

МАКАВЧИК СВЕТЛАНА АНАТОЛЬЕВНА

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени доктора  
ветеринарных наук по специальностям:

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

Санкт-Петербург, 2021

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ).

**Научные консультанты:** доктор биологических наук, профессор  
**Сухинин Александр Александрович**  
доктор ветеринарных наук, профессор,  
академик РАН,  
**Енгашев Сергей Владимирович**

**Официальные оппоненты:** **Плешакова Валентина Ивановна**, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», заведующий кафедрой ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней

**Галиуллин Альберт Камилович**, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии

**Оробец Владимир Александрович**, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», заведующий кафедрой терапии и фармакологии

**Ведущая организация** - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Государственный аграрный университет Северного Зауралья»

Защита состоится « » \_\_\_\_\_ 2021г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, тел/факс (812) 38836-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», <https://spbguvm.ru>.

**Автореферат разослан:** « » \_\_\_\_\_ 2021г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Кузнецова Надежда Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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; нерациональным применением антимикробных препаратов (АМП), что приводит к значительному экономическому ущербу (Н.А. Безбородова, Н.А. Ким, 2018; Р.Г. Госманов, Р.Х. Равилов, А.К. Галиуллин, 2018; А.В. Григорьев и др., 2016; В.А. Гриценко, Ю.Б. Иванов, 2009, 2013; М.Н. Исакова и др., 2017; В.В. Макаров, 2012, 2008; Т.М. Пашкова, 2018; Т.И. Лоренгель, В.И. Плешакова, 2020).

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.) (Ф.С. Глумчер, 2014; М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, 2005, 2017; S. Bialek-Davenet, 2014; S. Bürki, 2015).

По данным отечественных и зарубежных авторов *Ureaplasma diversum*, *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 (Д.А. Васильев и др., 2013; А.Н. Ваганова, 2018; Л.И. Смирнова, 2009; А.А. Сухинин, 2015, 2016; S. Bürki, J.Frey, P.Pilo, 2015).

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 (А.Г. Глотов, 2008, 2014; И.В. Крапивина, 2010; Т.В. Припутневич, 2015, 2017).

Несвоевременно поставленный диагноз приводит к нерациональному применению АМП и к формированию антибиотикорезистентности, механизм которых довольно разнообразен: продукция бета-лактамаз расширенного спектра инактивирующие ферменты, различные биохимические механизмы блокирования антимикробных препаратов. В настоящее время отмечается возрастание роли полирезистентных микроорганизмов в этиологии бактериальных инфекций (А.В. Забровская, 2019; М.В. Сухорукова, 2017; С.В. Шабунин и др., 2015; М.В. Эйдельштейн, 2019).

Инфекции животных, вызванные полирезистентными микроорганизмами с атипичными биологическими свойствами отличаются более тяжелым, хроническим или латентным течением, что увеличивает продолжительность лечения (А.В. Григорьев и др., 2015; В.А. Мищенко, 2006, 2008; С.В. Сидоренко, 2002, 2011).

Для успешной фармакотерапии животных важным является видовая идентификация возбудителей, анализ антибиотикограмм и интерпретация результатов, лабораторный мониторинг за механизмами антибиотикорезистентности микроорганизмов. Это необходимо ветеринарным врачам для осуществления рационального подбора АМП, их ротации и прогнозирования клинической эффективности. В животноводческих хозяйствах антимикробная терапия чаще, чем другие виды лечения требует пересмотра лечебной эффективности (А.В. Забровская, 2019; О.А. Манжурина, 2017; Т.И. Лоренгель, В.И. Плешакова, 2020; В.А. Оробец, 2019, 2020; Н.К. Фурсова, 2012; С.В. Шабунин и др., 2015; К.О. Gualerzi, 2014; Т.Е. Wittum, 2010).

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 (А.В. Караулов, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин и др., 2018; Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, Е.В. Матосова, И.Н. Ляпун, 2019).

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 БЛРС, способных оказывать влияние

на течение и исход болезни (Н.В.Данилова, П.Ю.Галицкая, С.Ю. Селивановская, 2016; Забровская А.В., 2019; В.Б. Родин, Е.Н. Кобзев, Е.В. Детушева, В.Н. Мартынова, Е.В.Тимошинова, К.В. Детушева, 2011; Н.К. Фурсова,2011; М.В. Сухорукова, 2017; М.В. Эйдельштейн, 2019; S.M. Diene, N. Coldham, 2010; J.S. Chapman, 2003; R. Graage, 2014).

Изучению этиологической значимости возбудителей *Ureaplasma diversum* и *Mycoplasma bovis* при атипичных пневмониях и 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 и идентификации. 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 (С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов, 2002; А.Н. Ваганова, 2018; А. П. Красиков, Н. В. Рудаков, 2016; S. Bürki, J. Frey, P. Pilo, 2015; В.С. Fraser, 2014; F. Maunsell, 2012; А.М. Parker, 2017).

Н.А. Безбородова (2017); А.С. Лабинская (2010); Т.В. Припутневич (2015); 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.

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, профилактики формирования и распространения антимикробной резистентности (AMP) 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 полиантибиотикорезистентными 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-биологических 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, способствующими формированию антибиотикорезистентности и снижению эффективности АМП.

7. Изучить устойчивость микроорганизмов к антимикробным препаратам, применив ранжирование, экстраполирование, выборочное репортирование АМП, лабораторные методы контроля клинически значимых механизмов резистентности микроорганизмов.

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 *K. pneumoniae*, *E. coli*, продуцирующие БЛРС и др.).

Впервые на региональном уровне выделен патогенный и полирезистентный эмерджентный микроорганизм *Stenotrophomonas maltophilia* у крупного рогатого скота с респираторной патологией.

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 2018г.;

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

- 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=381a79f79178a9e4f6ec1b6ea14ec55d&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-техническим 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 от 30.05.2017г).

- «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 гибридационно-флуоресцентной детекцией, основанной на использовании наборов микрочипов с лиофилизированными тест-системами, что позволяет ветеринарным специалистам в короткие сроки определить спектр выделяемой



микробиоты. Результаты работы были использованы ГК «Люмэкс» (Санкт-Петербург) 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 диссертации 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 АМП – диск-диффузионный метод, метод серийных разведений, метод синергизма двойных дисков с ингибиторами ферментов бета-лактамаз - 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, по программе MS Excel, AMRcloud платформы.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Комплексная лабораторная диагностика бактериальных болезней животных на основе бактериологических, протеомных (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, характеризующийся высокой частотой встречаемости и распространения, имеющих существенное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение. Спектр изолированных возбудителей с атипичными биологическими свойствами характеризуется одновременно антибиотикорезистентностью и патогенностью.

5. Результаты антибиотикограмм, лабораторного контроля за механизмами антибиотикорезистентности у полирезистентных возбудителей бактериальных инфекций, ранжирование, экстраполирование 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 результатов 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 (г.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 проведены и опубликованы 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 перечень российских рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации, статья в журнале из международной баз данных Web of Science Core Collection, а также 3 патентов.

**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.

## **2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы и методы исследований**

Работа выполнена в период с 2010 по 2019 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 темам: в 2016 году «Разработка методических рекомендации 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».

