Методические рекомендации составлены в соответствии с требованиями федерального государственного образовательного стандарта высшего профессионального образования по специальности 36.05.01 Ветеринария.

Рецензент: зав. кафедрой эпизоотологии им. В.П.Урбана ФГБОУ ВО СПбГАВМ, доктор ветеринарных наук, профессор В.А.Кузьмин.

Методические рекомендации одобрены и рекомендованы к изданию методическим советом ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», протокол № 5 от 11.04.2017 г.

Методические рекомендации утверждены Заместителем Председателя Правительства, председателем комитета по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области от 30.05.2017 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия
ветеринарной медицины»

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Пастера»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

Утверждаю:



Председатель комитета по ветеринарии

Псковской области

 Баданина В. Н.

«» 2020 Г.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ,
ВЫЗЫВАЕМЫХ *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis* и
Ureaplasma diversum

Методические рекомендации

2020

УДК 619:616

Макавчик С.А., Ваганова А.Н., Сухинин А.А., Вербов В.Н., Борисенко С.В., Рока В.В. - Методические рекомендации: Лабораторные методы диагностики инфекций, вызываемых *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* и *Ureaplasma diversum* - СПб.: изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2020. – 49 с.

Рецензент: доктор ветеринарных наук, профессор кафедры эпизоотологии им. В.П.Урбана ФГБОУ ВО СПбГАВМ В.А.Кузьмин.

Рекомендовано на Заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Протокол №5 от 28.08.2020.

В методических рекомендациях изложены современные сведения о систематике, морфологических, культуральных, биохимических и физиологических свойствах микоплазм и уреаплазм, а также их этиологическая роль в развитии бурситов, маститов и бактериальных болезней респираторного, репродуктивного тракта крупного рогатого скота. Даны методические подходы к выделению и идентификации микоплазм из различных источников.

Новизной данных Методических рекомендаций является разработка и применение метода молекулярной диагностики возбудителей (ПЦР в режиме реального времени, ПЦР в микрочиповом формате).

Методические рекомендации предназначены для студентов обучающихся по направлению подготовки 36.05.01. ФГОС ВО Ветеринария (уровень специалитета) по дисциплине «Ветеринарная микробиология и микология» и 36.03.01. ФГОС ВО Ветеринарно-санитарная экспертиза (уровень бакалавриата) по дисциплине «Микробиология». Методические рекомендации должны оказать студентам существенную помощь в подготовке и усвоении учебного материала. Однако оно может быть полезно и для специалистов, работающих в сфере животноводства, лабораторной диагностики микоплазменных инфекций животных и птиц, контроля за их распространением и организации их профилактики.

Методические рекомендации утверждены Председателем комитета по ветеринарии Псковской области от 30.04.20.

ПРИЛОЖЕНИЕ В – акты испытаний и внедрения в производство**Приложение 8**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя Россельхознадзора

ИНСТРУКЦИЯ (ПРОЕКТ)

по применению Азициклина для лечения заболеваний бактериальной и микоплазменной этиологии сельскохозяйственных животных и птицы, кошек, собак, кроликов и пушных зверей

(Организация-разработчик: ООО «НВЦ Агроветзащита», г. Москва)

I. Общие сведения

1. Торговое наименование лекарственного препарата: Азициклин (Azicyclin).

Международное непатентованное и химическое наименование: доксициклин, азитромицин, 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат-2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина дисукцинат.

2. Лекарственная форма: порошок и капсулы для орального применения.

Азициклин в 1 г препарата содержится в качестве действующих веществ азитромицина дигидрат – 140 мг, доксициклина гиклат – 70 мг, эмидонола – 250 мг, а также вспомогательные вещества: поливинилпирролидон-30 – 410 мг, лецитин – 70 мг, стеарилфумарат натрия – 10 мг, ферол-А – 50 мг. По внешнему виду препарат представляет собой водорастворимый порошок желтого цвета.

