

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУРСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ  
АКАДЕМИЯ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА И.И.ИВАНОВА»

*На правах рукописи*

**Тагирмирзоев Багир Маилович**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ  
СРЕДСТВ И СПОСОБОВ ПРОФИЛАКТИКИ  
И ЛЕЧЕНИЯ МАСТИТА У КОРОВ**

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
**на соискание ученой степени**  
**кандидата ветеринарных наук**

Научный руководитель:  
доктор ветеринарных наук  
профессор Евглевский Ан.А.

Курск – 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ .....	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
2.1. Структура и функция молочной железы у коров .....	10
2.2. Причины возникновения, способы и средства лечения коров, больных маститом .....	14
2.3. Влияние гео- и электромагнитного воздействия на биологические свойства микроорганизмов .....	20
2.4. Виды стафилококков и их свойства .....	23
2.5. Физиология микроорганизмов и питательные среды для выращивания стафилококков .....	27
2.6. Научно-практические аспекты получения и применения иммуно- биологических препаратов .....	30
2.7. Стафилококковые токсино-аллергены и способы получения и применения анатоксин-вакцин .....	37
2.8. Антимикробные препараты, механизм действия, основы антибиотикоустойчивости и перспективы повышения их эффективности .....	42
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	48
3.1. Материалы и методы исследований .....	48
3.2. Изыскание рационального состава синтетической питательной среды для выращивания стафилококков .....	55
3.3. Получение плотной питательной среды с 2,5 % агара для определения чувствительности стафилококков к антибиотикам ..	59
3.4. Результаты получения и применения стафилококковой анатоксин-вакцины .....	60

3.5. Результаты повышения биоцидной эффективности тетрациклина и офлоксацина при лечении коров, больных маститом .....	70
3.6. Мониторинг чувствительности стафилококков к производственным и экспериментальным тетрациклину и офлоксацину.....	74
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	79
5. ВЫВОДЫ .....	90
6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ .....	92
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	93
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	117

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**СAB** – стафилококковая анатоксин-вакцина

**S.aureus** – золотистый стафилококк

**E. coli** – кишечная палочка

**ДМСО** – диометилсульфоксид

**УВЧ** – электромагнитные волны ультравысоких частот

**БГЦ** – биогеоценоз, ячейка биосферы

**ГМА** – геомагнитная активность

**КМА** – Курская магнитная аномалия

**СПС** – синтетическая питательная среда

**МПБ** – мясопептонный бульон

**МПА** – мясопептонный агар

**ИБП** – иммунобиологические препараты

**ЭМИ** – электромагнитное излучение

**ЭМВ** – электромагнитное воздействие

**КПС** – коагулазоположительные стафилококки

**КОС** – коагулазоотрицательные стафилококки

**МКГ** – микрограмм, одна тысячная мг

**ГА** – глутаровый альдегид

**АДБАХ** – алкилдиметилбензиламмония хлорид

**МГ** – миллиграмм (1000 мкг)

**МПК** – минимальная подавляющая концентрация

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Многообразие видов и свойств стафилококков, стрептококков, *E.coli*, коринебактерий, *Ps. aeruginosa*, микоплазмы, плесневые грибы и поражения ими органов, тканей и в частности молочной железы коров являются одной из сложных проблем, стоящих перед наукой и практикой.

Получение качественного молока зависит от породы крупного рогатого скота, условий содержания, кормления, доения, соблюдения комплексной программы борьбы с маститом (гр. *mastos* – грудь, сосок) с использованием эффективных экологически безопасных средств профилактики и лечения больных коров.

Импорт дешевого сухого молока и заменителей (пальмовое, кокосовое масло), низкий технологический и технический уровень многих предприятий молочного скотоводства, превалирующий поток импортных диагностических, профилактических и терапевтических препаратов способствуют сокращению срока использования коров, снижению качества и увеличению себестоимости молока.

Соблюдение общепринятых нормативных показателей содержания в молоке до 500 тыс/мл соматических клеток и бактериальной обсемененности не более 150 тыс/мл способствует получению доброкачественного молока и молочных продуктов.

Для диагностики субклинических форм мастита с определением концентрации соматических клеток в основном используют два препарата, содержащие поверхностно-активные вещества – димастин с индикатором фенолрот и мастидин с бромкрезолпурпуром с использованием молочно-контрольных пластинок и подсчет соматических клеток под микроскопом.

Для профилактики инфицирования вымени у коров в сухостойный период используют интрацистернальное введение антибиотиков для закрытия отверстия соска и защиты проникновения микроорганизмов в вымя до 100 дней.

Изучено, что к основным антибиотикам проявляется резистентность у *S.aureus* до 60-70 %. Использование одних антибиотиков с другими, внесение в их состав клавулановой кислоты, органических кислот, Трилона-Б, аргинина, колистина, пиперазинового радикала, фтора не обеспечивает качественного прорыва в преодолении антибактериальной резистентности микроорганизмов.

Необходимы иные научно-обоснованные подходы повышения биоцидной и лечебной эффективности антибиотиков (Поздеев О.К., 2010; Податская Е.Н., 1998).

В связи с запретом наличия антибиотиков в молоке возникает необходимость разработки биоцидных и лечебных средств без антибиотиков и соответствующих биопрепаратов.

С учетом воздействия внешних факторов на биологические и эволюционно сложившиеся свойства микроорганизмов целесообразно использовать инактивированные стафилококковые или стафилострептококковые анатоксин-вакцины с выращиванием микроорганизмов на синтетических питательных средах вместо МПГБ и эффективных детоксикаторов и полимеризаторов комплекса токсино-аллергенов вместо канцерогенного формальдегида и ртутьсодержащего консерванта – мертиолята и повышения эффективности антибиотиков (Безгин В.М., 2011; Самуйленко А.Я., 2005, 2007; Воробьев А.А., 1999).

Исходя из актуальности были определены цель и задачи исследований.

**Цель работы.** Целью научных исследований явилось совершенствование жидкой минеральной питательной среды для

выращивания стафилококков, изыскание новых детоксикаторов и полимеризаторов при изготовлении стафилококковой анатоксин-вакцины и повышения биоцидных и лечебных свойств тетрациклина и офлоксацина для профилактики и лечения коров, больных маститом.

Для выполнения поставленной цели определены **следующие задачи:**

1. Усовершенствовать жидкую и плотную с 2,5 % агаром минеральную питательную среду для выращивания и способов выделения *S.aureus*;
2. Разработать рациональную технологию получения стафилококковой анатоксин-вакцины;
3. Определить способы применения стафилококковой анатоксин-вакцины для профилактики и лечения коров, больных маститом;
4. Изучить биоцидные и лечебные свойства глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом отдельно и с тетрациклином и офлоксацином в отношении *S.aureus* и коров, больных маститом.

**Научная новизна исследований.** Впервые повышено биоцидное и лечебное действие тетрациклина и офлоксацина в отношении лабораторных и свежевыделенных *S.aureus* от коров, больных маститом.

Определена терапевтическая эффективность экспериментальных тетрациклина и офлоксацина при лечении коров, больных разными формами маститов. Впервые повышение биоцидного действия антибиотиков достигнуто полимеризацией 0,2 % формальдегидом или 0,1 % глутарового альдегида с 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлоридом, а на вазелиновой основе эффективность лечения коров, больных маститом.

В последующем на основе биоцидных свойств глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом были изготовлены и успешно апробированы мази, гели без антибиотиков с учетом того, что глутаровый альдегид при биоразложении составляет более 90 % и обладает повышенными биоцидными свойствами.

Приоритет новизны научных исследований подтвержден получением патента №2468078 от 27.11.2012 г., докладами на 3-х международных научно-практических конференциях (2012, 2013, 2014 гг.) и публикациями 13 статей в журнале Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии, который рекомендован ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертации.

**Практическая значимость исследований.** Определен мониторинг *S.aureus* на чувствительность к антибиотикам, выделенных из молока и сосков пораженных вымени у коров, больных маститом и лабораторных и свежевыделенных *S.aureus* в регионе с повышенным геомагнитным полем.

Установленная повышенная устойчивость *S.aureus* к температуре, хлорамину и чувствительность к глутаровому альдегиду, алкилдиметилбензиламмония хлориду целесообразно учитывать при терапии больных животных и проведения ветеринарно-санитарных мероприятий.

На основе детоксицирующих и полимеризирующих свойств глутарового альдегида, формальдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом изготовлены и апробированы в молочных комплексах и на ферме УЧХОЗа «Знаменское» Курской ГСХА ряд экспериментальных серий стафилококковой анатоксин-вакцины для профилактики и лечения коров, больных маститом. Установленная биоцидная эффективность стафилококковой анатоксин-вакцины явилась обоснованием использования ее лечебных свойств.