В хозяйствах Северо-Западного региона из 14 хозяйств Волосовского и одного хозяйства Волховского районов, 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: 220 при инфекциях репродуктивного тракта, 380 при маститах, 356 изолятов у телят с респираторной патологией. Проведены микробиологические методы исследования с применением протеомного метода (на базе НИИДИ ФМБА России, Санкт-Петербург) и молекулярно-генетических исследований (ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург).

Ранжирование АМП проводили с учетом их клинической эффективности, а также возбудителей, имеющих природную резистентность, определены маркерные АМП или предикторы чувствительности.

Для корректной интерпретации результатов использовали классические методы: измерение зон диаметров задержки роста ДДМ, определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) с помощью панелей Sensititre, и автоматизированные системы (MicroScan WalkAway 40 plus). Выбор интерпретационных критериев зависел от целей, как для определения чувствительности с терапевтической целью, так и при проведении эпизоотологического мониторинга за антимикробной резистентностью. Для рациональной фармакотерапии животных использовали критерии интерпретации ECOFF с учетом биологической активности микроорганизмов, «Экспертные правила определения к антибиотикам EUCAST». Мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов проводили согласно стандартам Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI), клиническим рекомендациям Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), рекомендациям Европейского комитета по определению

чувствительности к антибиотикам (EUCAST). Резистентные изоляты разделяли на группы: устойчивые к одной и двум группам АМП, полирезистентные – устойчивые к трем и более группам АМП, и входящие в эту группу экстремально резистентные изоляты – чувствительные к одной или двум группам АМП.

Наличие  $\beta$ -лактамаз у выделенных микроорганизмов устанавливали с помощью планшета ESB1F (с ампициллином, цефалоспоридами I-III поколений и карбапенемами (имипенем, меропенем) для общей оценки профиля резистентности) Sensititre («Trek Diagnostic Systems», Великобритания), методом синергизма двойных дисков с ингибиторами ферментов – клавулановой кислотой.

Прогнозирование (экстраполирование) наличия ассоциированной резистентности проводили по приоритетным препаратам. Выборочное репортирование АМП осуществляли, анализируя антибиотикограммы, с учетом результатов чувствительности антибиотиков, имеющих критическое значение в медицине согласно перечню ВОЗ.

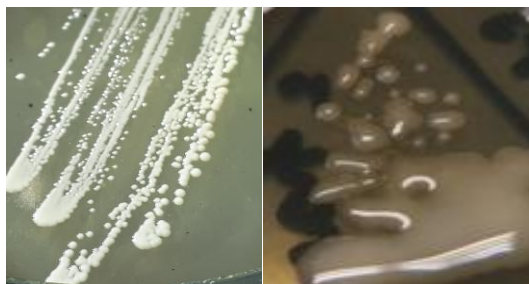
Исследования проводили с использованием фармако-токсикологических, клинических, биохимических и статистических методов.

## 2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

#### 2.2.1.1 Фенотипическая характеристика выделенных грамположительных микроорганизмов

Видовой состав коагулазоотрицательных стафилококков (CoNS) представлен 6 видами (*S.hemolyticus*, *S. epidermidis*, *S.chromogenes*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. sciuri*). *S.haemolyticus* чаще образует круглые колонии с ровным краем и гладкой поверхностью (S-формы). Мукоидные (напоминают капельку воды) характерны для вирулентных микроорганизмов, имеющих капсулу (M-форма) (рис.1).



S- форма колоний

M-форма колоний

Рисунок 1 - Культуральные свойства *S.haemolyticus*

*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).



S- форма колоний

R-форма колоний

Рисунок 2 - Культуральные свойства *S.aureus*

Исследованные грамположительные микроорганизмы очень пластичны и легко изменяли биологические свойства под действием различных неблагоприятных факторов (антибиотиков, изменения температуры, вида питательной среды, старение культуры).

### 2.2.1.2 Фенотипическая характеристика выделенных грамотрицательных микроорганизмов

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.3).

Получены патогенные изоляты редко встречающихся возбудителей инфекций респираторного тракта животных: *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia rettgeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Pantoae agglomerans* - менее 5 % от общего числа выделенных микроорганизмов.



Рисунок 3- А. Классические *Klebsiella pneumoniae* (*cKP classical K. pneumoniae*) и

Б. гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (*hvKp –hypervirulent K. pneumoniae*)

Установлено, что диапазон фенотипических изменений у УПМ разнообразен. В зависимости от температуры культивирования свойства бактерий меняются. Так, *Pantoae agglomerans* образовывали при температуре 20-25°C большее количество полисахаридов, чем при температуре культивирования 37°C (рис. 4).



Рисунок 4 - Образование мукоидного фенотипа *Pantoae agglomerans* при росте на плотных и жидких средах

В процессе культивирования на различных питательных средах происходили изменения биологических свойств: формирование мукоидного фенотипа (микробные биопленки), способность к продукции пигмента, резистентность к АМП и др..

### **2.2.1.3 Результаты выявления и идентификации изолятов кампилобактерий бактериологическими методами**

В случаях наличия в смешанной культуре таких микроорганизмов как *Ps. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, процент получения чистых культур *Campylobacter fetus* в исследуемом материале значительно снижается, что связано с антагонистическими отношениями между возбудителем кампилобактериоза и другими бактериями.

Стандартные микробиологические методы не всегда оказываются эффективными при видовой дифференциации микроорганизмов с измененными биологическими свойствами (морфологическими и культурально-биохимическими), в связи с их переходом в некультивируемые формы.

### **2.2.1.4 Результаты выявления и идентификации изолятов микоплазм бактериологическими методами**

Все выделенные культуры относили к группе «неферментирующих» микоплазм. По современной классификации в эту группу включены *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovis genitalium* (рис. 5).

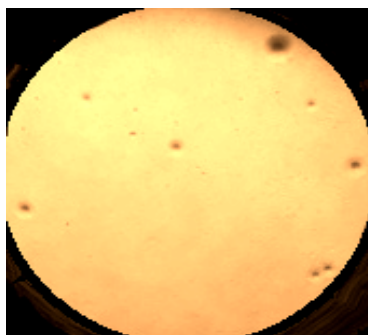


Рисунок 5 - Колонии *Mycoplasma spp.* на плотной среде(х40) с вросшим в агар центром колонии и периферийной зоной роста

При всех достоинствах бактериологического подхода к индикации микоплазм существуют проблемы доставки клинического материала, культивирования с



использованием питательных сред со сложным компонентным составом, оптимальными условиями первичной изоляции, а также трудоемкость и длительность исследования, что затрудняет возможность скрининга большого числа проб.

Отсутствие видовой идентификации возбудителя приводит к получению ложноположительного заключения о носительстве этиологически значимых микроорганизмов в исследуемом материале от крупного рогатого скота.

Роль видовой идентификации заключается в оценке клинического значения микроорганизма, выборе АМП для тестирования и интерпретации результатов определения чувствительности, выбора АМП для лечения, выбора режима и длительности терапии. Санация антибиотиками животных - носителей микоплазм, уреаплазм, кампилобактерий и других оппортунистических микроорганизмов приводит к нерациональному применению антибиотиков, развитию и распространению антибиотикорезистентных микроорганизмов.

### **2.2.2 Применение MALDI–TOF–MS анализа для видовой идентификации и дифференциации микроорганизмов с атипичными биологическими свойствами**

В результате исследования были выявлены биохимические свойства микроорганизмов, которые характеризовались атипичным проявлением для грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. В связи с этим была проведена повторная идентификация некоторых изолятов с применением MALDI–TOF–MS анализа. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрией определены белковые профили и виды данных 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 видовой идентификация изолятов полностью соответствовала их биохимической идентификации.

