

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ И БАКТЕРИЦИДНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НАНО- И КОЛЛОИДНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА****Красочко П.А., Корочкин Р.Б., Понаськов М.А.**

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

Препараты на основе наночастиц серебра находят все большее применение в качестве антибактериальных препаратов, однако их ингибирующие и бактерицидные концентрации нуждаются в постоянном уточнении, так как активность этих препаратов зависит от многих переменных величин (степени дисперсности, размера наночастиц, штамма микроорганизма и др.). Кроме того, определение их точных величин позволяет оценить безопасность применения с точки зрения их токсичности. **Ключевые слова:** наночастицы, серебро, антибактериальная активность, тестовый микроорганизм, минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная концентрация.

**DETERMINATION OF THE MINIMUM INHIBITING AND BACTERICIDE CONCENTRATION OF NANO- AND COLLOID PARTICLES OF SILVER****Krasochko P.A., Korachkin R.B., Ponaskov M.A.**

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Compounds based on silver nanoparticles are increasingly used as anti-bacterial preparations. However, minimum inhibitory and bactericidal concentrations of silver nanoparticles require constant refinement, since their activity depends on many variables (degree of dispersion, size of nanoparticles, strain of microorganism, etc.). In addition, the determination of their exact values makes it possible to assess the safety of use in terms of their toxicity. **Keywords:** nanoparticles, silver, antibacterial activity, test microorganism, minimal inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration.

**Введение.** Серебро использовалось человечеством в медицине в течение тысячелетий. Еще Гиппократом было описано использование серебряного порошка для заживления ран и лечения язв [4], и в медицине соединения серебра играли ключевую роль в качестве антимикробного агента вплоть до появления антибиотиков. После открытия антибиотиков в 1940-х годах использование солей серебра в качестве противомикробного вещества существенно сократилось, хотя его соединения продолжали использоваться в некоторых биомедицинских областях, особенно при лечении ожогов [6]. Серебро, по сравнению с другими металлами, более токсично для микроорганизмов в следующей нисходящей последовательности: серебро (Ag) > ртуть (Hg) > медь (Cu) > кадмий (Cd) > хром (Cr) > свинец (Pb) > кобальт (Co) > золото (Au) > цинк (Zn) > железо (Fe) > марганец (Mn) > молибден (Mo) > олово (Sn) с относительно низкой токсичностью для клеток млекопитающих. Другим преимуществом использования серебра в качестве противомикробного компонента является невысокая вероятность развития микробной резистентности по сравнению со многими другими антимикробными веществами [3].

В настоящее время наноразмерные материалы стали широко использоваться в качестве новых антимикробных агентов из-за высокого соотношения площади поверхности к занимаемому объему, а также благодаря уникальным биоцидным свойствам [5]. Кроме того, препараты на основе нано- и коллоидных частиц серебра рассматриваются как малотоксичные и экологически безопасные препараты с широким спектром действия и практически полным отсутствием потенциала к появлению резистентных микроорганизмов в отличие от антибиотикотерапии. Наши предыдущие исследования показали высокую антибактериальную активность нано- и коллоидных частиц серебра на грамположительные и грамотрицательные бактерии, такие как золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), кишечная палочка (*Escherichia coli*), синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), сальмонелла (*Salmonella enterica*) и клебсиелла (*Klebsiella pneumoniae*).

В большинстве случаев для оценки антибактериального действия веществ используются обычные микробиологические тесты, такие как метод диффузии в агар и методика определения минимальной ингибирующей концентрации препарата. Первый из них находит большее предпочтение использования из-за меньшей трудоемкости процесса. Все же, диффузионный метод, также известный как метод Кирби-Бауэра, считается полуколичественным методом оценки антибактериальной активности, так как диаметр зоны ингибирования роста микроорганизма зависит не только от чувствительности микроорганизма, но также от степени растворимости и диффузии тестируемого вещества. Непосредственный контакт между микроорганизмом и антибактериальным веществом оценивается прямыми тестами, не зависящими от диффузионных свойств вещества. Метод определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) основан на серийных разведениях раствора препарата с целью определения его наименьшей концентрации, которая демонстрирует антибактериальную активность.

