

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Конотоп Д.С., Семенов С.В.

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

Рациональное применение антибактериальных препаратов с учетом уровня биологической резистентности к бета-лактамам антибиотикам позволяет повысить эффективность лечебных мероприятий, сократить сроки лечения и ускорить выздоровление.

The reasonable application of antibacterial drugs with the biological resistance to beta-lactame antibiotics taken into consideration allows to increase the efficiency of treatment measures, reduce the length of the illness and accelerate the healing.

Введение. Антибиотикоустойчивость бактерий в настоящий момент является одной из наиболее важных и актуальных проблем в ветеринарии и медицине. Практически все известные науке бактерио-возбудители инфекционных болезней (за редким исключением) в большей или меньшей степени проявляют устойчивость к тем или иным антибактериальным препаратам.

С момента эпохального открытия пенициллина в 1928 г. возможность лечить и излечивать животных с инфекционной бактериальной патологией навсегда изменила ветеринарию и медицину, снизив процент заболеваемости и летальности. Пенициллин и его многочисленные производные доминировали среди других антибиотиков, демонстрируя беспрецедентный успех при лечении больных животных с бактериальной патологией по всему миру. Взяв бензилпенициллин за основу, фармацевты разработали ряд его производных с расширенным спектром активности, составивших класс т.н. бета-лактамов антибиотиков. Бета-лактамы – семейство антибиотиков, имеющих более 6 структурных разновидностей, каждая из которых включает 2-ацетидиноновое кольцо. Они проявили необычайно высокую активность против широкого спектра бактериальных патогенов, обладая при этом низкой (если не нулевой) токсичностью для клеток млекопитающих. Принято считать, что антибиотики бета-лактамовой группы (пенициллины, цефалоспорины) – самые удачные антибактериальные препараты с начала эры антибиотиков.

Тем не менее, за последние 60 лет частота и уровень устойчивости бактерий к бета-лактамам неуклонно возрастали, вплоть до настоящего момента, когда многие считают, что бета-лактамы вскоре окажутся неспособными бороться с тяжелыми бактериальными инфекциями. Устойчивость бактерий к бета-лактамам антибиотикам и ингибиторам бета-лактамаз – непрерывно растущая проблема, приводящая к снижению эффективности антибактериальных препаратов.

Антибиотикоустойчивость к любым антибактериальным препаратам, включая бета-лактамы, может быть обусловлена четырьмя основными механизмами: 1) предупреждением взаимодействия лекарства с его мишенью (как правило, вследствие обусловленных мутациями в соответствующих генах изменений структуры собственно белков-мишеней); 2) выбросом антибиотика из клетки; 3) непосредственным разрушением либо модификацией антибиотика (т.е. его ферментативной деградацией); и 4) снижением проницаемости наружной мембраны для антибиотиков, вызванным изменением структуры мембранных липополисахаридов и белков (поринов).

Применение бета-лактамов в большинстве случаев ограничено вследствие выработки бактериями бета-лактамаз. Выявлены 4 основных класса бета-лактамаз – А, В, С и D. Способность к продукции различных типов бета-лактамаз в разных концентрациях выявлена у множества бактерий, как грамположительных, так и грамотрицательных. Практически все бактерии способны синтезировать данные ферменты. Микроорганизмы могут иметь природную способность продуцировать бета-лактамазы благодаря наличию соответствующих генов в своей хромосоме, либо приобретают данную возможность после успешной трансдукции ДНК от другого микроорганизма (обычно в составе перевиваемых R-плазмид).

До настоящего времени антибиотикоустойчивость болезнетворных бактерий рассматривалась лишь как приспособительная реакция микроорганизмов. При этом исследователи традиционно не принимают во внимание, что организм человека и животных, со своей стороны, также небезразличен к введению антибиотиков. Антибиотики являются для макроорганизма чужеродными веществами, от которых он стремится освободиться, используя для этого разнообразные механизмы.