Протеометрическим методом проводили идентификацию коагулазоотрицательных стафилококков (CoNS) с мукоидным фенотипом (М-колонии). Изучены изоляты стрептококков видов: *S. agalactiae*, *S. disagalactiae*, *S. pyogenes*. Среди всех протестированных методом MALDI–TOF–MS анализа с  $score \geq 2,0$ .

Параллельно произведена идентификация изолятов *S. disagalactiae* и получены неоднозначные результаты.

В результате идентификация  $\beta$ -гемолитических стрептококков полное совпадение отмечено только при тестировании *S. agalactiae* и *S. pyogenes*.

На основании проведенного исследования сделано следующее заключение: одновременное применение бактериологических методов с использованием MALDI-TOF-MS позволяет существенно повысить достоверность видовой идентификации, обоснованность и быстроту принятия клинических решений. На основании получаемых данных можно с наибольшей вероятностью выбирать своевременную этиотропную терапию.

### **2.2.3 Молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование) в лабораторной диагностике бактериальных инфекций животных**

Все случаи несовпадений результатов идентификации проверяли дополнительными диагностическими тестами классической микробиологии и/или молекулярно-генетическим методом (ПЦР, секвенирование генов 16S рРНК).

#### **2.2.3.1 Апробация микрочиповой системы для обнаружения нуклеиновых кислот с лиофилизированными реактивами для молекулярно-генетических исследований в производственных условиях**

В ходе работы применили два вида полимеразной цепной реакции (ПЦР): ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации с использованием тест-систем (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), а также ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами (ГК «Люмэкс», Санкт-Петербург).

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).

##### **2.2.3.1.1 Состав и характеристика наборов микрочипов с диагностической лиофилизированной тест-системой**

Микрочип содержит ячейки микрореакторов с лиофилизированными ПЦР-смесями. Гидрофобная поверхность снаружи и гидрофильная внутри удовлетворяют требованиям удобства использования, и предотвращает взаимное перемешивание проб (кросс-контаминацию). Микрочипы с лиофилизированными тест-системами «Урогенитальные инфекции КРС» системами («УГИ-1», «УГИ-2», «УГИ-3», «УГИ-4» КРС), разработанные ГК "Люмэкс" (Санкт-Петербург) позволяли исследовать образцы клинического материала и проводить молекулярную идентификацию ДНК одного возбудителя или одновременно нескольких *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*, *Campylobacter fetus* и *Chlamydophila pecorum*.

Производимая компанией ГК "Люмэкс" тест-система может быть использована на приборе АриаДНА в формате микрочипов. Гибкая система производства обеспечивает возможность создания чипов под заказ пользователя.

### 2.2.3.1.3 Оценка диагностических возможностей и апробация в лабораторных условиях ПЦР в режиме реального времени в формате микрочипов с лиофилизированными реактивами

Картридж с микрочипом помещали в термоблок амплификатора с детекцией в режиме реального времени «АриаДНА» и запускали программу амплификации. Программа термоциклирования была следующей: удержание — 94° С, 120 с; циклы амплификации ДНК: плавление ДНК — 94° С, 3 с, отжиг праймеров и элонгация — 60°С, 20 с, 45 циклов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены адекватные результаты для положительного и отрицательного контроля (рис.6).

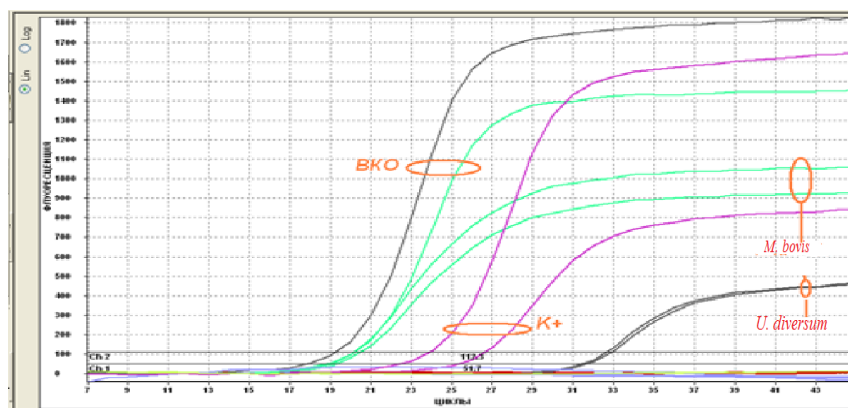


Рисунок 6 - Графики одновременного накопления продуктов амплификации специфического ПЦР-фрагмента *M. bovis* и *U. diversum* в ПЦР в режиме реального времени в формате микрочипов

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 и дифференциации нескольких патогенов.

### 2.2.3.2.4 Методологические подходы к созданию диагностических панелей молекулярно-генетического выявления условно-патогенных микроорганизмов, изолированных от животных

Полученные данные позволили предложить для скрининговых исследований к разработке диагностическую ПЦР-панель, содержащую праймеры наиболее часто встречающихся возбудителей (в т.ч. *S. agalactiae*, *E. coli*, *E. faecalis* и др.), что позволяет провести одновременную детекцию патогенов в кратчайшие сроки и с высокой точностью определять широкий спектр возможных патогенов.

Отработан способ одновременной детекции микроорганизмов рода *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*, 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: 95°С-5 мин - 1 цикл; последующие 5 и 35 циклов 2-этапная амплификация 95 °С в течение 15 сек, 56°С-30 сек.

#### **2.2.3.2.5 Метод секвенирования в структуре лабораторной диагностики бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных**

В исследуемых пробах клинического материала (слизи респираторного и репродуктивного трактов, секрета молочной железы) была обнаружена группа микоплазм «неферментирующих» глюкозу и аргинин, к которой относят *Mycoplasma bovis*.

Для поиска гомологичных последовательностей в базах данных NCBI использовали алгоритм BLAST на поисковом интернет-ресурсе [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). В результате работы были подобраны специфические праймеры на область 16S рРНК *Mycoplasma bovis*, оптимизированы условия их термоциклирования для реакции ПЦР.

Для видовой идентификации амплифицировали нуклеотидную последовательность 16S рРНК методом рутинной ПЦР, используя праймеры M\_bovis (for CGAAGG CAGCTAACTGGGCATAC; rev TCGGGCAGTCTCCTTAGAGTG) при температурно-временных режимах: 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. Снятые с агарозного геля амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали по методу Сэнгера. Сравнительный компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы «BLAST».

*Mycoplasma bovis* идентифицирована методом секвенирования. Уровень гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей составил 100,0%, что подтверждает правильность выбранных последовательностей.

Видовой состав идентифицированных микроорганизмов представлен изолятами: *Corynebacterium amycolatum* (30,0%), *Corynebacterium freneyi* (30,0%), *Corynebacterium glutamicum* (15,0%), *Corynebacterium hominis* (15,0%), *Corynebacterium testudinoris* (10,0%).

Секвенирование 16S рРНК применили как референс-метод для идентификации выделенных микроорганизмов с атипичными свойствами.

Разработан алгоритм лабораторной диагностики инфекционных болезней с учетом атипичных, труднокультивируемых микроорганизмов (рис.7).