Настоящее исследование было направлено на оценку антибактериального действия наночастиц серебра на тестовые микроорганизмы различных видов по определению минимальной ингибирующей

(МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК).

**Материалы и методы исследований.** В опытах по оценке МИК и МБК наночастиц серебра использовали изготавливаемый ЗАО «Концерн «Наноиндустрия» Института нанотехнологий МФК (Российская Федерация) образец препарата AgБион-2, содержащий наночастицы серебра, гидродинамический диаметр которых лежит в пределах 3–16 нм, а пик кривой распределения размеров дисперсных частиц приходится на диапазон 11–12 нм. Для изучения антимикробной активности наночастиц серебра были использованы пять бактериальных штаммов, в отношении которых определяли минимальную ингибирующую и минимальную бактерицидную концентрации: *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica subsp. enterica* ATCC BAA-2162, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902.

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли, используя стандартный 96-луночный планшет для постановки иммуноферментного анализа с бульоном Мюллера-Хинтона, где штаммы микроорганизмов (концентрация  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл или 0,5 единиц по стандарту МакФарланда) в объеме 100 мкл смешивали с равным объемом коллоидного раствора наночастиц серебра в концентрациях от 60 до 10 мкг мл<sup>-1</sup>. После смешивания конечные концентрации наночастиц серебра в смеси составляли от 30 до 5 мкг мл<sup>-1</sup> соответственно. Требуемые концентрации наночастиц серебра получали путем разведения исходного раствора препарата «AgБион-2», в котором концентрация наночастиц составляет 300 мкг мл<sup>-1</sup>.

Положительный контроль в нашем исследовании представлял собой бульонную среду с бактериальными культурами, а отрицательный контроль содержал только стерильный бульон. Время и температура инкубации в аэробных условиях составляли 24 ч и 37°C, соответственно. Минимальная ингибирующая концентрация рассматривалась как самая низкая концентрация наночастиц серебра, которая ингибировала рост микроорганизмов на 99%. Ее определяли по визуальной мутности пробирок до и после инкубации, причем опыт был повторен в четырех сериях, чтобы установить точную величину значения МИК в отношении тестируемых бактерий.

После определения МИК наночастиц серебра, аликвоты по 100 мкл из всех пробирок, которые не демонстрировали видимого бактериального роста, высевали в чашки с агаром Мюллера-Хинтона без содержания наночастиц серебра с последующей инкубацией в течение 24 часов при 37°C. МБК определяли по наличию или отсутствию роста бактерий в чашках с агаром после инкубации. Конечную МБК определяли как самую низкую концентрацию наночастиц серебра, которая убивала 99,9% начальной бактериальной популяции.

**Результаты исследований.** На предыдущем этапе исследования путем диффузионного метода нами было установлено, что ингибирующая концентрация препарата AgБион-2 лежит в диапазоне разведений 1:10–1:100. В связи с тем, что в исходном растворе препарата содержится приблизительно 300 мг/л или 300 мкг/мл наночастиц серебра, нами были приготовлены его разведения, которые содержали необходимые для опыта концентрации наночастиц.

После 24 часов инкубации смеси бактериальных культур и наночастиц серебра в разных разведениях в аэробных условиях при 37°C проводили учет роста по визуальной регистрации мутности бульона. Минимальная ингибирующая концентрация была определена как самая низкая концентрация наночастиц, которая ограничивала визуальный рост бактерий в культуральной среде. После инкубации было отмечено отсутствие роста всех тестовых культур бактерий с наночастицами серебра в концентрации в диапазоне от 20 до 30 мкг мл<sup>-1</sup>. Концентрация наночастиц серебра в 5 мкг мл<sup>-1</sup> оказалась недостаточной для ингибирования роста тестовых бактериальных культур, что определялось визуально по появлению мутности бульона. Концентрации наночастиц серебра от 10 до 15 мкг мл<sup>-1</sup> давали переменный рост бактериальных культур, что позволило рассчитать МИК наночастиц серебра для каждого тестового микроорганизма. Более подробно результаты проведенных исследований изложены в таблицах 1–5.