Использование биоцидных и полимеризирующих свойств глутарового альдегида отдельно и с четвертичным аммониевым соединением позволило повысить биоцидные и лечебные свойства антибиотиков на мазевой основе при лечении коров, больных маститом, а в последующем эффективной лекарственной формы без антибиотиков. Полученные результаты научных исследований создают перспективу в



решении комплексной программы борьбы с маститом коров, увеличения сроков использования коров и получение доброкачественной молочной продукции и здоровых телят.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты разработки и апробации жидкой и плотной минеральной питательной среды для выделения и выращивания *S.aureus*;
2. Способ и средства выделения чистой культуры стафилококков;
3. Материалы изыскания рациональной технологии получения и применения стафилококковой анатоксин-вакцины;
4. Биоцидные и лечебные свойства глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом отдельно и с тетрациклином или офлоксацином в отношении *S.aureus* и коров, больных маститом.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации были изложены на трех международных научно-практических конференциях с публикацией докладов.

**Публикация результатов исследований.** По материалам диссертации опубликовано 10 научных статей, из них 6 в журналах ВАК РФ, и получен 1 патент на изобретение.

**Объем и структура диссертации.** Материалы диссертации изложены на 116 страницах в компьютерном исполнении, включают общую характеристику работы, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение, выводы, практические предложения, список литературы содержит 218 источников, в том числе 95 зарубежных авторов и приложения. Диссертация содержит 11 таблиц и 7 рисунков.

## 2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Структура и функции молочной железы у коров

У коров вымя или молочная железа состоит из двух половин и четырех долей – передней и задней с автономной системой молоковыводящих каналов и сосками.

Вымя состоит из железистой и соединительной тканей, кровеносных и лимфатических сосудов и нервов.

Паренхима молочной железы состоит из отдельных долек с пузырьками и трубочками, артериальные и венозные клапаны образуют густую сеть вокруг каждой альвеолы. От альвеол отходят трубочки, которые образуют молочные каналы и молочные ходы с выводом в молочную цистерну и выменный и сосковый отделы. Молочный сосок состоит из цистерны, канала, соединительной и мышечной ткани, кожи [28, 105, 119].

Длина сосков вымени составляет 4–10 см, а верхушка заканчивается сфинктером соскового канала, который всегда закрыт. Функция соскового сфинктера предохраняет проникновение микроорганизмов после доения и при переводе коров в сухостойный период без необходимости введения препаратов Орбисил, содержащий висмут субнитрат [48, 51, 182].

Естественно возникает вопрос о целесообразности создания искусственной или имитации естественной кератиновой пробки во время сухостойного периода для механического закрытия отверстия соска путем введения предлагаемых препаратов [27, 30, 197].

Упор на необходимость формирования искусственного барьера в отверстии соскового канала в определенной степени нарушает функцию сфинктера соска [87, 187, 191].

Важную роль играет отток крови от вымени по наружным, поверхностным и внутренним срамным венам и подкожной брюшной (молочной) вене. Отходящая от вымени молочная вена визуально просматривается под кожей в области мечевидного отростка грудной кости, впадает в грудную полость через отверстие, называемое молочным колодцем. По размеру молочного колодца оценивают молочную продуктивность коровы.

Функция молочной железы проявляется во время беременности интенсивным образованием молочных ходов, долек и альвеол, молокообразованием, накоплением молока в вымени и выведением во время доения [32].

Секреция и выведение молока регулируется нервной системой и гормонами желтого тела, передней доли гипофиза фолликулином, выделяемой плацентой.

Молоко из долек, альвеол, протоков вымени поступает в молочные ходы и цистерну вымени. Образующийся задней долей гипофиза окситоцин вместе с кровью поступает в ткани вымени, вызывает сокращение альвеол и мелких протоков и выведение молока из них.

В целом процесс выделения окситоцина в кровь составляет 5-7 минут для обеспечения рефлекса выведения молока за указанный период времени.

Изучено, что после отела (родов) под влиянием передней доли гипофиза гормона пролактина происходит секреция молозива в течение 5-8 дней, а затем вырабатывается обычное молоко [13, 49, 196].

Молозиво содержит больше белков и, соответственно, иммунных тел (антител), близким к белкам крови. В молозиве содержится много минеральных солей, витаминов, ферментов, гормонов, лизоцимы.

Следует учитывать роль молозива в выращивании здоровых телят, устойчивых к микроорганизмам. Для исследования оптимального уровня и

видов антител в организме образуются антитела, способные блокировать рецепторы вирусов, бактерий.

В зависимости от источника и механизма образования иммунитет подразделяется на искусственный и естественный, а каждый из них на активный и пассивный. Естественный или постинфекционный активный иммунитет возникает после заболевания или вакцинации [20, 104].

Естественный пассивный иммунитет создается в результате передачи антител матери новорожденному через плаценту – это у людей и через молозиво («молозивные» антитела) телятам, поросятам.

Выращивание здоровых телят, поросят во многом зависит от качества молозива или путем введения иммунных сывороток, гамма-глобулинов, т.е. создания искусственного пассивного иммунитета через сывороточные антитела.

Ряд исследователей указывают на роль в обеспечении пассивного иммунитета у телят, поросят подкожным или внутримышечным введением новорожденным крови коров или свиноматок, а не ограничивается выпойкой молозива [12, 14, 39, 43, 67].

Для машинного доения соски должны быть цилиндрической или слегка конической формы длиной от 5 до 9 см, с диаметром средней части соска после доения от 2 до 3,2 см при расстоянии между передними сосками 6-20 см, а между задними (тазовыми) 6-14 см [27, 30, 32].

Продолжительность доения составляет 6-7 минут, что соответствует выделению окситоцина и поступления гормона с кровью в молочную железу, необходимого для обеспечения сокращения альвеол и мелких молочных протоков и выведению молока [50, 58, 68].

В молоке содержатся легкоусвояемые белки, углеводы, жиры, витамины, ферменты, микроэлементы.

Молоко является оптимальной питательной средой для быстрого роста микроорганизмов – молочнокислых и патогенных.

Следует учитывать, что интенсивный рост лактобактерий, бифидобактерий в течение нескольких часов сочетается с ростом в молоке и условнопатогенных и патогенных микроорганизмов, особенно стафилококков, стрептококков, *E.coli* и сальмонелл.

Выполнение требований получения молока высокого санитарного качества возможно путем предотвращения попадания в него механических загрязнений, бактерий, соблюдения условий кормления и качество кормов, свободных от гербицидов, антибиотиков, привкуса чеснока, полыни, лука, состояния доильных аппаратов, обработки вымени перед доением, соблюдения работниками ферм санитарных требований.

Для получения доброкачественного молока необходимо соблюдать на степень чистоты, показатели бактериальной обсемененности, температуру и сроки охлаждения, кислотность молока и соблюдения сроков ограничений сдачи молока 7 дней до запуска и 7 дней после отела [59].

Международная молочная федерация и национальные посты рекомендуют считать молоко хорошим, если оно содержит не более 500 тысяч/мл соматических клеток, в основном лейкоцитов, не более 150 тыс/мл бактерий с колититром не ниже 0,01.

Установлено, что свежее молоко имеет нейтральную реакцию и почти не содержит в своем составе молочной кислоты.

При высокой бактериальной обсемененности свыше 500 тыс/мл лактоза (молочный сахар) под действием редуктаз бактерий разрушается до воды и молочной кислоты, содержащей водородные ионы, повышающие кислотность молока [57, 85, 86].

Ряд авторов считают, что кислотность молока повышается при выпасе на болотистых пастбищах, скармливании силоса, нарушении фосфорно-

кальциевого и белкового обмена, у коров больных маститом, разбавлении молока водой, а внесение консервирующих средств – перекиси водорода, формальдегида, хлорных препаратов, хромовокислого калия и нейтрализующих соды, щелочи снижает качество и пригодность молока для получения молочных продуктов [60, 98].

В последнее время выделены и изучены особая группа бактерий психрофильных (холодоустойчивых), способные размножаться при низких температурах, выделяя фермент редуктазу.

При этом роль и значение холодоустойчивых микроорганизмов молока практически остаются не изученными, в том числе способы и средства их выделения и выращивания и в развитии патологии молочной железы и в заболевании человека.

## **2.2 Причины возникновения, способы и средства лечения коров, больных маститом**

Мастит – воспаление тканей молочной железы, сопровождается появлением в молоке большого количества лейкоцитов, фагоцитов и микроорганизмов.

Мастит возникает под воздействием различных факторов внешней и внутренней среды, при снижении резистентности организма, нарушения технологии машинного доения, проникновения микроорганизмов через сосковый канал, гематогенным путем, при макро- и микротравмах сосков, кожи вымени, задержании последа, болезнях матки, высокого и низкого и непостоянного вакуума.