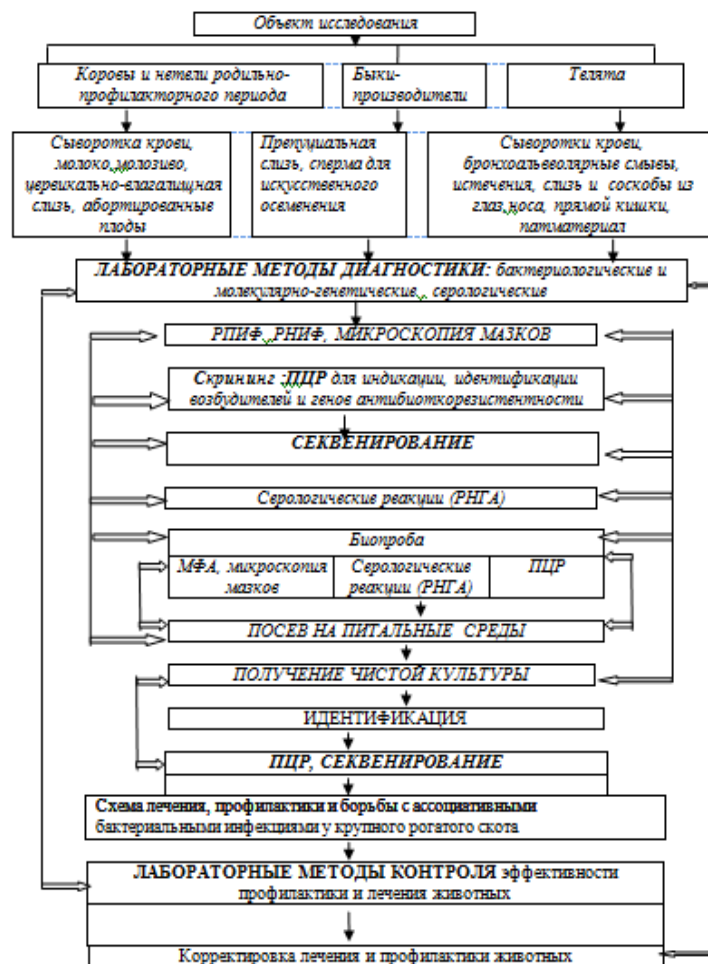


Рисунок 7 - Схема оптимизации лабораторной диагностики ассоциативных бактериальных инфекций животных

Молекулярно-генетический метод расширяет наше представление о видовом разнообразии микоплазм, коринебактерий, выделенных от животных и дает основание для изучения их возможной роли как в поддержании состояния микробиоценоза, так и в развитии патологических процессов. Полученное нами разнообразие видов труднокультивируемых микроорганизмов подчёркивает ценность метода секвенирования при видовой идентификации этой группы микроорганизмов.

## 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

При молекулярно-генетическом исследовании материала от коров с признаками вульвовагинита и нарушениями репродуктивной функции с использованием микрочипового амплификатора одновременно выделили и идентифицировали бактериальные патогены *Mycoplasma bovis* в клинических образцах в 42,0% случаев, *U. diversum* (49,0%), *Campylobacter fetus* (7,0%), *Chlamydomphila pecorum* (2,0%).

Бактериологическими методами наиболее часто выделяли таких патогенов, как *Escherichia coli* (в 23,9% случаев), *Klebsiella pneumoniae* (18,3%), *Proteus spp.* (13,4%), *Campylobacter fetus* (10,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,0%), *Staphylococcus spp.* (12,0%) и *Streptococcus spp.* (3,0%), и др. (рис.8).

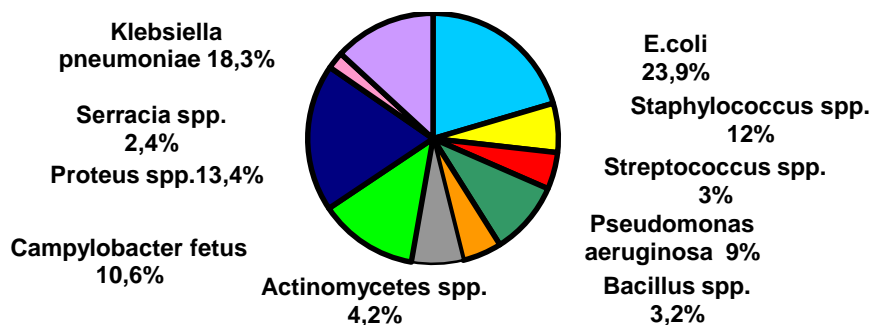


Рисунок 8 - Видовой и процентный состав микроорганизмов, выделенных, бактериологическим методом из клинического материала, полученного от коров с нарушением репродуктивной функции

Внедрение в лабораторную практику молекулярно-генетических 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, способствует профилактике возникновению и распространению антибиотикорезистентности, в итоге повышает качество пищевых продуктов, получаемых от животных.

#### 2.2.4.2 Особенности микробной этиологии инфекционных воспалительных болезней (ИВБ) у телят

В результате проведенных исследований выявлены различные варианты ассоциаций микроорганизмов в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ в 70,0% проб. Из них выделено и идентифицировано 178 культур бактерий: *Escherichia coli* (27,7%), *K. pneumoniae* (7,47%), *Proteus spp.* (13,48%), *Pseudomonas aeruginosa* (10,08%), *Streptococcus spp.* (5,04%). Среди возбудителей *Staphylococcus spp.* (33,23%) доминировали *CoNS* (72,0%) и *Staphylococcus aureus* (28,0%) (рис.9).

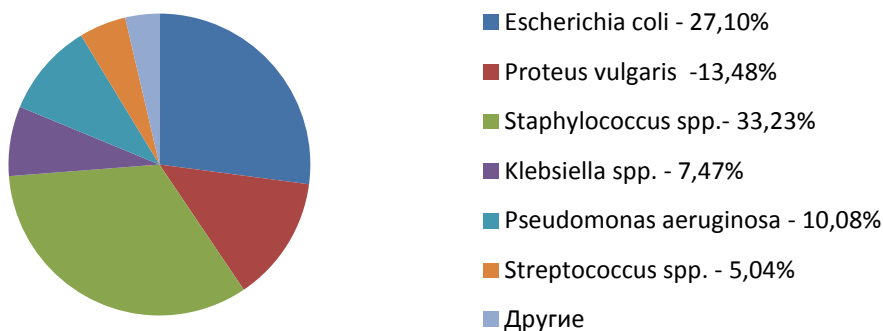


Рисунок 9 - Виды УПМ, выделенные бактериологическим методом клинического материала, полученного от телят с респираторным симптомокомплексом

При обследовании отделяемого влагалища у стельных коров – матерей этих телят, а так же из легких абортированных плодов обнаружены микоплазмы и уреоплазмы.

Проведенный анализ результатов ПЦР-исследований атипичных микоплазменных пневмоний телят показал высокую частоту распространения микроорганизмов рода *Mycoplasma* - 89,0% случаев выделения. При молекулярно-биологическом методе исследования биологического материала идентифицировали и дифференцировали *Mycoplasma bovis* – 28,0%, *Ureaplasma diversum* – 31,0% и другие виды микоплазм в 30,0% случаев выделения (рис.10).