**Таблица 1 - Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации наночастиц серебра в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

Серия	Концентрация наночастиц серебра (разведения препарата AgБион-2)				
	30 мкг/мл (1:10)	20 мкг/мл (1:15)	15 мкг/мл (1:20)	10 мкг/мл (1:30)	5 мкг/мл (1:60)
Серия 1	-	-	-	-	+
Серия 2	-	-	-	-	+
Серия 3	-	-	-	-	+
Серия 4	-	-	-	-	+
Соотношение отсутствие/наличие роста	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	4/4 (100%)

Примечания: «-» – визуальное отсутствие роста микроорганизма; «+» – визуальный рост микроорганизма.

**Таблица 2 - Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации наночастиц серебра в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922**

Серия	Концентрация наночастиц серебра (разведения препарата AgБион-2)				
	30 мкг/мл (1:10)	20 мкг/мл (1:15)	15 мкг/мл (1:20)	10 мкг/мл (1:30)	5 мкг/мл (1:60)
Серия 1	-	-	-	+	+
Серия 2	-	-	+	+	+
Серия 3	-	-	+	+	+
Серия 4	-	-	+	+	+
Соотношение отсутствие/наличие роста	0/4 (0%)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)

Примечания: «-» – визуальное отсутствие роста микроорганизма; «+» – визуальный рост микроорганизма.

**Таблица 3 - Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации наночастиц серебра в отношении *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603**

Серия	Концентрация наночастиц серебра (разведения препарата AgБион-2)				
	30 мкг/мл (1:10)	20 мкг/мл (1:15)	15 мкг/мл (1:20)	10 мкг/мл (1:30)	5 мкг/мл (1:60)
Серия 1	-	-	-	+	+
Серия 2	-	-	+	+	+
Серия 3	-	-	-	+	+
Серия 4	-	-	+	+	+
Соотношение отсутствие/наличие роста	0/4 (0%)	0/4 (0%)	2/4 (50%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)

Примечания: «-» – визуальное отсутствие роста микроорганизма; «+» – визуальный рост микроорганизма.

**Таблица 4 - Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации наночастиц серебра в отношении *Salmonella enterica subsp. enterica* ATCC BAA-2162**

Серия	Концентрация наночастиц серебра (разведения препарата AgБион-2)				
	30 мкг/мл (1:10)	20 мкг/мл (1:15)	15 мкг/мл (1:20)	10 мкг/мл (1:30)	5 мкг/мл (1:60)
Серия 1	-	-	-	-	+
Серия 2	-	-	-	+	+
Серия 3	-	-	-	-	+
Серия 4	-	-	-	+	+
Соотношение отсутствие/наличие роста	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (100%)	2/4 (50%)	4/4 (100%)

Примечания: «-» – визуальное отсутствие роста микроорганизма; «+» – визуальный рост микроорганизма.

**Таблица 5 - Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации наночастиц серебра в отношении *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902**

Серия	Концентрация наночастиц серебра (разведения препарата AgБион-2)				
	30 мкг/мл (1:10)	20 мкг/мл (1:15)	15 мкг/мл (1:20)	10 мкг/мл (1:30)	5 мкг/мл (1:60)
Серия 1	-	-	+	+	+
Серия 2	-	-	+	+	+
Серия 3	-	-	-	+	+
Серия 4	-	-	+	+	+
Соотношение отсутствие/наличие роста	0/4 (0%)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)

Примечания: «-» – визуальное отсутствие роста микроорганизма; «+» – визуальный рост микроорганизма.

Исходя из полученных данных ингибирующей активности наночастиц серебра, нами были математически определены МИК путем вычитания интерполированного значения разницы данных из

логарифмированного значения концентрации, дающей положительный ингибирующий эффект в более, чем 50% случаев по формуле Рида и Менча. МИК имела наименьшее значение для *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Salmonella enterica subsp. enterica* ATCC BAA-2162, составляя 7,1 и 8,65 мкг/мл соответственно. Для остальных тестовых микроорганизмов она принимала более высокие значения: для *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902 и *Escherichia coli* ATCC 25922 — 13,1 мкг/мл, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 — 14,2 мкг/мл.