Феномен собственной бета-лактамазной активности крови оказался известен достаточно давно. Так, в 1972 г. группа исследователей компании GlaxoResearchLtd, изучая свойства недавно синтезированного ими же хромогенного цефалоспоринового нитроцефина («цефиназы»), описала значимый распад бета-лактамовой связи указанного антибиотика под воздействием сыворотки крови, причем было показано, что данное ее свойство опосредуется в первую очередь альбуминовой фракцией. Тем не менее, углубленное исследование данного феномена на тот момент не производилось, реакция была признана неспецифической и обнаруженное явление было забыто на многие годы.

В 2007 г. явление необычно интенсивного распада нитроцефина под воздействием сыворотки человеческой крови было независимо от других исследователей обнаружено научным коллективом под руководством В.М. Семенова [9]. В 2009 году ими установлено, что бета-лактамазная активность крови практически полностью опосредуется сывороточными альбуминами, и в значительно меньшей степени антиидеотипическими IgG.

Особняком стоит феномен формирования в организме иммуноглобулинов, обладающих бета-лактамазной активностью, т.н. «абзимов» (каталитических антител). Известно, что при продукции бакте-

риями бета-лактамаз данные ферменты воспринимаются макроорганизмом как полноценный чужеродный антиген. При этом происходит иммунизация организма с образованием антител первого порядка, что согласно теории иммунологических сетей Эрне делает возможным формирование каталитических антител (т.е. в организме на антитела первого порядка образуются антитела второго порядка). Данные антитела являются для системы иммунной памяти своего рода «действующими моделями антигенов в натуральную величину». Исследования, выполненные в ведущих научных лабораториях во многих странах, убедительно показали, что антитела могут вмешиваться в лиганд-рецепторные взаимодействия любой природы [1, 2, 3], то есть фактически способны выполнять функции любых молекул–трансммиттеров биологического регуляторного воздействия, а также ферментов (энзимов) [2, 6]. В ряде исследований было продемонстрировано наличие у антител ферментоподобной («абзимной») активности [4, 5, 7]. Таким образом, антитело второго порядка будет способно «имитировать» действие исходного антигена, т.е. проявлять соответствующую ферментативную активность, как и сами ферменты (бета-лактамазы).

Анализ представленных данных свидетельствует о том, что многие вопросы антибиотикорезистентности достаточно подробно отражены в иностранной научной литературе, и к сожалению, недостаточно полно в отечественной.

Установлено, что существенное значение в возникновении различных болезней, особенно в условиях промышленной технологии, имеет резистентная микрофлора. Назначение антибактериальных препаратов, к сожалению, чаще всего проводится безосновательно, часто лишь по терапевтическому эффекту. В результате этого проводимые лечебно-профилактические мероприятия малоэффективны, увеличивается время клинического выздоровления, снижается продуктивность, усиливается резистентность микроорганизмов к используемым антибактериальным препаратам.

В связи с этим в условиях промышленного животноводства возникает необходимость проведения мониторинга антибиотикорезистентности и рационального назначения антибиотиков с лечебной или профилактической целью. В Республике Беларусь данной проблемой вплотную занялись относительно недавно [8]. Есть данные обследования свиней (группа доращивания) и крупного рогатого скота (телята 1-6 месячного возраста, взрослые коровы с патологией конечностей). Животные других физиологических и половозрастных групп широкомасштабным исследованиям не подвергались.

Материалы и методы исследований. Обследованию подвергали животных, содержащихся в условиях молочно-товарного комплекса на 800 коров, содержание беспривязное, кормление с учетом физиологического состояния и продуктивности.

Для определения бета-лактамазной активности сыворотки крови крупного рогатого скота применяли тест-систему «БИОЛАКТАМ» (ООО «СИВитал», Республика Беларусь). В основе функционирования тест-системы «БИОЛАКТАМ» лежит хроматографическая методика, базирующаяся на изменении окраски синтетического антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина при распаде его бета-лактамной связи. При этом происходит батохромный сдвиг в хромофорной системе молекулы, и окраска реакционной смеси меняется с желтой на красно-оранжевую. Максимум поглощения продукта реакции меняется с 390 нм на 486 нм, что и делает возможным спектрофотометрическую детекцию.