3. Выпускают препарат расфасованным в желатиновые капсулы-контейнеры по 100, 125, 250 мг; в саше по 2; 3; 4; 5 г; в пакеты из многослойной бумаги по 500 и 1000 г; в полимерные банки по 250, 500 и 1000 г; в ведра по 5, 10, 15 кг, укупоренные натягиваемыми крышками; по 5, 10, 15 кг в многослойные бумажные мешки.

Желатиновые капсулы-контейнеры упаковывают в блистеры из фольги по 6, 10 и 12 штук или в полиэтиленовые банки по 25, 50, 100, 200 капсул. Блистеры по 1, 2, 3, 4 штук упаковывают в индивидуальные картонные пачки вместе с инструкцией по применению.

Саше упаковывают в картонные пачки по 2, 4, 6, 10, 12 штук вместе с инструкцией по применению.

Срок годности лекарственного препарата при соблюдении условий хранения – 2 года со дня производства.

Запрещается применение Азициклина по истечении срока годности.

4. Хранят Азициклин в закрытой упаковке производителя, в защищенном от света и влаги месте, отдельно от продуктов питания и кормов, при температуре от 2⁰С до 25⁰С.

5. Лекарственный препарат следует хранить в местах, недоступных для детей.

6. Неиспользованный лекарственный препарат утилизируют в соответствии с требованиями законодательства.

II. Фармакологические свойства

7. Азициклин относится к комбинированным антибактериальным лекарственным препаратам.

Доксициклин является полусинтетическим антибиотиком тетрациклиновой группы третьего поколения и активен в отношении следующих микроорганизмов: *Bordetella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Haemophilus* spp., *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium perfringens*, *Chlamydia* spp., *Rickettsiae* spp., а также *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma hyopneumoniae*. Бактериостатическое действие доксициклина связано с угнетением активности энзимов, катализирующих связывание аминокетил-РНК с рибосомальными акцепторами.

Азитромицин является полусинтетическим антибиотиком, первым представителем подкласса азалидов группы макролидов. Действует бактериостатически, связываясь с 50S-субъединицей рибосом, угнетает пептидтранслоказу на стадии трансляции, подавляет синтез белка. Действует на вне- и внутриклеточных возбудителей. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *St. aureus*; грамотрицательных бактерий: *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus ducreyi*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Gardnerella vaginalis*; некоторых анаэробных микроорганизмов: *Bacteroides bivius*, *Clostridium perfringens*, *Peptostreptococcus* spp; а также *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium avium* complex, *Ureaplasma urealyticum*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*.

Эмидонол – антиоксидант, обладает выраженным гепатопротекторным и антитоксическим эффектом при абсорбции доксициклина и азитромицина из ЖКТ и первом прохождении через печень, когда при лечебных дозах достигаются высокие пиковые концентрации в кровотоке.

После перорального введения препарата доксициклин хорошо всасывается в желудочно-кишечном тракте и проникает в органы и ткани животного, достигая максимальных концентраций в сыворотке крови через 1-2 часа. Выводится из организма главным образом с желчью и мочой.

Азитромицин при приеме внутрь быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте, распределяется по тканям и обладает длительным периодом полувыведения (50 часов). Максимальные концентрации в крови отмечают через 2 часа. Выводится из организма главным образом с желчью и мочой.

Эмидонол после перорального введения быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта и распределяется в органах и тканях животного, в печени подвергается биотрансформации, выводится из организма в основном с мочой в виде глюкуронконъюгатов и в незначительном количестве в неизмененном виде; период полувыведения составляет от 0,8 ч до 1,6 ч.

По степени воздействия на организм относится к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76), в терапевтических дозах не оказывает эмбриотоксического, тератогенного, канцерогенного и сенсибилизирующего действия.

III. Порядок применения

8. Азициклин назначают сельскохозяйственным животным (крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, свиньи) и птицам, собакам, кошкам и пушным зверям с

лечебной целью при бактериальных инфекциях дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, инфекциях кожи и мягких тканей, при хирургических вмешательствах и их осложнениях.