Воспаление молочной железы возникает во все физиологические периоды, от воздействия высоких и низких температур, передержки

доильного аппарата на вымени, быстрого или медленного темпа пульсации в минуту, формы вымени.

Перечисленная гамма факторов общеизвестная и устранима.

По сообщениям ряда авторов предрасполагающим фактором заболевания коров маститом является содержание животных с повышенным гео- и электромагнитным полем (аномалии), т.е. с именованным магнитным полем, которое вызывает понижение резистентности организма и изменение биологических свойств микроорганизмов в сторону повышения устойчивости к температуре, дезинфицирующим средствам, антибиотикам.

По течению заболевания и по характеру воспалительного процесса мастит разделяют на острый и хронический – субклинический, серозный, катаральный, фибринозный, гнойно-катаральный, специфический.

Диагностика субклинического мастита невозможна без специальных тестов исследований.

В этом заключается трудность распознавания субклинического, скрытого мастита.

Практически сам по себе субклинический мастит у коров не проходит и постепенно переходит в клинический.

Эффективность лечения коров, больных субклиническим маститом во многом зависит от своевременной дифференциальной диагностики.

Субклинический мастит регистрируется в 5-10 раз чаще, чем клинически выраженный и представляет собой очаговое катаральное воспаление, реже катарально-серозное или катарально-гнойное. Для него характерно поражение отдельных групп альвеол или долек паренхимы молочной железы.

В динамике патологический процесс в молочной железе, при нарушении правил доения развивается вначале как раздражение, которое при отрицательном воздействии переходит в асептическое воспаление.

Снижение локальной резистентности четверти вымени способствует колонизации ее через сосковый канал, чаще всего стафилококками и стрептококками.

Проникновение микроорганизмов в сосковые и надсосковые синусы вызывает инфекционный процесс различной степени тяжести.

Кроме того, микроорганизмы могут проникать в молочную железу гематогенно, лимфогенно, например из матки, и перкутанно (через кожу). В зависимости от экссудата различают: серозный, катаральный, фибринозный, гнойно-геморрагический и специфический мастит. Серозный мастит развивается вскоре после отела и характеризуется воспалением и отеком молочной железы, пораженные доли увеличены в объеме, соединительная ткань отечна и выступает в виде тяжей. В альвеолах серозный экссудат, богатый лейкоцитами и локально лимфоцитами. При катаральном мастите молочные ходы и альвеолы заполнены серозным экссудатом, дисквамированным эпителием, лимфоцитами, лейкоцитами, эритроцитами. При гнойно-катаральном мастите в просвете альвеол содержится большое количество лейкоцитов. Хронические формы воспаления вымени характеризуются ярко выраженной лимфоидной инфильтрацией соединительной ткани молочной железы, атрофией железистой части вымени, молочная железа становится плотной, на разрезе серо-белой. При скрытом мастите у коров обнаруживают очаговые изменения в виде резко утолщенных альвеолярных перегородок, наличием отдельных микроабсцессов, альвеолы содержат большое количество гнойных телец, которые заполняют межальвеолярную и соединительную ткань.

По течению мастит разделяют на острый до 10 дней, подострый – до 3-х недель и хронический свыше 3-х недель.

По основным характеристикам маститы подразделяются на субклинический, серозный, катаральный, фибринозный, гнойный маститы



(гнойно-катаральный), гангрена, абсцессы и флегмоны вымени, геморрагический. скрытые, предотельные маститы, специфические маститы при ящуре, актиномикозе, туберкулезе [31].

При серозном мастите отмечают болезненность, гиперемию, повышение местной температуры, увеличение в объеме и уплотнение пораженной доли. Молоко жидкое, синеватого или голубоватого цвета, затем появляются хлопья казеина. Удой снижается на 50-60 % и более.

Серозный мастит характеризуется серозной экссудацией в подкожную клетчатку, увеличением соска воспаленной доли [30, 37, 104].

Диагностику серозного мастита проводят 5 % димастидином, содержащий поверхностноактивное вещество и индикатор фенолрот, а мастидин-бромкрезолпурпур путем смешивания с 1 мл молока.

Для лечения используют отмывание с мылом, массаж, внутримышечно или интрацистернально пенициллин со стрептомицином или неомицином, окситетрациклином, гипохлорид натрия в дозе 40 мг один раз в сутки в течение 2-3 дней и ряд комбинированных препаратов и дважды в день УВЧ терапию и лазеротерапию [14, 29, 103].

При катаральной форме мастита происходит поражение слизистой оболочки молочных протоков, цистерны соска, альвеол.

Название происходит от французского и греческого *catarre* – воспаление слизистой оболочки носа, желудка, горла и означает течь, стекание.

Из-за воспалительного процесса происходит перерождение покровного и железистого эпителия, отторжение и выпотевание, истечение экссудата, у основания сосок отечный, тестоватый с уплотнением до грецкого ореха. Молоко водянистое, содержит сгустки и хлопья казеина, образующие непроходимость и расширение молочных ходов.

Катаральный мастит возникает в результате повреждения слизистых оболочек соска, цистерн, снижение резистентности.

Для профилактики и лечения коров, больных катаральным маститом исключают сочные корма, промывают пораженную часть вымени 2 % раствором двууглекислой соды, а лечение антибиотиками, новокаиновой блокады, растворы риванола, фурациллина [73, 84, 101].

Особую практическую значимость приобретает интрацистернальное введение один раз в сутки 40-50 мл гипохлорита натрия в концентрации 300-500 мг/л. Электрохимическую активность раствора гипохлорита проводят с помощью 2-х электродов (пластин) из титана и платины и блока питания – электролизера.

Эффективность интрацистернального (внутривымянное) введения лечебных растворов, мази повышается с применением тепла, втиранием подсолнечной, камфорной мази и применением излучения электромагнитных волн УВЧ и лазерного луча.

Фибринозный мастит проявляется выходом фибрина через стенки сосудов, закупоркой просвета молочных ходов, альвеол, уплотнением и увеличением пораженной четверти вымени, выделением клейкого и мутного секрета, содержащей нити и пленки фибрина.

Фибринозный мастит осложняется стафилококками, стрептококками, сальмонеллами, *E.coli*, микроорганизмами и плесневыми грибами – *Asp.candida*.

При фибринозном мастите массаж вымени противопоказан, а лечение традиционное антибиотиками и физиотерапия.

Особую тревогу создают три формы гнойно-катарального мастита – это абсцессы и флегмоны вымени и собственно гнойно-катаральный, характеризующейся воспалением молочных протоков, альвеол и выделением гнойного экссудата.

Причиной гнойно-катарального мастита являются травмы тканей соска и молочной цистерны с проникновением и развитием гнойной микрофлоры.

Средства и способы профилактики и лечения включают санитарную обработку вымени, антибиотикотерапию и введение в пораженную четверть вымени 150-200 мл 1% раствора ляписа или 50 мл раствора йода. В отдельных случаях используют вскрытие или прокол абсцесса.

Кроме указанных форм мастита у коров появляется геморрагический мастит на фоне повышенной порозности сосудов и кровоизлияний в просвет альвеол, молочных ходов. Этот вид мастита обычно проявляется после родов и осложнений катарального и серозного мастита [48, 72, 116].

Еще в 1913 году Т. Иенсен указал на обязательную роль микробного фактора в возникновении мастита у коров и особенно молочного стрептококка. Многие исследователи считают, что в возникновении мастита первопричиной является машинная дойка [56, 62, 115].

В то же время по данным других авторов любой микроорганизм может быть вторичным агентом, причиной мастита.

В настоящее время принято считать основными возбудителями мастита являются стафилококки и стрептококки, которые постоянной выделяются из молока и секрета коров, больных маститом.

Второе место при мастите инфекционной патологии занимают *E.coli*, псевдомонады, плесневые грибы, микоплазмы.

Маститы, осложненные *Ps. auruginosa* коринебактериями протекают в тяжелой форме и трудно поддаются лечению. Воспаление вымени стрептококковой этиологии также трудноизлечимо [64].

В целом успех борьбы с маститом должен базироваться на соблюдении комплекса ветеринарно-санитарных, зоогигиенических, своевременного применения эффективных средств и способов диагностики, профилактики и терапии больных коров.

Из недостатков в лечении коров, больных маститом по свидетельству ряда авторов является недостаточная биоцидная и лечебная эффективность как «классических» природных и полусинтетических, синтетических в отдельности и в сочетании одних препаратов с другими.

### **2.3 Влияние гео- и электромагнитного воздействия на биологические свойства микроорганизмов**

Первые сообщения о связи между активностью солнца, фазами луны, биогеоценозом, геомагнитного и лучевого воздействия с явлениями органического мира Земли и биологическими свойствами микроорганизмов появились в начале 20 века в работах Чижевского А.Л. (1974,1976), Вернадского В.И. (1927), Виноградова А.П. (1939). Еще в отдаленные времена, люди при восхождении на горы заметили вредоносные местности влияющие на организм. Это действие на организм проявляется обычно на высотах и впоследствии названа «горной болезнью». Обычно это таинственное, обморочное состояние проявляется в ясную погоду в узких горных проходах, ущельях, где воздух подвержен застаиванию.