Материал для исследования – сыворотка крови, которую получали от животных, в условиях молочно-товарного комплекса, согласно общепринятым правилам и методикам, с соблюдением правил асептики и антисептики. Свежеполученную кровь оставляли в теплом месте на 1-1,5 часа, для лучшего отделения сыворотки обводили сгусток крови тонкой спицей. Полученную сыворотку в течение 1-2 часов доставляли в лабораторию, используя термохолодильные емкости. При наличии осадка и форменных элементов применялось центрифугирование в угловой центрифуге при 3000 об/мин в течение 15 минут. Полученная сыворотка крови отсасывалась с помощью микропипеток в пробирки типа «Эппендорф» и сохранялась до момента проведения эксперимента в холодильной камере при температуре 5 ± 3 °С или помещалась в морозильную камеру при -20 °С, если постановка реакции не проводилась в течении рабочего дня.

Всего было отобрано 719 проб крови от взрослых коров и первотелок. С учетом зоотехнических показателей, продуктивности животных, физиологического состояния и наличия патологии, все животные дополнительно были разделены на группы:

- животные с акушерско-гинекологической патологией;
- сухостойные коровы;
- стельные коровы.

Дополнительно из общего поголовья выделили группу коров и первотелок, больных маститами.

Статистическую обработку цифрового материала проводили с помощью программы Microsoft Excel и других специализированных программ.

Результаты исследований. В результате обследования поголовья молочно-товарного комплекса у животных регистрировали различный уровень бета-лактамазной активности (таблица 56).

Таблица 56 – Оценка уровня бета-лактамазной активности взрослых коров и первотелок

	Уровень бета-лактамазной активности		
	нормальный	повышенный	высокий
Количество животных	285	360	62
Процент, %	40,31	50,92	8,77

Как видно из данных таблицы 1, суммарно **повышенный и высокий** уровень бета-лактамазной активности регистрировался у 422 животных, что составляет **59,69%**. При **повышенном** уровне бета-лактамазной активности следует назначать ингибиторзащищенные бета-лактамы (содержащие клавулановую кислоту) или антибактериальные препараты других фармакологических групп. При высоком уровне следует проводить замену бета-лактамов на другие антибиотики (макролиды, фторхинолоны и т.д.)

Нормальный уровень бета-лактамазной активности отмечался у 285 животных, что составляет 40,31%. Назначение данным животным бета-лактаманых антибиотиков целесообразно - терапевтическая эффективность будет высокой.

По результатам обследования животных с акушерско-гинекологической патологией суммарно высокий и повышенный уровень (таблица 57) регистрировался у 67 животных, что составляет 51,94%.

Таблица 57 – Оценка уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови животных с акушерско-гинекологической патологией

	Уровень бета-лактамазной активности		
	нормальный	повышенный	высокий
Количество животных	62	60	7
Процент, %	48,06	46,51	5,43

При исследовании материала от сухостойных коров и первотелок повышенный и высокий уровень отмечался у 55 животных, что составляет 42,97% (таблица 58).

Назначение данным животным бета-лактаманых антибиотиков нецелесообразно, терапевтическая эффективность будет низкой. Особенно это следует учитывать в послеродовой период при лечении акушерско-гинекологической патологии, часто возникающей после отёла.

Таблица 58 – Оценка уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови сухостойных коров и первотелок

	Уровень бета-лактамазной активности		
	нормальный	повышенный	высокий
Количество животных	73	51	4
Процент, %	57,03	39,84	3,13

Особый интерес представляет результат исследования стельных коров и первотелок. Животные данной группы ввиду их физиологического состояния (беременность) и уровня продуктивности (в основном средний или высокий) являются наиболее восприимчивыми к различным заболеваниям незаразной и заразной этиологии. Вследствие иммуносупрессии и высокого уровня обмена веществ иммунный статус организма снижается, и любые нарушения состояния здоровья требуют своевременного грамотного лечения. Чаще всего регистрируют нарушение обмена веществ или патологию молочной железы.