После определения МИК наночастиц серебра мы попытались установить значения МБК наночастиц серебра для каждого из тестовых микроорганизмов. С этой целью из лунок, где отсутствовал видимый рост бактериальных культур, был осуществлен пересев на плотную питательную среду Мюллера-Хинтона, не содержащую наночастиц серебра. После инкубирования при 37°C в течение 24 часов производили просмотр посевов с целью обнаружения видимого роста. Результаты наблюдений представлены в таблице 6.

Результаты исследований демонстрировали отсутствие роста во всех посевах из бульонных культур, где отмечалось их ингибирование под действием различных концентраций наночастиц серебра. Таким образом, согласно нашим исследованиям минимальные ингибирующие и бактерицидные концентрации наночастиц серебра для тестовых микроорганизмов совпадают и соответствуют друг другу. Данный результат может быть объяснен длительным характером воздействия наночастиц серебра на бактериальные клетки при отсутствии механизмов адаптации к их токсическому эффекту. Предполагается, что в основе механизма антибактериального действия наночастиц серебра является постоянное высвобождение ионов серебра из наночастиц, в результате чего токсический эффект не может быть преодолен бактериями во времени.

**Таблица 6 - Результаты определения минимальной бактерицидной концентрации на плотном агаре**

Концентрация наночастиц серебра в бульоне	Рост тестовой культуры на агаре (наличие роста/количество проб)				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	<i>Salmonella enterica</i> ATCC BAA-2162	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 902
30 мкг/мл	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
20 мкг/мл	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
15 мкг/мл	0/4	0/1	0/2	0/4	0/1
10 мкг/мл	0/4	отсутств.	отсутств.	0/2	отсутств.
5 мкг/мл	отсутств.	отсутств.	отсутств.	отсутств.	отсутств.

Примечание. Отсутств. – посев с бульона на агар не производился.

Полученные нами результаты также позволяют провести предварительную оценку коллоидных растворов наноразмерных частиц серебра с точки зрения биологической опасности. Как известно, хроническое отравление организма серебром приводит к развитию патологического состояния, известного как аргириоз или аргирия (в организме человека оно возникает при накоплении более 1 г серебра). Тем не менее, токсичность соединений серебра сильно отличается от его агрегатного состояния. Наиболее токсичным признано ионное серебро, представленное в основном растворимыми в воде солями. По этой причине ВОЗ рассматривает нитрат серебра как наиболее токсичное его соединение (разовая доза более 10 граммов считается смертельной для человека) [2], поэтому его содержание в питьевой воде регулируется санитарными нормами: для Республики Беларусь и Российской Федерации величина содержания растворимых солей серебра не должна превышать норму в 0,05 мг/дм<sup>3</sup> [1]. По этой же причине ионное серебро проявляет наибольшую бактериостатическую активность, и в отчете ВОЗ минимальная ингибирующая концентрация нитрата серебра определяется показателем в 150 мкг/л. С другой стороны, металлическое серебро обладает минимальной токсичностью для организма. Токсичность коллоидного серебра на организм человека до сих пор полностью не изучена. В отчетах ВОЗ [2] приводятся данные по исследованию влияния наночастиц серебра размером 5–10 нм и 25–40 нм в коллоидном растворе (10 мкг/мл и 32 мкг/мл, соответственно) на организм человека. После 14-дневного воздействия наночастиц различного размера в количестве 150 мкг/день и 480 мкг/день, соответственно, не было обнаружено никаких нарушений при клиническом, биохимическом, гематологическом и урологическом анализе. Таким образом, в ходе наших исследований было подтверждено, что минимальные ингибирующие концентрации наночастиц серебра в коллоидных растворах находятся в пределах зоны безопасности для применения *in vivo*.

**Закключение.** 1. Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц серебра для *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica subsp. enterica* ATCC BAA-2162, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 составляет 7,1 мкг/мл, 8,65 мкг/мл, 13,1 мкг/мл, 13,1 мкг/мл и 14,2 мкг/мл соответственно. 2. Минимальные ингибирующие и бактерицидные концентрации наночастиц серебра в коллоидном растворе приблизительно

соответствуют друг другу. 3. Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц серебра лежит в пределах зоны биологической безопасности для применения *in vivo*.