9. Противопоказанием к применению является повышенная индивидуальная чувствительность животного к компонентам препарата. Запрещается применять Азициклин курам-несушкам в виду накопления доксициклина и азитромицина в яйце, а также животным с выраженной почечной и печеночной недостаточностью.

10. Азициклин применяют животным перорально индивидуально или групповым способом в смеси с кормом или с водой для поения в дозах (если применяют капсулы – принудительно на корень языка), указанных в таблице, с учетом веса и вида животных, в течение 3-5 дней 1 раз в сутки, при тяжелых случаях заболевания до 7 дней. Перед применением Азициклина готовят водный раствор препарата в отношении 1:2 (1 г Азициклина на 2 мл воды), затем полученную эмульсию растворяют в необходимом количестве воды (100-1000 мл) или корма, перемешивают до визуальной однородности и задают животным. Для кошек, щенков, собак мелких пород перед употреблением капсулу рекомендуется раскрыть и перемешать с кормом или питьем.

Вид животного	Доза Азициклина		Доза азитромицина, мг/кг массы животного	Доза доксициклина, мг/кг массы животного	Доза эмидонола, мг/кг массы животного
	г /10 кг массы животного	количество капсул (г)/на животное			
Крупный рогатый скот, лошади	0,1	-	1,4	0,7	2,5
Мелкий рогатый скот, телята, жеребята, поросята*	0,3	-	4,2	2,1	7,5
Свиньи	0,2	-	2,8	1,4	5,0
Куры, индейки, гуси, утки**	0,5-0,6 (0,5-0,6 кг/т воды)	-	7,0-8,4	3,5-4,2	12,5-15,0
Кошки, собаки мелких пород весом до 5 кг, пушные звери, кролики	0,5	1(0,25)	3,5	1,7	6,2
Собаки весом 5-10 кг	-	1-2 (0,25-0,5)	3,5-7,0	1,7-3,5	6,2-12,5
Собаки 10-20 кг	-	2-3 (0,5-0,75)	7,0-10,5	3,5-5,25	12,5-18,7
Собаки 20-30 кг	-	3-4 (0,75-1,0)	10,5-14,0	5,25-7,0	18,7-25
Собаки 30-40 кг	-	4-5 (1,0-1,25)	14,0-17,5	7-8,75	25-31,2
Собаки 40-50 кг	-	5-6 (1,25-1,5)	17,5-21	8,75-10,5	31,2-37,5

*Если масса животных менее 10 кг рекомендуется 3 г препарата растворить в 100 мл воды и выпаивать животному водный раствор Азициклина в дозе 1 мл/кг массы тела.

** При лечении небольшого поголовья сельскохозяйственной птицы рекомендуется 5 г Азициклина растворить в 10 л воды и задать птице.

В период лечения животные должны получать только воду, содержащую лекарственный препарат. Лечебный раствор готовят ежедневно из расчета суточной потребности животных в воде.

11. В случае передозировки препарата возможно уменьшение потребления корма и воды, снижение привесов.

12. Особенности действия лекарственного препарата при его первом применении и отмене не выявлено.

13. Следует избегать пропуска очередной дозы препарата, так как это может привести к снижению терапевтической эффективности. В случае пропуска одной дозы необходимо ввести препарат как можно скорее.

14. При применении Азициклина в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не наблюдается.

В случае появления аллергических реакций использование препарата прекращают и назначают антигистаминные препараты и симптоматическое лечение.

15. Не допускается одновременное применение Азициклина с миорелаксантами, бактерицидными антибиотиками пенициллиновой и цефалоспориновой групп, минеральными добавками и лекарственными препаратами, содержащими соли кальция, магния, железа и алюминия, ввиду возможного снижения антибактериальной активности препарата.