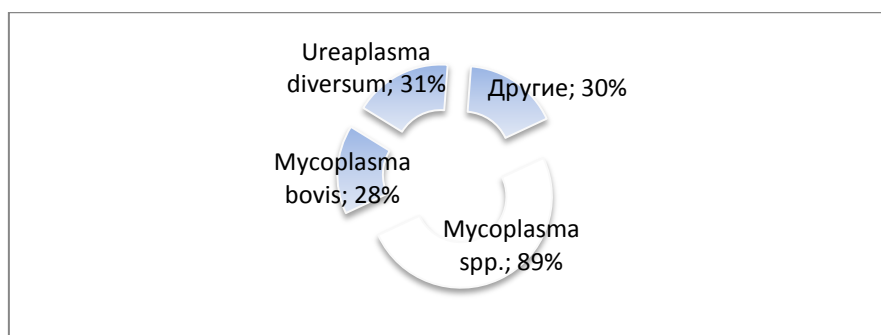


Рисунок 10 - Доли возбудителей *Mycoplasma bovis* и *Ureaplasma diversum*, выделенных с применением ПЦР, при атипичных инфекциях телят

Также получены патогенные изоляты редко встречающихся возбудителей инфекций респираторного тракта животных: *Pseudomonas koreensis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Morganella morganii*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia rettgeri* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

#### 2.2.4.3 Спектр микроорганизмов при инфекционных маститах коров

По результатам бактериологических мониторинговых исследований, проведенных в период 2015-2019 гг., установлено, что чаще всего (53,0%) бактериальные инфекции протекают как коинфекция, 42,0% случаев вызваны двумя возбудителями, 7,0% – тремя и 4,0% –четырьмя патогенами. В остальных 47,0% случаев, бактериальные инфекции регистрируются в виде моноинфекции (рис. 11).

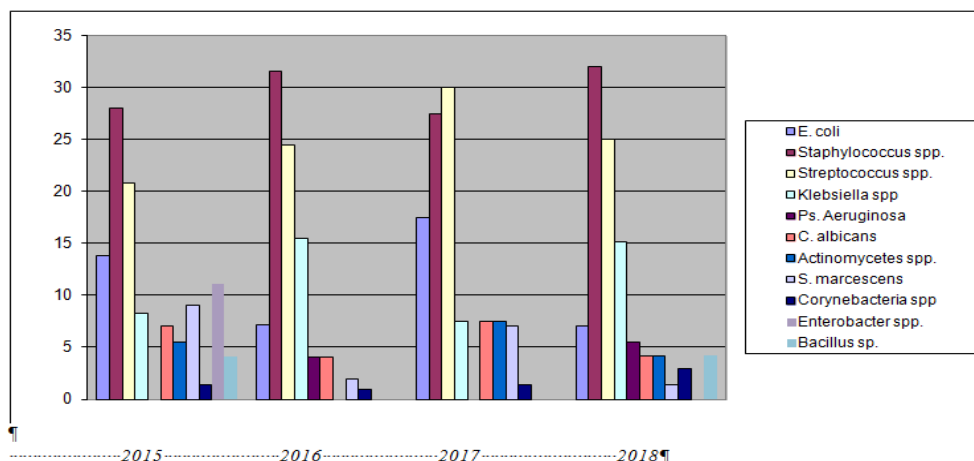


Рисунок 11- Структура приоритетных микроорганизмов, изолированных бактериологическим методом из молока больных маститом коров в период 2015-2018гг.

Этиология маститов у коров чаще всего связана с патогенными бактериями *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* и *Staphylococcus aureus*. При этом все эти бактерии вызывали как моно, так и полиинфекции молочной железы.

По результатам исследований с 2015 г. по 2018 г. в секрете вымени больных маститом коров из четырёх хозяйств отмечено преимущество кокковой микрофлоры по сравнению с энтеробактериями - 31,2% и 64,5 % соответственно. *S.aureus* составили, в среднем, 29,4%, коагулазоотрицательные стафилококки - 3,5%, стрептококки – 28,7%, энтерококки – 2,8%. В результате исследования к доминирующим патогенам были отнесены 35 культур *K. pneumoniae*, в том числе *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *K. oxytoca*. Выделены гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae (hvKp –hypervirulent K. pneumoniae)* и классические *Klebsiella pneumoniae (Ckp)*.

По результатам бактериологических исследований за 2015 год из 63 образцов молока от коров, исследованных на возбудителей инфекционного мастита, получено 72 изолята: *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 бактериологических исследований за 2016 год из 110 образцов молока от коров, исследованных на возбудителей инфекционного мастита, 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 sp.* (3,06%), *Serratia marcescens* (1,2%), *Citrobacter spp.*(3,06%), *Actinomycetes spp.* (3,06%).

По результатам бактериологических исследований за 2017 год из 54 образцов молока от коров, исследованных на возбудителей инфекционного мастита, 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* ( 17,5%) и *Enterococcus faecalis* (12,5%); *Actinomycetes spp.* (7,5%); *Corynebacteria spp.* (1,4%).

По результатам исследований за 2018 год из 62 образцов молока, выделено 72 изолята: *E. coli* (7,0% случаев), *Klebsiella pneumoniae* (15,2%), *Candida albicans* (4,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,5%), *Staphylococcus spp.* (32,0%) и *Streptococcus spp.* (25,0%), *Bacillus spp.* (4,2%), *Serratia marcescens* (1,4%), *Actinomycetes spp.* (4,2%), *Corynebacteria spp.* (1,4%). Отмечено преимущество кокковой микрофлоры по сравнению с



энтеробактериями - 56,9% и 29,1 % соответственно. Патогенные стафилококки составили, в среднем, 23,6%, коагулазоотрицательные стафилококки - 8,3%.

Проведен анализ результатов молекулярно-генетических исследований молока коров больных маститом. Установлено, что *Mycoplasma spp.* выделяли в 66,6%, а в 33,3% - *Mycoplasma bovis*.

## **2.2.5 Микробиологические основы рациональной фармакотерапии животных**

### **2.2.5.1 Результаты определения антибиотикорезистентности условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов**

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 aminopenicillins (ампициллин, амоксициклин), цефалоспорины I поколения (цефалексин).

*E.coli* обладает природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая бензилпенициллин, гликопептиды, макролиды, линкозамиды, стрептограмин, фузидиевую кислоту, рифампицин, даптомицин, линезолид.

Тестированные 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 aminopenicillins (ампициллин, амоксициклин) и цефалоспорины I поколения (цефалексин).

*K. pneumoniae* обладает природной резистентностью к ряду антибиотиков, в том числе бензилпенициллину, гликопептидам, макролидам, линкозамидам, стрептограминам, фузидиевой кислоте, рифампицину, даптомицину, линезолиду.

Значения МИК для гентамицина составили  $> 2$  мг/л и  $\geq 4$  мг/л, что выше установленного стандарта для чувствительных изолятов. 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.

Культуры *Pseudomonas aeruginosa* чувствительны только к гентамицину (S=73,0%), пиперациллину (S=100,0%), цефтазидиму (S=100,0%), ципрофлоксацину (S=80%).

*Pseudomonas aeruginosa* обладает природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая ампицилин, амоксицилин, клиндамицин, даптомицин, гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин), макролиды, тетрациклины, хлорамфеникол, цефалоспорины 1 и 2 поколения, кроме «антисинегнойных цефалоспоринов»-цефтазидима.