Исходя из этих соображений, ряд ученых в 1899-1901 годах высказали мысль о том, что «горная» болезнь проявляется под влиянием на организм чрезмерной ионизации воздуха положительными зарядами, которую подтвердил в 1901 году ассистент Высшей сельскохозяйственной школы Вильгельм Каспари при подъеме на гору Монте-Роза в Швейцарии.

Следует отметить, что впервые В.Каспари в 1900 году опубликовал научную работу о влиянии радиоактивных излучений на микроорганизмы. По сообщению А.Л. Чижевского (1974) впервые В. Каспари определил в ущелье горы Монте-Роза превышение в пять раз положительных ионов по сравнению с отрицательными [5, 111, 112].

В этот период времени были зарегистрированы случаи удушья (гибели) людей и животных на открытом воздухе в ясную солнечную погоду.

Полученные результаты положили начало изучению влияния солнечной активности и фаз луны, радиации, биогеоценоза, а в дальнейшем геомагнитного и электромагнитного воздействия на организм животных, людей и на микроорганизмы [3, 79, 110, 112].

Приоритетность исследование Чижевского А.Л. в определении усиления активности влияния специфической радиации, вспышек и пятнообразования, электромагнитного воздействия на жизнедеятельность возбудителя дифтерии и проявления максимума дифтерийных заболеваний, а затем в отношении ряда других микроорганизмов подтверждается изданием в 1934 году книги «Эпидемические катастрофы и периодическая деятельность солнца», а в 1938 году во Франции и Германии монографии «Эпидемия и электромагнитные пертурбации внешней среды». За обоснование космической биологии Чижевский А.Л. в 1939 году был избран почетным президентом международного конгресса по биологической физике и космической биологии. Поистине это был триумф научного мышления и познания [80, 109].

Основы научного познания Чижевского А.Л. явились фундаментом исследований в разных направлениях, в том числе эпидемических болезней людей и животных. В зависимости от биогеоценоза (термин предложен Сукачевым В.Н. в 1940 году) изучено более 20 болезней людей и животных.

В частности в 1968 году вышла первая отечественная монография в области ветеринарии «Эндемические болезни животных» под редакцией А.М. Колесова.

Итогом исследований, проведенных в этом направлении специалистами разных направлений является монография «Эндемические

болезни сельскохозяйственных животных», изданная «Агропромиздат» в 1990 году за авторством Урзаева Н.А., Никитина В.Я, Кабыш А.А. и др.

Из отечественных ученых следует указать результаты исследований и публикаций Бельского В.В., Попова М.П., Калущкого П.В. «Биофизические и медико-биологические аспекты магнитобиологии (1997), вся серия статей Калущкого П.В. (1986,1988,1989,1994,1995,1997), Броникова Ю.Н. (1973), Ганстремо К.О. (1997), Павлович С.А. (1971,1972,1975,1981), Червинец В.М. (1975,1981) и ряда зарубежных авторов [4, 5, 55, 70, 195].

Анализ указанных публикаций ряда авторов дает основание сделать вывод, что биологические свойства *S.aureus*, *E.coli*, сальмонелл и др., подвергнутые естественному магнитному воздействию, приводят к изменению антигенной структуры ряда бактерий, чувствительности к температуре, антибактериальным препаратам, дезинфицирующим средствам [75].

Многие авторы указывают, что при действии постоянного магнитного поля происходит усиление или снижение темпа роста, плазмокоагулирующей способности *S.aureus*, нарушение передачи R-плазмид, снижение синтеза *E.coli* колицинов.

Особое беспокойство и необходимость исследований является изучение влияния постоянных магнитов, геомагнитного и электромагнитного воздействия на нервную и репродуктивную, сердечно – сосудистую системы и разные виды обмена веществ.

Исследование регионов с биллокальными аномалиями, в частности в зоне Курской магнитной аномалии (КМА) и непосредственно при добыче, переработке и обогащении с помощью магнитной сепарации железосодержащих руд на организм животных и проявления чувствительности к отдельным возбудителям и вызываемых ими болезней крайне ограничено [15, 17, 20, 43].

В отношении репродуктивной способности к заболеваемости коров маститом в регионах с гео-электромагнитными аномалиями, с разными естественными и антропогенными биогеоценозами следует рассматривать как важный комплекс экологических факторов, способных вызвать различные патологические процессы и необходимость повышения биоцидного и лечебного действия антибактериальных препаратов и ветеринарно-санитарных мероприятий [76, 77, 169, 171].

#### **2.4 Виды стафилококков и их свойства**

Стафилококки – это грамположительные, аэробные, кокковидной формы кокки, располагаются в мазках одиночно, парами или гроздьями, неподвижны, не имеют жгутиков, не образуют спор. Род включает 20 видов и 50 антигенов, способные вызывать соответствующие антитела [1, 35, 81, 89].

Из них стафилококки подразделяются на две группы, коагулазоположительные и коагулазоотрицательные.

При этом фермент коагулаза существует в 3-х антигенных формах, вызывающая свертывание сыворотки, защищает кокки от фагоцитоза, а  $\beta$ -лактоза разрушает  $\beta$ -лактатные антибиотики, а липазы обеспечивают адгезию и проникновение в органы и ткани.

В развитии стафилококковой инфекции ведущая роль принадлежит золотистому и белому стафилококкам, а так же другим видам – сапрофитному, молочному, розовому.

По данным ряда авторов факторами патогенности стафилококков являются микрокапсула, компоненты клеточной стенки (тейховые кислоты) ферменты и токсические субстанции [2, 81, 108, 217].

В то же время установлено, что стафилококки различаются по биологической активности и патогенности, изменяющихся от изменений

условий внешней среды, организма животных и людей, воздействия лекарственных препаратов.

Вероятно, применение одного критерия патогенности является ошибочным, так как существующие данные свидетельствуют о том, что ни ферментация углеводов, ни пигментообразование не могут служить критерием патогенности.

На основании суммы признаков главными факторами патогенности являются способность стафилококков образовывать гемолизины, лейкоцидины, ферменты (коагулазу, гиалуронидазу, фибринолизины, фосфатазу, лецитиназу и экзотоксины) [6, 18, 130, 144].

Ряд исследователей патогенность стафилококков оценивают по способности вызывать гемолиз 5 % взвеси эритроцитов кролика или барана на агаре, некроз.

Несмотря на перечень многочисленных факторов патогенности стафилококков основным и постоянным показателем является наличие фермента коагулазы, свертывающей плазму крови и комплекс токсинов.

Наиболее изучены 4 компонента стафилококков – экзотоксин, лейкоцидин, энтеротоксин, фермент коагулаза, способный свертывать сыворотку крови. На плотных агаровых средах стафилококки образуют мутные колонии кремового, белого или оранжевого цвета, а на жидких в т.ч. на МПГБ дают равномерное помутнение, а затем рыхлый осадок с образованием сероводорода и разложением глюкозы, сахарозы, мальтозы и маннита.

По данным ряда авторов среди всех коагулазоположительных стафилококков по-прежнему остается, или считается основным патогенном для животных и человека золотистый стафилококк *S.aureus* (Д.Г. Дерябин, 2000).



С целью обнаружения стафилококков исследуют гной, кровь (при сепсисе), превральные пунктаты, слизь. При пищевых отравлениях исследуют рвотные массы, испражнения и подозреваемые продукты.

Золотистые стафилококки (*S.aureus*) обычно обитают на слизистых оболочках носовой полости, кожных покровах, желудочно-кишечном и генитальном трактах животных и человека. Оценивается как потенциально патогенный микроорганизм и является возбудителем маститов, пневмоний, абсцессов, септицемии, пищевых токсикозов.

Данные о генетическом механизме контроля патогенности стафилококков позволяет судить о роли «глобальных» генетических регуляторов в переключении биосинтеза микробной клетки с факторов вирулентности на факторы персистенции. Патогенность микроорганизмов – это их способность не только инициировать инфекционный процесс, но и поддерживать его в течение длительного времени. Для описания данного явления применяется термин «персистенция», отображающий способность патогенна к длительному переживанию в организме хозяина.

Глобальная регуляторная система возбудителя *S.aureus* связана с наличием комплекса генов (*accessory gene regulator*), контролирующих развитие стафилококковой инфекции, ферментов и токсинов, таких как  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  – гемолизины, плазмакоагулаза, лейкоцидин.

Основная биологическая роль белка – А-защита стафилококка от фагоцитоза, путем блокирования Fc иммуноглобулинов.