Результаты исследований приведены в таблице 59, из которой видно, что суммарно высокий и повышенный уровень бета-лактамазной активности регистрировался у 300 животных, что составляет 66,66%.

Таблица 59 – Оценка уровня бета-лактамазной активности у стельных коров и первотелок

	Уровень бета-лактамазной активности		
	нормальный	повышенный	высокий
Количество животных	150	249	51
Процент, %	33,34	55,33	11,33

В группе стельных коров и первотелок выявлено достаточно большое количество животных с высоким и повышенным уровнем бета-лактамазной активности, что свидетельствует о наличии в организме биологической резистентности к бета-лактаманым антибиотикам. Следовательно, для рационального назначения антибактериальных препаратов животных данной группы животных необходимо обязательно обследовать на бета-лактамазную активность.

В ходе проведения исследования животных, больных субклиническим маститом, на молочно-товарном комплексе процент заболеваемости коров был ниже, чем в целом по Республике Беларусь (20-27%) и составлял 9-10%, что свидетельствует о хорошей работе ветеринарных специалистов хозяйства. Однако при этом в результате обследования животных (таблица 60) высокий и повышенный уровень бета-лактамазной активности регистрировался у 42 животных, что составляет 71,19% (среди животных основного стада и первотелок процент соответственно составил 73,27% и 70,59%).

Таблица 60 – Оценка уровня бета-лактамазной активности у животных больных субклиническим маститом

	Уровень бета-лактамазной активности		
	нормальный	повышенный	высокий
Количество животных	17	34	8
Процент, %	28,81	57,63	13,56

Назначение данным животным бета-лактаманых антибиотиков, как основных препаратов, применяемых для лечения маститов, в таком случае будет нецелесообразно - терапевтическая эффективность будет низкой.

Заключение. В результате проведенного обследования крупного рогатого скота молочно-товарного комплекса установлено наличие большого количества животных со значительным уровнем биологической резистентности к бета-лактаманым антибиотикам (отмечался высокий и повышенный уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови). Достоверных различий по уровню биологической

резистентности (с учетом бета-лактамазной активности), связанных с условиями содержания, кормления, возрастом, физиологическим состоянием не выявлено. При этом, чаще всего высокий и повышенный уровень бета-лактамазной активности регистрировался у высокопродуктивных животных основного стада и больных субклиническим маститом коров.

Учитывая, что бета-лактамы являются основными в практической работе ветеринарных специалистов, особенно при лечении маститов, необходимо регулярно проводить профилактические мониторинговые исследования поголовья, результаты исследования регистрировать документально и учитывать при назначении антибактериальных препаратов для получения максимального терапевтического эффекта. Во всех случаях заболевания коров маститами целесообразно проводить исследование сыворотки крови на наличие резистентности для правильного и рационального назначения антибактериальных препаратов.