Изоляты *Stenotrophomonas maltophilia*, выделенные из клинического материала от сельскохозяйственных животных с респираторной патологией, были чувствительны только к левофлоксацину и моксифлоксацину. Природной резистентностью к широкому кругу антимикробных препаратов обладали изоляты *S. maltophilia*, в том числе и к бета-лактамам АМП.

#### **2.2.5.2 Результаты антибиотикорезистентности условно-патогенных грамположительных микроорганизмов**

**Чувствительность к АМП клинических изолятов стрептококков и энтерококков, изолированных от крупного рогатого скота.** 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: амоксициллину (S=100,0%), цефалексину (S=100,0%), цефотаксиму (S=100,0%); резистентны к эритромицину (R=90,0%); а значит к азитромицину; тетрациклину (R=100,0%), доксициклину (S=70,0%).

Культуры стрептококков группы Е *Streptococcus uberis* резистентны к тетрациклину (R=100,0%), чувствительны к ципрофлоксацину (S=100,0%).

Гемолитические стрептококки группы А проявили резистентность к эритромицину (R=100,0%), клиндамицину (R=100,0%), и тетрациклину (R=70,0%).

Исходя из чувствительности к бензилпенициллину, который является маркерным препаратом для бета-лактамов, использование препаратов из этой группы для терапии животных целесообразно.

*Enterococcus faecalis* чувствителен к бензилпенициллину (S=50,0%), ампициллину (S=50,0%) и тетрациклину (S=70,0%). Если выявлена резистентность к гентамицину, то необходимо добавлять предупреждение при экстраполировании результатов о том, что комбинации бета-лактамов с гентамицином и другими гликозидами не будут обеспечивать синергизм, кроме стрептомицина. *Enterococcus faecalis* чувствителен к стрептомицину (S=100, 0%).

*Enterococcus faecalis* обладает природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая цефалоспорины, аминогликозиды, макролиды, сульфаниламиды, фузидиевую кислоту, клиндамицин.

**Чувствительность к АМП клинических изолятов стафилококков, изолированных от крупного рогатого скота.** Изоляты культур *Staphylococcus aureus* проявили высокую чувствительность только к антибиотикам цефалоспоринового ряда. *Staphylococcus aureus* обладает природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая цефтазидиму, азтреонаму, полимиксину, колистину, налидиксовой кислоте.

Изоляты были чувствительны к азитромицину и эритромицину (S=76,0%), цефотаксиму (S=100,0%), цефалексину (S=100,0%), неомицину (S=70,0%), клиндамицину (S=76,0%), индуцибельной резистентности к клиндамицину не выявлено, тетрациклину (S=70,0%).

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.

Все изоляты, отнесённые к группе коагулазоотрицательных стафилококков (CoNS) на основании ДДМ характеризовались множественной лекарственной устойчивостью. 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 тетрациклином на 21,7%, аминогликозидам – на 32,0%, линкозамидам – на 19,7%, чем у CoNS. Удельный вес чувствительных к АМП CoNS составили 79,0% и устойчивых 21,0% случаев выделения. Удельный вес чувствительных к АМП *S. aureus* - 51,1% и устойчивых - 48,9% от случаев выделения.

Резистентности к оксациллину у всех исследованных нами изолятов не обнаружено, что позволяет отнести их к метициллин-чувствительным *S. aureus* MSSA. Показано, что изоляты, выделенные из молока коров в Северо-Западном регионе РФ, были чувствительны к ванкомицину (S=100,0%). Этот препарат больше не

используется в ветеринарной медицине во многих странах, включая Россию, что может объяснять представленные результаты.

### 2.2.5.3 Лабораторный контроль механизмов резистентности к антимикробным препаратам микроорганизмов, изолированных от крупного рогатого скота

При определении чувствительности к АМП изолятов было установлено, что 73,0% исследованных микроорганизмов были устойчивы к 2 – 6 фармакологическим группам АМП, из них к двум группам АМП было устойчиво 5,0% изолятов, а остальные 68,0% были полирезистентными. Из 68,0% полирезистентных изолятов 31,0% относили к экстремально резистентным (рис.12).

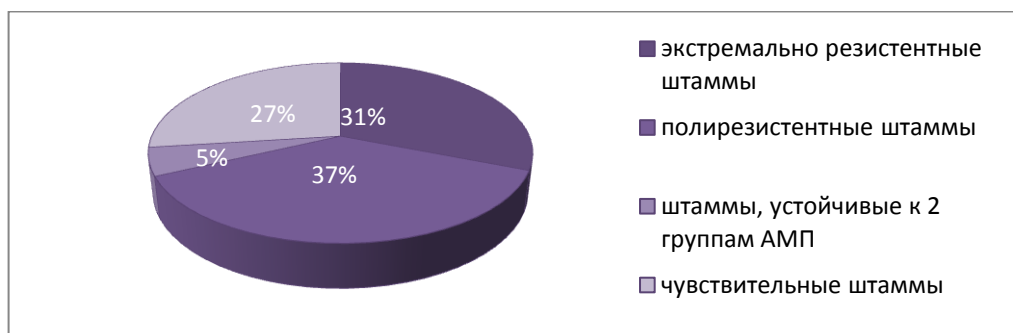


Рисунок 12 - Удельный вес чувствительных и устойчивых к АМП штаммов условно патогенных микроорганизмов, %.

Наиболее важный механизм устойчивости к цефалоспорином грамотрицательных бактерий связан с продукцией бета-лактамаз, причем наибольшую угрозу представляют бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), способные гидролизовать цефалоспорины широкого спектра. Выявление фенотипов бактерий, несущих детерминанты резистентности  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), проводили методом двойных дисков с ингибиторами ферментов – клавулановой кислотой (рис.13).

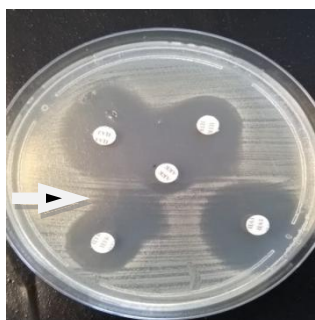


Рисунок 13 - *E.coli* с детерминантами резистентности  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра (ESBL)

Установлена продукция БЛРС у 21 (8,4%) из 250 изолятов УМП, выделенных из клинического материала крупного рогатого скота. *S. maltophilia* обладали природной устойчивостью к АМП, гидролизовали все бета-лактамы соединения, включая карбапенемы. У *K. pneumoniae* и *E.coli* установлена приобретенная устойчивость к бета-лактамам антибактериальным препаратам, что ограничивает их применение для лечения

животных с инфекционной патологией бактериальной природы, вызванной этими полирезистентными возбудителями.

На основании лабораторных методов диагностики бактериальных инфекций животных, фенотипических профилей чувствительности к антимикробным препаратам, результатов выявления механизмов резистентности и ранжирования клинической чувствительности микроорганизмов с учетом природной резистентности, выборочного репортирования, нами предложены наиболее достоверные терапевтические рекомендации ветеринарным врачам по подбору АМП для рациональной фармакотерапии животных (рис.14).



Рисунок 14 - Комплексная схема лечебно-профилактических мероприятий при бактериальных инфекциях КРС

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.

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

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.

Интерпретация результатов оценки чувствительности заключается в прогнозировании результата антимикробной терапии на основе данных исследования возбудителя инфекционной болезни *in vitro*.