16. Убой сельскохозяйственных животных на мясо разрешается не ранее, чем через 8 суток, птицы – не ранее, чем через 7 суток после последнего применения препарата. Мясо животных, вынужденно убитых до истечения указанного срока, может быть использовано в корм пушным зверям.

IV. Меры личной профилактики

17. При работе с Азициклином следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными препаратами. Во время работы запрещается курить, пить и принимать пищу. По окончании работы руки следует вымыть теплой водой с мылом.

18. При случайном контакте лекарственного препарата с кожей или слизистыми оболочками глаз их необходимо промыть большим количеством воды. Людям с гиперчувствительностью к компонентам препарата следует избегать прямого контакта с Азициклином. В случае появления аллергических реакций или при случайном попадании препарата в организм человека следует немедленно обратиться в медицинское учреждение (при себе иметь инструкцию по применению препарата или этикетку).

19. Пустую тару из-под лекарственного препарата запрещается использовать для бытовых целей, она подлежит утилизации с бытовыми отходами.

20. Организация-производитель: ООО «НВЦ Агроветзащита С-П.»; 141300, Россия, Московская область, г. Сергиев Посад, Центральная ул., 1.



АДМИНИСТРАЦИЯ
ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

По месту требования

**Управление ветеринарии
Ленинградской области**

193311, Санкт-Петербург
ул. Смольного, 3
E-mail: Veter47@lenreg.ru
Телефакс: 539-51-51
Телефон: (812) 539-44-32

От		Управление ветеринарии ЛО	—
На		01-18-472/2020 05.03.2020	—

**СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ
РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Результаты научных исследований доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», кандидата ветеринарных наук, Макавчик Светланы Анатольевны, представленные в диссертационной работе на соискание ученой степени доктора наук:

- по выделению и идентификации микроорганизмов и их чувствительности к антибактериальным препаратам;
- анализу распространенности антибиотикорезистентных штаммов;
- оптимизации методов лечения и профилактики оппортунистических инфекции бактериальной этиологии крупного рогатого скота,

используются в работе государственных бюджетных учреждениях Ленинградской области и ветеринарных лабораториях, подведомственных Управлению ветеринарии Ленинградской области, с целью повышения квалификации и переподготовке ветеринарных врачей.

При разработке профилактических противозoonотических мероприятий на территории Ленинградской области используются следующие методические рекомендации, разработанные Макавчик С.А. в соавторстве:

- Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике вирусной диареи крупного рогатого скота;
- Методические рекомендации по диагностике и профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота;

- Методические рекомендации по профилактики и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц.

Проведенные исследования и полученные результаты Макавич Светланы Анатольевны имеют научное и практическое значение по диагностике, лечению и профилактике возбудителей оппортунистических инфекции бактериальной этиологии крупного рогатого скота. Полученные результаты позволяют обеспечить получение качественной и безопасной продукции животноводства.

Заместитель начальника Управления ветеринарии,
главного государственного ветеринарного
инспектора Ленинградской области



С.В. Башаров



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ВETERИНАРНОМУ И
ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Ленинградская межобластная
ветеринарная лаборатория»
(ФГБУ «Ленинградская МВЛ»)

Московское шоссе, д.15, Санкт-Петербург, 196158

Тел. (812) 630-2069; факс: (812) 382-5769

E-mail: general@vetlab.spb.ru

<http://www.vetlab.spb.ru>

ОКПО 00529870, ОГРН 1037821050607

ИНН 7810323620, КПП 781001001

от 26.11.2020 № 2733/1
на № _____ от _____

СПРАВКА

О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты научных исследований **Макавчик Светланы Анатольевны**, кандидата ветеринарных наук, доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», выполненные по выделению и идентификации микроорганизмов из респираторного и репродуктивного тракта крупного рогатого скота, а также из молока больных маститом коров; по определению их чувствительности к антибактериальным препаратам; эпизоотологическому анализу распространения антибиотикорезистентных штаммов на территории Северо-Западного ФО РФ; оптимизации лабораторного контроля механизмов антибиотикорезистентности полирезистентных возбудителей инфекций бактериальной этиологии, – используются в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория».