Стафилококки обладают большим количеством комплексов факторов патогенности в т.ч., фактор адгезии – прикрепления стафилококков к клеткам тканей и содержат разнообразные ферменты, играющие роль «агрессии и защиты» плазмакоагулаза (главный фактор патогенности), гиалуронидаза, фосфатаза и т.д., а так же комплекс секретируемых экзотоксинов.

В своем составе стафилококки содержат мембраноповреждающие токсины, которые ранее подразделялись на гемолизины (лизины), некротоксины, лейкоцидины и летальные токсины, т.е. каждый из этих токсинов разрушал эритроциты, лейкоциты, макрофаги, тромбоциты, клетки тканей [19].

В последующем установлено, что разрушение клеток и гибель животных происходит в результате действия одного и того же экзотоксина, хотя у них существует отличие по антигенным свойствам.

Энтеротоксины стафилококков (А,В,С,D,Е) характеризуются антигенной специфичностью и термостабильностью.

Стафилококки – главные виновники маститов, кожных и респираторных заболеваний (дерматиты, астма), сепсиса (септицемия – гнилоковие), гнойного очага из которого поступает возбудитель, выделяя токсины и аллергены.

Постстафилококковый иммунитет обусловлен гуморальными клеточными факторами, при которых важную роль играют анатоксины, антитела против ферментов и микробов, а так же Т-лимфоциты и фагоциты.

В то же время напряженность и длительность иммунитета против стафилококков изучены недостаточно.

Для специфического лечения стафилококковых заболеваний применяют аутовакцины, анатоксин, противостафилококковый иммуноглобулин и плазму.

При создании антитоксического иммунитета применяют стафилококковый жидкий и таблетированный анатоксин, а введение вакцин из убитых стафилококков или их антигенов приводит к появлению антимикробных тел, соответствующих серологическим вариантам из которых изготовлена токсина.

Из-за наличия у 20 видов стафилококков более 50 антигенов и влияния факторов внешней среды на их свойства получение высокоиммуногенных и протективных вакцин против многих видов патогенных стафилококков, по-прежнему остается не решенной проблема создания синтетической питательной среды для выращивания *S.aureus*, изучения биологических свойств выделяемых культур стафилококков.

## **2.5 Физиология микроорганизмов и питательные среды для выращивания стафилококков**

На основе морфологических и биологических свойств микроорганизмы подразделяются на вирусы, бактерии, грибы, микоплазмы, хламидии, риккетсии, вибрионы, спириллы, спирохеты и нитевидные формы бактерии актиномицеты, раньше назывались лучистыми грибами, а так же на необычные вирусы растений – вириды и прионы – низкомолекулярные белки без нуклеиновой кислоты, не вызывают ответных иммунных реакций.

У бактерий существуют вирусы, именуемые бактериофагами, вызывающие их разрушение, лизис.

У стафилококков (от греч. – *staphyle* виноградная гроздь), расположенные кокки в виде грозди винограда происходит рост в разных направлениях на две дочерние клетки.

Для выращивания бактерий используют жидкие, плотные, полужидкие, природные и синтетические питательные среды.

В процессе деления бактерий происходит репликация, удвоение ДНК, которая обеспечивается ферментами ДНК-полимеразами.

Жидкие питательные среды изготавливают на основе бульонов, гидролизатов мяса, казеина, крови или растворов из солевых компонентов.

Для приготовления плотных сред используют 2,5 % агар – это сложный полисахарид из морских водорослей, который расплавляется при 90-100 °С и сохраняет жидкое состояние до 45 °С.

В питательные среды вносят универсальный источник азота – пептоны – продукты неполного расщепления белков (протеинов) с помощью ферментов – пепсина, рожей.

В настоящее время широко используют универсальные среды – мясопептонный бульон – МПБ (мясная вода + 1% пептон + 0,5% NaCl) и мясопептонный агар – МПА (МПБ + 2-3 % агара), а также диагностические, селективные, избирательные, специальные и синтетические питательные среды [81, 92, 102, 179].

Синтетические (минеральные) питательные среды отличаются постоянством состава солей, аминокислот, микроэлементов.

Впервые в 1843 г. К.В. Ушинский сконструировал питательную среду для выращивания многих микроорганизмов. С современных позиций знаний биохимии, питания микроорганизмов предложены два варианта синтетических питательных сред, они включают жизненно необходимые минеральные микроэлементы – магний, калий, фосфор, серу, натрий и источник углерода – глицерин.

Полученные результаты стали прообразом большинства питательных сред с лимонной, янтарной и другими органическими кислотами цикла Кребса.

В последующем была изучена роль в физиологии микроорганизмов серы, кальция, меди, железа, кобальта, витаминов и аминокислот.

Следует указать, что фосфор и калий постоянно составляют самое большое количество минерального остатка в микроорганизмах. Они входят в состав нуклеиновых кислот, некоторых липидов и ферментов.

Кроме того, ионы фосфора и калия наряду с ионами натрия необходимы для поддержания осмотического давления среды, для выполнения функций буфера в среде. Ионы кальция, магния и серы необходимы для функции внутриклеточных энзимов. Ион серы при этом активно включается в клеточные белки, а магний активирует почти все энзимы.

Краткий отбор литературы дает основание утверждать, что минеральные питательные среды с аспарагином, глицерином, лимонной кислотой с ионами железа, цинка и т.д. обеспечивают сохранение морфологических и биологических свойств микроорганизмов. При этом лимонная кислота цикла Кребса обеспечивает растворение ингредиентов и образование жизненно важных солевых компонентов [102, 173, 199].

При сочетании различных веществ необходимо помнить, что они могут взаимодействовать друг с другом, образуя при этом различные соединения. Особенно важно создавать такие условия для роста бактерий, при которых не происходило бы осаждения углекислых и фосфорнокислых солей. Поэтому необходимо учитывать совместимость, стабильность и нестабильность вносимых ингредиентов среды.

В питательных средах при культивировании микроорганизмов так называемые несуществующие элементы для жизнедеятельности клетки могут оказывать косвенное влияние, или могут создавать благоприятные физико – химические условия среды, способствовать полному растворению основных ингредиентов в питании бактерий. Разделение элементов питательной среды на основные или существенные, и на дополнительные или несущественные метаболиты является условным и ориентировочным [92, 96, 102, 175].

Достигнутые успехи в конструировании минеральных питательных сред создают перспективу совершенствования существующих и поиска новых сред с более эффективными, экологически безопасными и

экономически выгодными ингредиентами в составе питательных сред, обеспечивающих высокое накопление бактериальной массы для изготовления вакцины и анатоксинов.

## **2.6 Научно-практические аспекты получения и применения иммунобиологических препаратов**

Имунобиологические препараты (ИБП), в гуманной медицине медикоимунобиологические препараты (МИБП) предназначены для диагностики, специфической профилактики и терапии инфекционных болезней животных и людей. В настоящее время общее количество отечественных МИБП составляет более 1000, зарубежных около 200, а для ветеринарных целей свыше 2000.

ИБП по применению подразделяются на профилактические, диагностические, лечебные, повышающие продуктивность животных.

По современной классификации ИБП включают:

1) препараты, получаемые из живых или убитых вирусов, бактерий, грибов или продуктов их биосинтеза и деструкции – это вакцины, анатоксины, бактериофаги, пробиотики;

2) иммуноглобулины и иммунные сыворотки, иммунотоксины полученные от вакцинированных животных и человека или изготовленные методами генной инженерии (моноклональные антитела);

3) иммуномодуляторы для иммунокоррекции лечения и профилактики иммунодефицитов различной этиологии (интерфероны, интерлейкины, адъюванты, левамизол, гормоны;

4) диагностические препараты при выявлении антител и антигенов, постановки кожных проб [7, 8, 35, 40, 198].

С помощью ИБП ликвидированы многие инфекционные болезни животных и человека – сибирская язва, оспа, бруцеллез, туляремия, бешенство, корь, чума и т.д.

В качестве действующего начала в вакцинах используют:

- 1) живые ослабленные вирусы, бактерии;
- 2) убитые, инактивированные вирусы и бактерии 0,6-0,8 % раствором формалина;
- 3) отдельные их фрагменты – белки, нуклеиновые кислоты, например токсины, обезвреженные 0,6-0,8% раствором формалина – анатоксины;
- 4) полученные генно-инженерным способом или химическим синтезом молекулярные (растворимые) антигены.

В целом вакцины кроме активного антигена (вирусов, бактерий или фрагментов) содержат стабилизаторы, вещества, активирующие действие антигена – адьюванты, депонеты (гидроокись алюминия, минеральные масла для вакцин) и консерванты – фенол, хинозол, мертиолят [7, 40, 44].