## **2.2.6 Фармако-токсикологические испытания комбинированного препарата**

### **Азициклина**

Разработан и оптимизирован композиционный состав комбинированного препарата Азициклин (ООО НВЦ «Агроветзащита», Россия). В состав 1г комбинированного препарата Азициклин входят доксициклин (7,0%), азитромицин (14,0%), эмиданол (25,0%). Азициклин является антибиотиком широкого спектра действия класса макролидной и тетрациклиновой групп, их антимикробное воздействие имеет необратимый эффект из-за вызываемых ими изменений в рибосомах бактерий. Помимо антибактериальной активности, учитывали противовоспалительные, иммуномодулирующие и гепатопротекторные свойства компонентов, входящих в состав Азициклина.

#### **2.2.6.1 Оценка антимикробной активности Азициклина**

Установили, что Азициклин обладает высоким антимикробным эффектом в отношении к грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов и 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, отмечали синергизм между антимикробными препаратами. Значение МПК важно для эффективного дозирования антимикробного препарата, при наличии у бактерий природной устойчивости антибиотика клинически неэффективны.

#### **2.2.6.2 Изучение острой токсичности Азициклина**

Для определения острой токсичности препарат вводился через зонд в желудок мышам по 0,6 мл (предельно допустимый объем для введения перорально).

Однократное пероральное введение препарата в дозах 10, 20 и 30 г/кг не вызвало гибели мышей, а также проявления признаков интоксикации вплоть до 14 сут после введения. Доза 30000 мг/кг была максимально возможной для перорального введения лабораторным беспородным мышам. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 препарат 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. С помощью полученного графика определены ЛД<sub>16</sub> и ЛД<sub>84</sub>, которые составили – 39

г/кг и 51 г/кг, соответственно. Стандартная ошибка устанавливалась по формуле Гадда и составила 2,37 г/кг.

Таким образом, ЛД<sub>50</sub> препарата Азициклина составляет 45±2,37 г/кг массы тела, что соответствует 4500 мкг/кг. Согласно классификации (ГОСТ 12.1.007-76), препарат – Азициклин малотоксичное соединение (4-й класс опасности).

### **2.2.6.3 Изучение хронической токсичности Азициклина**

При изучении подострой токсичности животным вводили препарат Азициклина в дозах 90 мкг/кг, 225 мкг/кг, 450 мкг/кг, при этом масса тела подопытных лабораторных беспородных крыс не отличалась достоверно от массы тела животных из контрольной группы. Максимальная доза 450 мг/кг не вызвала статистически значимые изменения гематологических показателей крови: гемоглобина, содержание эритроцитов и лейкоцитов.

В максимальной дозе не отмечали достоверное повышение уровней аланинаминотрансфераза (АлАт) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ), а также тенденцию к повышению креатинина, общего и прямого билирубина, что свидетельствует о положительном влиянии Эмиданола, входящего в состав Азициклина.

Определены параметры острой и подострой токсичности препарата Азициклина. Следует отметить, что антиоксидант Эмиданол, входящий в состав Азициклина, обладает выраженным гепатопротекторным и антиоксидантным эффектом.

Препарат не обладает местно-раздражающими свойствами и не вызывает аллергической реакции у животных в испытанных дозах и будет рекомендован к регистрации, и разработке нормативно-технической документации.

## **2.2.7 Терапевтическая эффективность применения препарата азициклина при бактериальных болезнях телят**

### **2.2.7.1 Лечебная эффективность препарата Азициклина при остром бронхите и бронхопневмонии телят**

Терапевтическую эффективность Азициклина при остром бронхите и бронхопневмонии телят бактериальной и микоплазменной этиологии изучали в сравнении с препаратами аналогичного назначения: 0,5%-й раствор энроксила и 2,5%-го раствора тетрациклина. Азициклин вводили в дозе 0,25 г/10 кг массы животного с интервалом 24 ч, трехкратно при острой бронхопневмонии и хронической бронхопневмонии.

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.

На основании лабораторных результатов и данных по распространению ассоциативных инфекций бактериальной этиологии, вызванных *U. diversum*, *M. bovis* среди телят, было сделано заключение о целесообразном применении комплексного препарата Азициклин для антибактериальной терапии телят с респираторной патологией микоплазменной этиологии. Это обусловлено, в первую очередь его низкой токсичностью и пролонгированным бактериостатическим эффектом. Кроме того в первые дни жизни иммунная система телят является несформированной, и иммунная защита организма осуществляется только за счёт колостральных (молозивных) иммуноглобулинов, поэтому иммуномодулирующий эффект Азициклина в данной ситуации весьма востребован.

Клинические испытания в производственных условиях проведены на телятах черно-пестрой породы массой 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: подопытные с применением Азициклина и схемы лечения, применяемой в хозяйстве, и контрольная - клинически здоровые животные по 10 телят в каждой.

Телятам подопытной группы вводили антибиотик Азициклин индивидуально 0,25г на 10кг массы тела один раз в день. Перед его применением готовили водный раствор препарата в пропорции 1 г Азициклина на 2 мл воды. Полученную эмульсию растворяли в воде и вводили перорально через 2 ч после выпаивания телят в течение 3-х дней.

Телят контрольной группы лечили по схеме, применяемой в хозяйстве. В течение 3 дней подкожно вводили энроксил – 0,5%-й раствор энроксила в дозе 0,5 мл на 10 кг массы тела теленка; внутримышечно – тетрациклин из расчета 0,5 г на 10 кг массы теленка в виде 2,5%-го раствора.

При исследовании терапевтической эффективности Азициклина установлено, что доза 0,25 г /10 кг массы животного, применяемая 3-кратно с интервалом 24 ч, является наиболее оптимальной для лечения телят с острой катаральной бронхопневмонией, острым бронхитом, вызванных преимущественно микоплазменными возбудителями (улучшалось общее состояние животных, дыхание становилось мягче, хрипы не прослушивались, температура была в норме).

#### **2.2.7.2 Лечебная эффективность препарата Азициклина при хронической бронхопневмонии и серозно – катаральной пневмонии**

Терапевтическую эффективность препарата Азициклина при хронической бронхопневмонии и серозно – катаральной пневмонии, осложненной микоплазменной инфекцией, изучали в сравнении с препаратами аналогичного назначения: 0,5%-й раствора энроксила и 2,5%-го раствор тетрациклина. Азициклин вводили в дозе 0,25г/10



кг массы животного с интервалом 24 ч пятикратно с водой натошак, эти данные вошли в проект инструкции к данному препарату.

Применение препарата Азициклина оказалось более эффективным, чем лечение по схеме, применяемой в хозяйстве. В подопытной группе терапевтический эффект препарата наблюдали у телят на второй и четвертый день выпаивания и зависел от степени тяжести течения (легкая, среднетяжелая и тяжелая). В группе животных с применением Азициклина процент сохранности был на 13,34 % больше по сравнению с группой животных, где применялась стандартная схема лечения. Препарат обеспечивает более раннее выздоровление и высокую сохранность животных.

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.

### 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) – полифазный анализ. 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: *M. bovis* (53,0%), *U. diversum* (38,0%), *C. fetus* (7,0%). 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, аллергического действия препарата Азициклина на животных.

10. Препарат Азициклин при остром бронхите и бронхопневмонии телят при 3-кратном введении в дозе 0,25 г на 10 кг 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 телят с болезнями органов дыхания.