Ветеринарный врач 1 категории лаборатории пищевой микробиологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, секретарь Учебного центра ФГБУ «Ленинградская МВЛ»

Кротова А.Л.





КОМИТЕТ ПО ВЕТЕРИНАРИИ ПСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

ГБУ «Станция по борьбе с болезнями животных по Псковскому,
Гдовскому, Печорскому, Плюсскому и Струго-Красненскому районам»

180502, д. Репки, п/о Неелово, Псковский р-н, Псковская обл., т. 670-405, т/ф 670-486, E-mail: sbbg5raion@yandex.ru

от 06.05.2020 № 164
на № _____ от _____

Начальнику ГБУ «СББЖ по
Псковскому, Гдовскому,
Печорскому, Плюсскому и
Струго-Красненскому районам»
Булах А. А.

СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты научных исследований доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», кандидата ветеринарных наук Макавичик Светланы Анатольевны, представленные в диссертационной работе на соискание ученой степени доктора наук по выделению и идентификации микроорганизмов из маститного молока, респираторного и репродуктивного тракта крупного рогатого скота и их чувствительности к антибактериальным препаратам; анализу распространенности антибиотикорезистентных штаммов; оптимизации методов лечения и профилактики оппортунистических инфекции - используются в Государственных бюджетных учреждениях Псковской области «Станция по борьбе с болезнями животных» и ветеринарных лабораториях для повышения квалификации и переподготовке ветеринарных врачей.

Проведенные исследования и полученные результаты Макавичик Светланы Анатольевны имеют научное и практическое значение по диагностике, лечению и профилактике возбудителей оппортунистических инфекций бактериальной этиологии. Полученные результаты позволяют обеспечить получение качественной и безопасной продукции животноводства.

Начальник ГБУ «СББЖ по Псковскому,
Гдовскому, Печорскому, Плюсскому и
Струго-Красненскому районам»:

Булах А. А.



КОМИТЕТ ПО ВЕТЕРИНАРИИ ПСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

180001, Псков, ул. Некрасова, 23, тел. 29-95-53, тел./факс 29-95-56, эл. почта: vnbadanina@obladmin.pskov.ru

от 30.04.2020 № 02-11/248

СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты научных исследований доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», кандидата ветеринарных наук Макавчик Светланы Анатольевны, представленные в диссертационной работе на соискание ученой степени доктора наук по выделению и идентификации микроорганизмов из маститного молока, респираторного и репродуктивного тракта крупного рогатого скота и их чувствительности к антибактериальным препаратам; анализу распространенности антибиотикорезистентных штаммов; оптимизации методов лечения и профилактики оппортунистических инфекции - используются в Государственных бюджетных учреждениях Псковской области «Станция по борьбе с болезнями животных» и ветеринарных лабораториях для повышения квалификации и переподготовке ветеринарных врачей.

Проведенные исследования и полученные результаты Макавчик Светланы Анатольевны имеют научное и практическое значение по диагностике, лечению и профилактике возбудителей оппортунистических инфекций бактериальной этиологии. Полученные результаты позволяют обеспечить получение качественной и безопасной продукции животноводства.

Председатель Комитета



[Handwritten signature]
В.Н.Баданина



Общество с ограниченной ответственностью
**«Научно-внедренческий центр
 Агроветзащита»**

Россия, 129329, г. Москва,
 Игарский проезд, д. 4, стр. 2.

Тел.: (495) 721-49-82
 Эл.почта: help@vetmag.ru
 Интернет: www.vetmag.ru

По месту требования

ИНН 7716520412
 КПП 771601001
 ОГРН 1057746171097

Дата 05.02.20 Иск. № 25

**Справка
 о внедрении результатов исследований**

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-внедренческий центр Агроветзащита» подтверждает, что результаты исследований доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», к.вет.н. **Макавчик Светланы Анатольевны** по определению антимикробной и клинической эффективности лекарственного препарата для ветеринарного применения «Азициклин» используются при разработке инструкций по применению данного лекарственного препарата, а также при составлении отчетов о доклинических и клинических исследований.