Генно-инженерная технология явилась революцией в разработке новых биопрепаратов. Она позволила создавать рекомбинантные препараты, обладающие слабой реактогенностью и достаточной эффективностью (вакцина против гепатита В, инсулин, интерфероны и другие виды цитокинов).

Большое будущее у искусственных пептидных препаратов, аналогов естественных биопрепаратов. Они широко используются для изготовления диагностических систем. При введении людям они безопасны и слабо реактогенны. Некоторые из них обладают выраженным иммунокорректирующими свойствами. Пептидных вакцин пока нет, хотя ВОЗ утвердила рекомендации по их разработке и контролю, предполагая, что они появятся в ближайшее время. Такие же рекомендации даны в отношении так называемых ДНК-вакцин.

Далеко не исчерпаны возможности использования препаратов крови и иммунных сывороток. Однако из насущных задач сывороточного дела является расширение ассортимента гомологичных препаратов и последовательное сокращение выпуска гетерологичных сывороток, вызывающих аллергические реакции, а также образование антител, нейтрализующих действие самих сывороток [7, 90, 94, 203].

Ведется интенсивная разработка новых лечебных препаратов: генно-инженерных антител, в том числе одноцепочечных мини-антител, которые имеют преимущества перед обычными антителами; абзайм-антител со свойствами ферментов, блокаторов селектинов (адгезинов), которые представляют собой аналоги клеточных рецепторов, способствующих фиксации приживлению микроорганизмов; различного рода средств доставки препаратов, применяемых, в частности, для конструирования иммунотоксинов, вызывающих гибель чужеродных для организма клеток; антител и цитокинов, полученных от трансгенных животных; эмбриональных клеток (прежде всего клеток печени) как источника предшественников иммунокомпетентных клеток.

Весьма перспективно новое направление – получение биопрепаратов (вакцин, цитокинов и пр.) из трансгенных растений, полученных путем чужеродного гена в ядерную хромосому растений. Такие экспериментальные вакцины получены из бананов и картофеля. Иммунизация происходит путем введения антигена, экстрагированного из растений, или включения плодов растений в пищу [93, 107, 209].

Обширной областью применения биологических препаратов является диагностика заболеваний. Среди новых направлений можно назвать разработку биосенсорных тест-систем, биологических микрочипов, генетическое типирование на основе амплификации и молекулярной гибридизации, создание тест-систем на основе рекомбинантных белков,



синтетических пептидов, многоканальных антител, определение цитокинов и других биологически активных веществ крови и различных структурах тканей человека, а так же другие принципы и методы диагностики.

Бурное развитие получил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время более десятка тест-систем, основанных на ПЦР, внедрены в практику здравоохранения. На различных стадиях разработки и испытания находятся еще несколько десятков таких систем для диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний. Разрабатываются новые экспресс тест-системы, доступные для индивидуального применения в домашних условиях.

В последние 10-20 лет произошли значительные изменения в производстве биологических препаратов. Вместо громоздких биореакторов используется высокоэффективная аппаратура с автоматическим контролем и программным регулированием технологического процесса биотехнологии на принципах гарантии качества продукции, соблюдения правил УМП и системы государственного контроля.

В состав сложных ИБП входят компоненты антигенов – протеины, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, а также стабилизаторы, консерванты, иммуномодуляторы и адъюванты [8, 36, 44, 96, 203, 207].

По классификации предложенной А.А. Воробьевым в 1999 году вакцины разделены на две группы – живые и неживые. В живых вакцинах в качестве действующего начала используют:

- 1) аттенуированные, т.е. ослабленные, потерявшие свою патогенность штаммы природных бактерий и вирусов;
- 2) дивергентные штаммы патогенных бактерий и вирусов, имеющие родственные антигены с патогенными возбудителями – вакцина против оспы, БЦЖ, вакцина для птиц – б. Марека.

Применение живых вакцин, созданных на основе рекомбинантных штаммов бактерий и вирусов, основано на взаимодействии между двумя геномами ДНК различных генотипов. Встроенный в непатогенные бактерии и вирусов ген специфического антигена патогенного микроба вырабатывает для патогенного возбудителя антиген. Таким образом, рекомбинантный штамм выполняет роль вектора (проводника) специфического антигена.

В качестве стабилизаторов в живых вакцинах используют человеческий альбумин, сахарозу с желатиной или вакцину подвергают высушиванию – лиофилизации.

В убитых вакцинах бактерии и вирусы подвергаются обезвреживанию (инактивации) с помощью нагревания, ультрафиолетового облучения, ионизации и воздействию химических веществ – формалина, фенола и т.д.

В результате инактивации – нагреванием, формалином, облучением бактерии и вирусы полностью теряют жизнеспособность, но сохраняют антигенные и иммуногенные свойства [42, 91, 143, 187].

Способы детоксикации и инактивации токсино-аллергенов базируются на достижениях инфекционной иммунологии по получению анатоксинов и применению толерогенов для специфической десенсибилизации путем обработки токсинов, аллергенов, микроорганизмов формалином и его производными. Обработка формалином аллергена из пыльцы амброзии, райграса уменьшила аллергенную активность препаратов в 100–1000000 раз. При этом было установлено, что «формализованный препарат» обуславливал выход в 1000–10000 раз меньше гистамина, чем немодифицированный аллерген.

При разработке убитых или живых вакцин до сих пор мало внимания обращалось на аллергенные свойства предлагаемых препаратов. Не было даже подхода к решению задачи по оценке аллергенных свойств профилактических препаратов.

Поэтому возникает необходимость разработки методов оценки, контроля аллергенных свойств, широко применяемых и конструируемых вакцин и научное обоснование календаря их применения [46, 93, 107, 183]. Особое значение при разработке инактивированных вакцин и анатоксинов с целью повышения иммуногенности придается адъювантам.

Толерогенные гаптены могут быть получены не только при применении формалина, полиэтиленгликоля, В-пропилактона, но и с помощью Д-лизина, Д-глутаминовой кислоты, мочевины и глутарового альдегида.

Райкис Б.Н., Иллютович Н.А. (1981) считают, что толерогенные гаптены, лишенные основных функций антигена, способны индуцировать синтез реагиновых и других типов антител и соединяться с ними, являются наиболее перспективными для лечения различных аллергозов [90, 173]. Аллергены из микробов амброзии, тимофеевки, экстракта из семени луговых трав, обработанные формалином или глутаровым альдегидом стимулируют продукцию антител, принадлежащих к J и M классу, и значительно снижают аллергенную активность.

В последующем были получены более эффективные толерогенные гаптены с помощью глутарового альдегида.

В процессе изготовления инактивированных вакцин и анатоксинов определена концентрация формальдегида и аллергена или антигена, токсина, а также рН, время и температурный режим их детоксикации или инактивации.

В основе изготовления таких препаратов, как и полимерализованных аллергенов положено взаимодействие реакционноспособных альдегидных групп с аминогруппами аллергенов. В технологии получения нативного анатоксина заложен разработанный принцип детоксикации токсина, сущность которого сводится к выдерживанию препарата в присутствии 0,35-

0,4 % формалина или его производных при температуре 37-38 °С в течение 21-25 дней.

Заслуживает внимания метод по сокращению процесса детоксикации за счет изменения процентного содержания формалина и увеличения температуры, разработанный сотрудниками Харьковского НИИ вакцин и сывороток.

В настоящее время принято считать, что реакция формальдегид – белок (пептид) состоит из двух стадий.

В течение первой стадии, быстрой и обратимой, происходит взаимодействие свободных аминогрупп и в первую очередь аминогруппы лизина с формальдегидом. При этом образуются метилелламинные группы.

На втором этапе в реакции участвуют активные радикалы циклических аминокислот, содержащие фенольные, гуанидиновые, амидозольные и индольные группы (тирозин, аргинин, гистидин, триптофан). Эти группы, сочетаясь за счет активных атомов водорода с метилоламинными группами, прочно соединяются с остатками лизина через метиленовые мостики.

Блокирование формалином активных радикалов токсина приводит к его обезвреживанию с образованием полимеров, увеличению его отрицательного заряда, что выражается в различных изоэлектрических точках токсина и анатоксина, в значительном уменьшении количества аминного азота. Следовательно, при детоксикации происходит два процесса: собственно детоксикация препарата и полимеризация и стабилизация структуры молекулы антигена с образованием жестких связей, сопровождающихся появлением всего комплекса свойств анатоксина – иммуногена.

Анализ литературы по данному вопросу позволяет сделать вывод, что успешная разработка получения и применения новых биопрепаратов для лечения и профилактики инфекционных заболеваний должна базироваться на

обширном материале по изучению биологических свойств микроорганизмов, в т.ч. стафилококков, их токсинов и получению и применению анатоксинов и анатоксин-вакцин и иммунных сывороток.