**Литература.** 1. *Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Санитарные правила и нормы : СанПиН 10-124 РБ 99. – Введ. 19.10.1999. – Минск, 2000. – 48 с.* 2. *Alternative drinking-water disinfectants: silver / World Health Organization. – Geneva, 2018. – 96 p.* 3. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. S. Kim [et al.] // Nanomedicine. – 2007. – Vol. 3. – P. 95–101.* 4. *Klassen, H. J. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. Early uses / H. J. Klassen // Burns. – 2000. – Vol. 26, Issue 2. – P. 117–130.* 5. *Morones, J. R. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J. R. Morones // Nanotechnology. – 2005. – Vol. 16, Number 10. – P. 2346–2353.* 6. *Zhao, G. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion / G. Zhao, S. E. Stevens Jr. // Biometals. – 1998. – Vol. 11, Issue 1. – P. 27–32.*

Статья передана в печать 02.10.2019 г.

УДК 619:616.98:[578.823.91+579.842.11]:632.2:612.117:615.37

#### ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС У КОРОВ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ АССОЦИИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ

Красочко П.А., Яромчик Я.П., Синица Н.В.

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

*В статье приведены результаты гематологических исследований после применения экспериментальных образцов ассоциированных вакцин против вирусно-бактериальных энтеритов телят. Ключевые слова: вакцина, крупный рогатый скот, показатели крови.*

#### HEMATOLOGICAL STATUS IN COWS AFTER USE OF ASSOCIATED VACCINES AGAINST INFECTIOUS ENTERITIS OF CALVES

Krasochko P.A., Yaromchik Y.P., Sinitza N.V.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*The article presents the results of hematological studies of cow blood after the use of experimental samples of associated vaccines against viral-bacterial enteritis of calves. Keywords: vaccine, cattle, blood counts.*

**Введение.** Интенсивные технологии, на основе которых базируется современное животноводство, сопровождаются рядом проблем по адаптации крупного рогатого скота к условиям их содержания и кормления. Для специалистов агропромышленного комплекса основной задачей является не только получение высококачественной продукции, но и уменьшение непроизводительного выбытия животных. В патологии молодняка крупного рогатого скота наибольшее распространение получили так называемые факторные болезни, которые наносят большой экономический ущерб животноводческой отрасли стран [3, 5, 7, 9, 10].

Согласно данным ряда исследователей, рота- и коронавирусная инфекция, вирусная диарея, эшерихиоз и сальмонеллез получили значительное распространение в сельскохозяйственных организациях, что подтверждается данными ветеринарной отчетности по результатам вирусологических и бактериологических исследований, проведенных ветеринарными диагностическими учреждениями. Чаще всего у больных и павших телят регистрируется ассоциативное течение болезней инфекционной этиологии [1, 5, 7].

В комплексе мероприятий по профилактике и недопущению распространения инфекционных болезней крупного рогатого скота наибольшее значение уделяют проведению специфической профилактики против вирусно-бактериальных пневмоэнтеритов, проводя вакцинацию сухостойных коров, нетелей и молодняка, что позволяет снизить процент заболеваемости и летальности получаемого молодняка [4, 8, 11].

Практически в каждом животноводческом предприятии Республики Беларусь проводится иммунизация животных по утвержденным руководителями организаций и главными ветеринарными врачами схемам противоэпизоотических мероприятий. Для проведения вакцинаций против наиболее распространенных инфекционных патологий желудочно-кишечного тракта у крупного рогатого скота используют широкий спектр вакцин, выбор применения которых проводится в зависимости от эпизоотической ситуации в области, районах или в хозяйствах, а также с учетом их эффективности и стоимости. Несмотря на проводимые меры, превентивные показатели применяемых вакцин не всегда соответствуют ожидаемым результатам. Недостаточная эффективность специфической профилактики факторных болезней обусловлена тем, что вакцинация стельных коров зачастую проводится без учета этиологической структуры возбудителей. В связи с этим, ряд болезней вирусно-бактериальной