Генеральный директор,
 д.в.н., профессор,
 академик РАН



С.В. Енгашев

Исполнитель: Крючешникова А.А.
 тел. 8 (495) 648-26-26, доб. 702
 e-mail: krucheshnikova.a@vetmag.ru

Аналитическое приборостроение



ООО «Люмэкс-маркетинг»

Факт. адрес: 195220, г. Санкт-Петербург, ул. Обручевых, д. 1, лит. Б

Адрес для переписки: BOX 1234, Санкт-Петербург, 190900

тел.: (812) 335-03-36, 718-53-90, 718-53-91

факс: (812) 718-68-65

e-mail: lumex@lumex.ru <http://www.lumex.ru>

иск №12 от 15.05.2019г.

195220, Санкт-Петербург,
Ул. Обручевых, д. 1, лит.Б
Тел.: (812) 335-03-36
ПО МЕСТУ ТРЕБОВАНИЯ
Факс: +7 (812) 718-68-65
e-mail: lumex@lumex.ru

СПРАВКА

о внедрении результатов исследований

ГК «Люмэкс» подтверждает, что результаты исследований доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», к.вет.н Макавчик Светланы Анатольевны по отбору биологического материала разновозрастных групп животных, были использованы для обеспечения информативности и достоверности преаналитического этапа диагностических исследований на присутствие ДНК *Ureaplasma diversum*, *Campylobacter fetus*, *Mycoplasma bovis* с применением амплификатора «АриаДНА», производства ГК«Люмэкс» (регистрационное удостоверение ФСНСЗСР №ФСР 2011/12249).

Генеральный директор ООО «Люмэкс-маркетинг»  И.О. Климова

Исполнитель:

Заместитель руководителя медико-биологического отделения  Е.В. Котова



МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
Департамент научно-технологической
политики и образования
Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Государственный аграрный
университет Северного Зауралья»
(ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья)
625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7
тел: 8(3452) 46-16-43, 29-01-81, факс: 29-01-10
E-mail: acadagro@mail.ru

11.03.2020 г. № 01/369
На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья

Л.А. Глазунова

2020 г.



СПРАВКА

о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс

Результаты докторской диссертационной работы соискателя кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО СПбГАВМ доцента, кандидата ветеринарных наук Макавчик Светланы Анатольевны по выделению и идентификации микроорганизмов из маститного молока, респираторного и репродуктивного тракта крупного рогатого скота на территории Северо-Западного ФО РФ и их чувствительности к антибактериальным препаратам; эпизоотологическому анализу распространения резистентных штаммов, оптимизация методов лечения и профилактики возбудителей оппортунистических инфекции бактериальной этиологии - используются для проведения практических занятий и чтения лекций на кафедре инфекционных и инвазионных болезней Института биотехнологии и ветеринарной медицины, а также в Институте повышения квалификации и переподготовке кадров.

Научный материал работы рассмотрен и одобрен на заседании кафедры инфекционных и инвазионных болезней от 11 марта 2020 года (протокол № 8).

Заведующий кафедрой
инфекционных и инвазионных
болезней, д.б.н., профессор

В.Н. Домацкий



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого»
(ФГАОУ ВО «СПбПУ»)

ИНН 7804040077, ОГРН 1027802505279,
ОКПО 02068574

Политехническая ул., 29, Санкт-Петербург, 195251
тел.: +7(812)297 2095, факс: +7(812)552 6080
office@spbstu.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по образовательной
деятельности

Е.М. Разинкина

2020 г.