Литература. 1. Антиидиотипические и природные каталитически активные антитела / А.М. Шустер [и др.] // Мол.биол. – 1991. – Том 25, №3. – С. 17. 2. Ашмарин, И.П. Гипотеза об антителах как новейших регуляторах физиологических функций, созданных эволюцией / И.П. Ашмарин, И.С. Фрейдлин // Ж. эволюц. биохимии и физиол. – 1989. – Т. 25, №2. – С. 176-181. 3. Берзофски, Д.А. Взаимодействие антиген-антитело / Д.А. Берзофски, А.Д. Берковер. Под ред. У. Пола. // М.: Мир, 1989. – Том 3. – С. 5-88. 4. Взаимодействие каталитически активных антител с ДНК / А.М. Шустер [и др.] // Докл. АН СССР. – 1991. – Том 319, №6. – С. 1504-1507. 5. ДНК-гидролизующие IgG антитела из крови больных некоторыми инфекционными заболеваниями / Е.С. Одинцова [и др.] // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2006. – №2. – С. 49-55. 6. ДНК-специфические каталитические антитела в сыворотках крови человека / А.М. Шустер [и др.] // Докл. АН СССР. – 1991. – Том 318, №5. – С. 1262-1264. 7. Кит, Ю.Я. Существуют ли каталитические антитела у здоровых людей? / Ю.Я. Кит, Д.В. Семенов, Г.А. Невинский // Мол.биол. – 1995. – Том 29, №4. – С. 893-905. 8. Конопот, Д.С. Определение антибиотикорезистентности к бета-лактамам антибиотикам / Д.С. Конопот, С.В. Семенов // Инновации в ветеринарной медицине, биологии, зоотехнии: материалы 11-й международной конференции молодых ученых, Витебск, 24-25 мая 2012 г. / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2012. – С. 57. 9. Руководство по инфекционным болезням / Под общей редакцией В.М. Семенова // М.: ООО «МИА». – 2009. – 752 с.

Статья передана в печать 06.03.2013 г.

УДК: 619:616.98:579.842.11:615.371:632.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ДОЗЫ И СООТНОШЕНИЯ МОНОКОМПОНЕНТОВ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**** Ломако Ю.В., * Красочко П.П., ** Амосова Л.А., * Яромчик Я.П., ** Борисовец Д.С.**

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

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

Сконструирована ассоциированная вакцина для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят со следующим содержанием антигенов (микробных тел) в см³: E. coli A20 – 0,7 млрд., E. coli F41 – 1,0 млрд., E. coli K88 – 1,0 млрд., E. coli K99 – 1,5 млрд., Kl.pneumoniae – 1,0 млрд.

The associated vaccine against colibacillosis and klebsiellosis of calves with the following contents antigen (microbial cells) in cm³: E. coli Att20 (A20) - 0,7 mlrd., E. coli F41 - 1,0 mlrd., E. coli F4 (K88) - 1,0 mlrd., E. coli F5 (K99) - 1,5 mlrd., Kl.pneumoniae - 1,0 mlrd. constructed.

Введение. Среди инфекционных болезней острые желудочно-кишечные патологии у новорожденных телят имеют наибольшее распространение и наносят огромный экономический ущерб, слагаемый из потерь от гибели животных, затрат на проведение лечебных и ветеринарно-профилактических мероприятий.

Наиболее часто регистрируемыми причинами заболеваемости и падежа телят являются колибактериоз и клебсиеллез, которые зачастую протекают в ассоциации. Указанные болезни характеризуются высоким уровнем заболеваемости, которая в зависимости от условий кормления и содержания животных в первые дни жизни колеблется от 30 до 90%, а летальность составляет 31,5 - 38,5% [1, 6, 10].

Важное звено в мероприятиях по борьбе с колибактериозом и клебсиеллезом молодняка крупного рогатого скота занимает специфическая профилактика. Надежным и достаточно эффективным методом специфической профилактики при инфекционных энтеритах остается создание защиты слизистой оболочки кишечника телят с помощью материнских антител, содержащихся в молозиве коров. Иммунизация глубоководных коров и своевременная выпойка новорожденным телятам иммунного молозива, которое содержит специфические антитела, позволяет снизить заболеваемость и продолжительность болезни, значительно облегчает течение инфекционного процесса и сокращает падеж и вынужденный убой молодняка при данных болезнях [6, 8, 10]. Для специфической профилактики колибактериоза телят в Республике Беларусь ОАО «ВитУнифарм» выпускается вакцина поливалентная гидроокисьалюминиевая формолтиомерсальная против колибактериоза телят и ягнят, включающая эшерихий 13 O-серогрупп (O8, O9, O15, O20, O26, O41, O55, O78, O86, O101, O115, O117, O119). Вакцины с клебсиеллезным компонентом и адгезивными антигенами E. coli до недавнего времени в Республике Беларусь не выпускались. Высокий уро-