## **2.7 Стафилококковые токсин-аллергены и способы получения и применения анатоксин-вакцин**

Для создания антитоксического стафилококкового иммунитета применяют анатоксины, получаемые, в основном, из альфа- и бета-экзотоксинов стафилококков, лишенных ядовитых свойств, но и сохранившие иммуногенные свойства. Впервые метод получения столбнячного и дифтерийного анатоксинов предложил в 1923 году французский ветеринарный врач, ученый, директор института Пастер, президент всемирной ветеринарной ассоциации. Для приготовления анатоксина к экзотоксину прибавляют формалин до 0,3-0,7% концентрации, выдерживают при температуре 37-40 °С в течение 3-4 недель до полного исчезновения токсических свойств. Анатоксины выпускают в виде нативных препаратов или в виде очищенных адсорбированных на адъювантах препаратов.

Сложность борьбы со стафилококковыми заболеваниями, их повсеместное и неуклонное распространение, а также отсутствие надежных средств защиты и борьбы с ними делают весьма актуальными вопросы получения иммунологических специфических препаратов.

Основанием для создания таких препаратов послужило изучение роли стафилококкового токсина в патогенезе стафилококковых инфекций и противостафилококковом иммунитете. Несмотря на то, что до сих пор нет единого мнения о ведущей роли какого-либо одного патогенетического фактора в развитии стафилококковых заболеваний, роль токсинов

стафилококка и антитоксинов в противостафилококковом иммунитете является установленной.

Вопрос о том, оказывают ли антитоксические антитела защитную роль при стафилококковой инфекции до конца не решен. Однако клинико – иммунологические наблюдения многих авторов позволили установить прямую зависимость течения инфекции с выраженной интоксикацией от высоты титров альфа-антитоксинов. Анализируя значение отдельных свойств стафилококков в патогенезе инфекции ряд исследователей делают заключение о том, что роль токсинов в инфекции, а антитоксинов в противостафилококковом иммунитете является бесспорной и не должна недооцениваться. И хотя придавать ей первостепенное значение во всех случаях и клинических формах основания нет, но когда ведущая роль приобретает интоксикация, тогда антитоксическая защита может оказать решающее влияние на течение и исход процесса.

Изучение сенсебилизирующего действия токсина показало, что в патогенезе стафилококковой инфекции играет роль гиперчувствительность замедленного типа из-за способности стафилококков продуцировать альфа-токсин и лейкоцидин. Единого мнения об аллергических свойствах стафилококкового анатоксина нет. С одной стороны, есть отдельные работы, свидетельствующие о возникновении сенсебилизации лейкоцитов под влиянием многократных введений стафилококковых анатоксинов, особенно нативного. С другой стороны, на основании проведенных исследований отмечается десенсебилизирующее влияние анатоксинотерапии при стафилококковых инфекциях. Ввиду того, что стафилококковый анатоксин применяется достаточно широко в различных областях медицины, следует продолжить исследования в области изучения его сенсебилизирующих свойств и получения стафилококкового аллергена.

Сравнительное изучение иммуногенности стафилококкового анатоксина и корпускулярных вакцин, проведенное рядом исследователей, показало явное преимущество анатоксина.

Особенности патогенеза стафилококковой инфекции обуславливают наряду с непосредственным воздействием на возбудителя необходимость повышения иммунологической реактивности.

Одним из эффективных средств серотерапии и серопротекции инфекционных болезней в настоящее время является препарат гамма-глобулина.

Защитные факторы гамма-глобулина до конца не изучены. Полнее всего охарактеризовано наличие специфических антител в гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови и в препаратах – гамма-глобулине и полиглобулине, полученных различными методами фракционирования. Препараты гамма-глобулина и его аналоги имеют очень широкий спектр применения, особенно в последние 10 лет, когда кроме противокориевого гамма-глобулина создан ряд иммуноглобулинов направленного действия (противогриппозный, противооспенный, противоэнцефалитный, противостафилококковый).

Для получения комплекса стафилококковых токсинов микроорганизмы выращивают на средах, содержащие мясной экстракт, гидролизат казеина, пептон, микроэлементы, агар.

Для промышленного получения токсина культуры стафилококков выращивают на жидких питательных средах в атмосфере углекислого газа. Положительный эффект наблюдается при добавлении в атмосферу воздуха 20 – 80 %  $\text{CO}_2$  или 20 %  $\text{CO}_2$  в кислороде.

Ряд авторов отмечают быстрый рост и высокое накопление стафилококков, *E.coli*, сальмонелл при выращивании в жидких минеральных питательных средах по сравнению с мясными или казеиногидролизатными

средами, которые не отличаются постоянным составом и содержат балластные вещества мяса, казеина, пептона.

Однако промышленное производство бактериальных анатоксинов, вакцин продолжает базироваться на использовании продукта водно – или кислотнотермического гидролиза мяса, казеина для выращивания микроорганизмов.

Выращенные стафилококки с экзотоксинами подвергают инаktivации 0,3-0,7 % формальдегидом, а при использовании автоклавирования дополнительно образуются при деструкции бактериальной клетки эндотоксины [146, 170, 181, 199].

Однако по сообщению В.И. Покровского (1999) и других авторов разделение экзотоксинов и эндотоксинов является условным. Важную роль при этом играет их химический состав и механизмы действия.

В целом бактериальные экзотоксины и эндотоксины – это комплекс соединений протеинов, липидов, полисахаридов и нуклеиновых кислот бактериальной клетки, связанные с ее протоплазмой. Они поступают в питательную среду при разрушении клетки и поэтому и накопление в среде находится в соответствии с процессом деструкции (разрушения) бактерий.

По сравнению с самым сильным растительным ядом алколоидом стрихнина (30-40 мг смертельная доза для человека) и ядом кобры, который в десять раз сильнее стрихнина, то экзотоксин столбняка в 20 раз сильнее яда кобры, а 1 мг экзотоксина ботулизма можно умертвить 10 млн. мышей.

Впервые французским врачом Г. Рамоном метод детоксикации (обезвреживания 0,5-0,7 % раствором формалина при 37 °С в течение 2-3 недель) получены анатоксины против дифтерии и столбняка в 1924–1929 гг.



На введение анатоксинов в организме вырабатываются антитела, которые соединяются с токсином с образованием комплекса, который захватывается макрофагами и разрушается ферментами.

Для детоксикации, полимеризации и инактивации вирусов, бактерий и их субстанций – токсинов, аллергенов в основном используется 0,5-0,7 % формальдегид при 40 °С в течение 3-5 недель, а также  $\beta$ -пропилактон, полиэтиленгликоль, гексаметилендиизоцианат, перекись водорода, гидроксилламины, глициральдегид.

Доказано, что  $\beta$ -пропилактон, получаемый взаимодействием кетона с формальдегидом в присутствии  $ZnCl_2$  и  $BF_3$ , вызывает отравление и появление опухолей.

Ввиду высокой токсичности и канцерогенного действия наличие  $\beta$ -пропилактона в воздухе недопустимо.

В отношении формальдегида экспертный комитет ВОЗ из-за канцерогенных свойств рекомендует снижение или изъятие в использовании для инактивации вируса и детоксикации и полимеризации бактериальных токсинов.

Кроме того установлено, что формальдегид не обеспечивает полноту детоксикации и инактивации стафилококковых и стрептококковых токсино-аллергенов.

Заслуживает внимание и возможность перспективного использования этония и глутарового альдегида для детоксикации и полимеризации комплекса ряда бактериальных токсинов для повышения протективных и иммуногенных свойств биопрепаратов.

При этом этоний как бисчетвертичное аммониевое соединение широко используется в гуманной медицине в стоматологии, офтальмологии, лучевых поражений кожи, дерматитах и т.д.

В отношении глутарового альдегида изучено, что он в 3-4 раза превосходит биоцидные действие формальдегида при 90 % биоразложении.

Из физических методов известна инактивация микроорганизмов ультрафиолетовым и ионизирующим облучением. Применение теплового воздействия при инаktivации вирусных культур с применением химических средств снижает антигенность препарата.

Несмотря на возможность использования синтетических питательных сред вместо МПГБ для выращивания стафилококков, эффективность детоксикации и полимеризации стафилококковых экзо- и эндотоксинов глутаровым альдегидом отдельно и с этонием или другими бисчетвертичными аммониевыми соединениями основным биопрепаратом остается стафилококковая формолвакцина или анатоксин для профилактики и лечения коров, больных маститом, дерматитов, экзем, стафилококкоза птиц и плотоядных [147, 148, 161, 183].

Весьма важным остается изготовление стафилококкового аллергена, отсутствие биологической модели аллергии путем сенсебилизации морских свинок суспензией из автоклавированных стафилококков для контроля процесса инаktivации аллергенных свойств анатоксина.