АКТ

об использовании результатов диссертационной работы
доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Макавчик Светланы Анатольевны
в учебном процессе

Мы, нижеподписавшиеся, руководитель дирекции основных образовательных программ, доцент Панкова Л.В. и руководитель образовательных программ магистратуры ВШБиПП ИБСиБ, доцент Барсукова Н.В. составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «СПбГАВМ», кандидата ветеринарных наук Макавчик С.А. по выделению и идентификации микроорганизмов, вызывающих оппортунистические инфекции, с применением молекулярно-генетических методов и их чувствительности к антибактериальным препаратам на территории Северо-Западного ФО РФ внедрены в учебный процесс университета и включены в состав учебно-методического комплекса по дисциплине «Молекулярная биотехнология» для студентов, обучающихся по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология».

Акт выдан для представления в диссертационный совет.

Руководитель дирекции
основных образовательных программ

Л.В. Панкова

Руководитель образовательных программ
магистратуры ВШБиПП ИБСиБ

Н.В. Барсукова

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ
И ОБРАЗОВАНИЯ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ,
ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ,
И СРАВНЕНИЕ ИХ С НАХОДЯЩИМИСЯ В КОЛЛЕКЦИЯХ
ВОЗБУДИТЕЛЯМИ БОЛЕЗНЕЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ, ОБЩИХ
ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ, С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ
ИЗМЕНЧИВОСТИ ИХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ, ПАТОГЕННОСТИ, А ТАКЖЕ ИЗУЧЕНИЯ
ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ
И ДЕЗИНФЕКЦИОННЫМ СРЕДСТВАМ.
ИЗЫСКАНИЕ НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ
И МЕТОДОВ ДЕЗИНФЕКЦИИ**

Методические рекомендации



**Санкт-Петербург
2021**

УДК: 619:616.98:579.648.61.648.63

ББК: 48.4.48.2.48.1

Джавадов Э.Д., Сухинин А.А., Макавчик С.А., Кузьмин В.А., Фогель Л.С., Смирнова Л.И., Орехов Д.А. Изучение биологических свойств штаммов возбудителей инфекционных болезней животных, выделенных на территории Российской Федерации, и сравнение их с находящимися в коллекциях возбудителями болезней, в том числе, общих для человека и животных, с целью оценки изменчивости их культуральных и морфологических свойств, патогенности, а также изучения их устойчивости к факторам внешней среды и дезинфекционным средствам. Изыскание новых эффективных средств и методов дезинфекции: методические рекомендации. – СПб, ФГБОУ ВО СПбГУВМ, 2021. – 35 с.

В Методических рекомендациях на основании литературных данных и результатов собственных исследований авторов представлены материалы по комплексному исследованию проблемы устойчивости возбудителей инфекционных болезней животных к антимикробным препаратам (АМП), изменчивости их культуральных и морфологических свойств, патогенности. Необходимость комплексной оценки состояния чувствительности микроорганизмов к АМП обусловлена решением различных задач: лечебных (выбор антибиотиков, антисептиков и бактериофагов); противозпизоотических (выбор дезинфектантов, антисептиков, бактериофагов и антибиотиков); профилактических (выбор дезинфектантов и антисептиков). Описаны особенности лабораторной диагностики, в частности по сдерживанию и преодолению резистентности к АМП, управление этими процессами. Показана роль дезинфекции и современных дезсредств в системе противозпизоотических мероприятий. Представлены общие положения и схемы применения испытанных и рекомендованных для профилактической и вынужденной дезинфекции на объектах ветеринарного надзора современных импортозамещающих дезинфектантов Аргенталин, Фумийод, Кемицид, ЭХАР АКВАЭХА с оценкой их эффективности.

Методические рекомендации предназначены для студентов ветеринарных факультетов вузов, слушателей факультетов повышения квалификации, аспирантов, магистров, сотрудников ветеринарных лабораторий, практических ветеринарных врачей.

Методические рекомендации составлены в соответствии с требованиями ФГОС ВПО по дисциплинам «Ветеринарная микробиология и микология» - ФВМ, «Микробиология» - ФВСЭ, ФБЭК, «Эпизоотология и инфекционные болезни» - ФВМ, «Основы эпизоотологии» - ФВБриА, «Инфекционные болезни» - ФВСЭ.