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.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

На основании проведенных исследований по изучению оппортунистических инфекций крупного рогатого скота с применением автоматизированных микробиологических, протеомных и молекулярно-генетических технологий разработан ряд практических предложений для ветеринарных специалистов.

Метод MALDI-TOF-MS анализа рекомендуется для применения в рутинной практике ветеринарных лабораторий при видовой идентификации атипичных, труднодиагностируемых УПМ. Масс-спектрометрические исследования позволяют достоверно повысить качество видовой идентификации труднодиагностируемых, неферментирующих бактерий, коринебактерий и микроорганизмов с атипичными свойствами, изолированных от животных.

Впервые нами на региональном уровне для скрининговых исследований бактериальных болезней животных рекомендуется использование комплексных диагностических ПЦР-панелей в ветеринарных лабораториях, что позволит ветеринарным специалистам быстро и точно идентифицировать наиболее часто встречающиеся условно-патогенные микроорганизмы. Расширение спектра диагностических услуг с использованием инновационных технологий, дает возможность быстро и точно идентифицировать наиболее часто и редко встречающиеся условно-патогенные микроорганизмы, атипичных возбудителей респираторных, урогенитальных и маститных инфекций. Включение этапов секвенирования в схему лабораторной диагностики инфекций животных обеспечивает ускоренную идентификацию патогенных возбудителей как на этапе исследования чистых культур, так и анализа проб клинического материала.

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.

Выделенный штамм *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, депонирован в коллекции микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ» (регистрационный номер ВКШМ-Б-288М) и может быть использован в качестве антигена-штамма для изготовления биологических препаратов. *Campylobacter fetus subsp. fetus* был использован в качестве производственного штамма при изготовлении биологических препаратов.

В рутинную практику ветеринарных лабораторий предложены и внедрены методы контроля за механизмами антибиотикорезистентности с целью рациональной фармакотерапии животных, что позволит сократить необоснованное использование антибактериальных препаратов в ветеринарной медицине, получить качественную продукцию животноводства и ограничить распространение антибиотикорезистентности в животноводстве.

Для практических ветеринарных врачей животноводческих хозяйств предложены эффективные, рациональные схемы лечения и профилактики оппортунистических инфекций крупного рогатого скота. Материалы исследований комбинированного антимикробного препарата Азициклина использованы ООО НВЦ «Агроветзащита» для дальнейшей регистрации препарата, разработок, создания новых форм и модификаций препаратов.

#### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Использование методологических подходов к разработке и апробации диагностических панелей со стрипами для одновременной детекции *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Chlamidia spp.* и видовой идентификации микоплазм: *M.alkalescens*, *M. bovis genitalium*, *M. bovis*, *M. californicum* с целью выявления других видов патогенов оппортунистических инфекций в зависимости от эпизоотической ситуации; возможно конструирование и внедрение их в производство и работу практических ветеринарных лабораторий. Дальнейшая оптимизация тест-систем для детекции в микрочиповом формате не только *Campylobacter fetus*, а идентификация до подвида *Campylobacter fetus subsp. fetus* и *Campylobacter fetus subsp. veneralis* позволит увеличить процент обнаружения микроорганизмов и своевременно проводить противоэпизоотические мероприятия.

Полученные результаты позволят создать «карту микробной резистентности» оппортунистических микроорганизмов в ветеринарии и сельском хозяйстве Российской Федерации, ограничить распространение резистентности эпизоотологически и эпидемически значимых социально опасных микроорганизмов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, внесенных в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ

1. Бородина, В.А. Биологические свойства коринебактерий, изолированных из молока коров при мастите / В.А. Бородина, Л.И. Смирнова, А.А. Сухинин, С.А. Макавчик // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- 2020- №1- С. 60-63. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.1.60
2. 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. - №4 - С.36-40.
3. Макавчик, С.А. Фенотипические и генотипические характеристики антибиотикорезистентности микроорганизмов *Klebsiella spp.* / С.А. Макавчик, Л.С. Киреева // Проблемы медицинской микологии. - 2018 - Том 20 - №2 - С.89.
4. 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. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4.48
5. Макавчик, С.А. Гипермукоидные фенотипы *Klebsiella pneumoniae* и проблемы антибиотикотерапии сельскохозяйственных животных / С.А. Макавчик // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2019.- № 4.- С. 48-52.
6. 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
7. 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
8. Макавчик, С.А. Дифференциация *Mycoplasma bovis* и *Ureaplasma diversum* методом ПЦР в реальном времени / С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, Л.И. Смирнова, В.А. Кузьмин, Л.С. Фогель // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- 2020.-№3-С.61-64.
9. 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
10. 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. - № 4- С.41-47. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41
11. 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.
12. Сухинин, А.А. Испытания универсального лабораторного метода диагностики микоплазмозов животных / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, М.В. Виноходова, О.В. Прасолова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2015. - № 1. - С. 40-46.
13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.- 2020 г.- № 4 - С. 56-59. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.56

20. 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. - 2020 - № 4 - С. 62-66. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.62

**Статьи, опубликованные в журналах, включенных в международные базы цитирования Web of Science Core Collection**

21. **Makavchik, S.** Results of vaginal samples in cows in the post partum period/ S. Makavchik, A. Sukhinin, Y. Danko, V. Kuzmin, I. Belkina // Reproduction in Domestic Animals.- 2019. -V. 54.-№ 3 - С. 98.

**Статьи, опубликованные в сборниках научных трудов и материалах конференций**

22. 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 – СПб, 2015. - Р. 344.

23. 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» - Москва, 2015. - С. 59.

24. Сухинин, А.А. Мультиплексная ПЦР в реальном времени, как экспресс-метод лабораторной диагностики инфекционных болезней животных / А.А. Сухинин, **С.А. Макавчик**, О.В. Прасолова // Всероссийская научно-практическая конференция «Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии». - СПб, 2016. - С. 253-254.

25. **Makavchik, S.A.** Identification bovis bacteria by polymerase chain reaction and sequencing / **S.A. Makavchik**, A.A. Sukhinin, S.R. Abgaryan, I.V. Belkina // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2019. -V.10- №1- P. 2004-2012.
26. 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, A.V. Zabrovskaya, E.I. Prikhodko // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2019. - V.10.- №1.- P. 2013- 2020.
27. 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.

#### Патенты на изобретение

28. 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.
29. 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.
30. 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., Егорова С.А., Михайлов Н.В., Забровская А.В.- 4с.

#### Методические рекомендации

31. 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 // СПб.: ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017.- 23 с.
32. 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 // СПб.: изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017. – 17 с.
33. Методические рекомендации: Лабораторные методы диагностики инфекций, вызываемых *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Ureaplasma diversum*»/ **С.А. Макавчик**, А.Н. Ваганова, А.А. Сухинин, В.Н. Вербов, С.В. Борисенко, В.В. Рока //СПб.: изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2020.- 49 с.
34. Методические рекомендации: 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 / Э.Д. Джавадов, А.А. Сухинин, **С.А. Макавчик**, В.А. Кузьмин, Л.С. Фогель, Л.И. Смирнова, Д.А. Орехов // СПб, ФГБОУ ВО СПбГУВМ, 2021.- 35 с.

#### Монография

35. **Макавчик, С.А.** Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение антимикробных препаратов / С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, С.В. Енгашев, А.Л. Кротова - СПб.: изд-во ВВМ, 2021 г. – 152 с. : ил.