Методические рекомендации подготовлены в рамках реализации ГЗ МСХ России (2020) № 082-00041-20-00. - АААА-А20-120040790008-1 от 07.04.2020.

Авторы/составители: Джавадов Э.Д., Сухинин А.А., Макавчик С.А., Кузьмин В.А., Фогель Л.С., Смирнова Л.И., Орехов Д.А.

Рецензенты: *Л.М. Белова* – доктор биологических наук, зав. кафедрой паразитологии им. В.Л. Якимова ФГБОУ ВО СПбГУВМ; *А.В. Забровская* – доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФГБУН ВО «Санкт-Петербургский научно-исследовательский Институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

Методические рекомендации одобрены и рекомендованы к изданию методическим советом ФГБОУ ВО СПбГУВМ (протокол №1 от 27.01.2021 г.).

Методические рекомендации одобрены Координационным Советом по проблемам животноводства, ветеринарии и АПК Европейского Севера Северо-Западного центра междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения – обособленного структурного подразделения ФГБУН Санкт-Петербургский ФИЦ РАН (протокол № 1 от 12.01.2021 г.).

© ФГБОУ ВО СПбГУВМ, 2021

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.А. СТОЛЫПИНА»
(ФГБОУ ВО Омский ГАУ)
Ул. Институтская площадь, 1, Омск, 644008
тел. (3812) 65-11-46, факс (3812) 65-17-35
E-mail: adm@omgau.ru
www.omgau.ru

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Омский ГАУ
Ю.И. Новиков
2021 г.

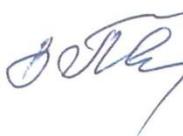


СПРАВКА

о внедрении результатов диссертационной работы в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы соискателя ученой степени доктора ветеринарных наук, доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ Макавичик Светланы Анатольевны «Бактериальные болезни крупного рогатого скота, вызванные полирезистентными микроорганизмами (диагностика, лечение и профилактика)» внедрены в учебный процесс. Материалы научных исследований используются для проведения практических занятий и чтения лекций обучающихся на кафедре ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней, а также на факультете повышения квалификации и переподготовке ветеринарных врачей.

Зав. кафедрой ветеринарной
микробиологии, инфекционных и
инвазионных болезней
ФГБОУ ВО Омский ГАУ,
д-р ветеринар. наук, профессор

 Плешакова Валентина Ивановна

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Казанская государственная академия ветеринарной
медицины имени Н.Э. Баумана»
(ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ)
РОССИЯ ФЕДЕРАЦИЯСЕ

АВЫЛ ХУЖАЛЫГЫ МИНИСТЫРЛЫГЫ
югары белем бирү
Федераль дэүләт бюджет мәгариф учреждениесе
«Н.Э. Бауман исемендәге Казан дэүләт
ветеринария медицинасы академиясе»
420029, Казань, Сибирский тракт, 35
Тел.: (8.843) 273-96-17, факс: (8.843)273-97-14,
E-mail: study@ksavm.senet.ru
ИНН/КПП 1660007935/166001001
ОГРН 1021603625427

Исх. № 384 от «26» 04 2021 г.
На _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебной и
воспитательной работе, доктор
ветеринарных наук, профессор


Волков А.Х.

« 26 » 04 2021г.

Карта обратной связи

Информационное письмо по материалам диссертации Макавчик Светланы Анатольевны на тему «Бактериальные болезни крупного рогатого скота, вызванные полирезистентными микроорганизмами (диагностика, лечение и профилактика)», внедрено в учебный процесс и принято в разработках при выполнении НИР на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Материалы диссертации рассмотрены и одобрены на заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Протокол № 8 от 26 апреля 2021г.

Заведующий кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии, доктор
ветеринарных наук, профессор



А.К.Галиуллин