## **2.8 Антимикробные препараты, механизм действия, основы антибиотикоустойчивости и перспективы повышения их эффективности**

Антибиотики (от греч. antibios – против жизни) по способу и источнику получения подразделяется на: природные, синтезированные бактериями, грибами, растениями, животными и полусинтетическими и синтетическими.

Антибиотики могут действовать бактериостатически и бактериоцидно. Не рекомендуется применять антибиотики одновременно с

иммунодепрессантами (вакцинами, антигельминтиками и др.) и можно применять совместно с сыворотками и лечебными средствами.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам включает 3 метода. Это диско-диффузионный, E-тест со специальной полоской, содержащей антибиотик и метод серийных разведений в питательной среде с определенной концентрацией микроорганизмов от 1000/мл и более.

Из-за длительности определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам используют два метода – эмпирический и этиотропный.

Эмпирический метод основан на знании данных природной чувствительности бактерий и что при данной болезни такие препараты эффективны, а этиотропный – это назначения антибиотика после выделения чистой культуры микроорганизма и определения его чувствительности *in vitro*.

По спектру действия антибиотики подразделяются на узкого и широкого действия, на антибактериальные, противогрибковые, противовирусные, обычные и профилактические [24, 25, 41, 100, 117, 127].

К синтетическим антибиотикам относятся препараты, полученные химическим путем: стрептоцид, сальфарсан, биосептол, фторхинолоны, метронидазол.

Длительное применение сульфанидных препаратов вызывает устойчивость микробов особенно стафилококков и стрептококков.

Из многочисленных групп антибактериальных препаратов наиболее эффективными являются 5 групп: бета-лактамы, фторхинолоны, тетрациклины, хлорамфеникол (левомицетин) и аминогликозиды.

Биоцидное действие антибиотиков проявляется в отношении ряда бактериальных ферментов, в синтезе клеточной стенки, белка на уровне рибосом 70S, в блокировании ДНК-гираз, участвующих в репликации ДНК.

Изучено два вида лекарственной устойчивости микроорганизмов – природная, видовая, естественная, обусловленная отсутствием для

антибиотиков проницаемости клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, а приобретенная за счет мутации и дополнительных генов, носителями которых является R-плазмиды.

В настоящее время изучены многие биохимические основы антибиотикоустойчивости микроорганизмов. Это за счет ферментов – бета-лактомазы, разрушающие антибиотики, утраты биологической активности, изменению структуры белков рибосом 70S, ускоренного выведения антибиотика из клетки и модификации антибиотика из активного действия в неактивное [120, 122, 214].

Для потенцирования биоцидной и лечебной активности антибиотиков используют сочетание одних антибиотиков с другими, вводят в их состав клавулановой кислоты (природный антибиотик, полученный в 1976 году в Словении) ряд органических кислот, фтор, пиперазиновый радикал, трилон – Б, аргинин и т.д.

Однако повышается общая тенденция устойчивости микроорганизмов к разным видам антибиотиков.

Ряд авторов считают возможную перспективу поиска, создания так называемых «сильных» антибиотиков за счет новых механизмов транспорта в бактериальную клетку и устойчивости к деструктивному действию микробных ферментов [155, 159, 173].

Известно, что вначале процент устойчивых стафилококков к пенициллину составляет 3-5-10 %, а к началу 60-70 - х годов достигло 75-80%.

Снижение биоцидного действия пенициллина вызвало сокращение лечебной активности стафилококковых и других групп бактериальных инфекций.

В последующем путем ацелирования аминной группы пенициллинов были созданы новые поколения полусинтетических пенициллинов – клоксациллин, метициллин, ампициллин и т.д.

Однако и к этим полусинтетическим пенициллинам за счет бактериальных ферментов бета-лактомаз происходило разрушение у антибиотиков бета-лактомного кольца.

В результате исследований были получены новые пенициллиновые антибиотики – цефалоспорины из гриба рода *Cephalosporium*, которые подавляли развитие  $G^-$  и  $G^+$  бактерий.

Появление устойчивости микроорганизмов к цефалоспорином так же происходило за счет разрушающего действия всех тех же классов бета-лактамазных ферментов.

В целом бета-лактамазы микроорганизмов гидролизуют, разрушают пенициллины и цефалоспорины.

Проведенными исследованиями установлено, что синтез многообразия видов бета-лактамаз контролируется хромосомными и плазмидными генами.

Для ингибирования и разрушения бактериальных ферментов бета – лактамаз был в 1976 году в Словении получен из гриба *Streptomyces clavunaris* антибиотик под названием клавулановая кислота, содержащая бета – лактамное кольцо, способное проникать в активный центр фермента бета-лактамазы.

Из- за появления резистентных стафилококков, сальманелл *E. coli* и т.д. к бета-лактамам антибиотикам продолжается поиск новых комбинированных препаратов [122, 175, 190, 209].

Одновременно с природными антибиотиками проводятся исследования по созданию новых синтетических препаратов для лечения инфекционных заболеваний с содержанием 6 – фтор – 4 – хинолон – 3 – карбоновой кислоты

в гетероциклической системе хинолона, что явилось основанием именовать их как фторхинолоны.

Из названия фирмы «Байтрил» фторхинолоны именовались одноименным названием, а затем норфлоксацин, энрофлоксацин, энромат, энроксил.

Считают, что фторхинолоны действуют непосредственно на ДНК-гиразы, вызывая гибель микроорганизмов.

Для лечебных целей доза фторхинолонов, в частности норфлоксацина, энроксила составляет 10-20 мг/кг – один или два раза в сутки.

Из-за низкой растворимости в воде, физиологическом растворе норфлоксацин применяется внутрь и наружно.

Норфлоксацин эффективен при лечении коров, больных маститом.

В среднем минимальная ингибирующая концентрация норфлоксацина, энроксила, энрофлоксацина колеблется от 0,03 мкг/мл до 10 мкг/мл.

Сравнительная оценка биоцидного действия энрофлоксацина в отдельных случаях уступает гентомицину, тетрациклину, эритромицину в отношении сальманелл *E. coli*, синегнойной палочки, стафилококков.

Для повышения биоцидного и лечебного действия энрофлоксацинов изготавливают комбинированные препараты с трилоном-Б, аргинином, колистином, а для повышения растворимости вносят лимонную кислоту.

В настоящее время снизились масштабы применения комбинированных антибактериальных средств с клавулановой кислотой и синтетических препаратов из-за появления резистентности микроорганизмов, а также повышенной токсичности и дороговизне.

Недостатком указанных способов модификации антибиотиков является дефицитность безчетвертичного соединения этония.

Из изложенного обзора литературы возникает возможность и перспективы поиска совершенствования технологии изготовления и

применения стафилококковой анатоксин-вакцины, антибиотиков с помощью не только этония, но и других безчетвертичных аммониевых соединений, а также создания антибактериальных препаратов без антибиотиков в форме мази, эмульсии или раствора.

### **Заключение**

Вышеизложенные факты показывают важность проблемы стафилококковой инфекции в ветеринарии и микробиологической практике. Наряду с необходимостью дальнейшего изучения патогенеза стафилококковой инфекции, фактором вирулентности стафилококка, четко вырисовывается целесообразность разработки и совершенствование методов специфических и антибактериальных средств лечения и профилактики этих инфекций. Анализ литературных данных в этой области показывает, что до настоящего времени нет универсального способа лечения и профилактики стафилококкозов, а существующие препараты требуют дальнейшего изучения и доработки. В этой связи представляется актуальным разработка жидкой и плотной с 2,5 % агаром синтетических плотных сред, биологических основ получения и практического применения специфических средств профилактики и лечения стафилококкозов у животных, в том числе вакцинно – и антибиотикотерапии коров, больных маститом.

### 3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии, радиобиологии и фармакологии ФГБОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И. И. Иванова», учхозе «Знаменское», молочном комплексе «Надежда», Курской областной ветеринарной лаборатории.

Объектом исследований служили лабораторные и свежевыделенные золотистые стафилококки – *S.aureus*, выделенные от коров больных маститом, экспериментально зараженных морских свинок и мышей.

Пять штаммов *S.aureus* были выделены из пораженных сосков вымени коров учхоза «Знаменское» и из гнойных ран. Лабораторные штаммы *S.aureus* использовали из Курской областной ветеринарной лаборатории, Жуковской ветеринарной лаборатории Калужской области. Штаммы стафилококков выращивали и хранили на мясоглицериновом агаре (МГА), мясоглицериновом бульоне (МГБ), минеральном агаре и в жидкой синтетической питательной среде. При этом в МПБ и жидкой синтетической питательной среде штаммы *S.aureus* продуцировали золотистый пигмент, коагулировали кроличью плазму через два часа давали положительную реакцию с кроличьей плазмой на стекле, обладали гемолитической активностью.

Лабораторные и свежевыделенные *S.aureus* изучали на устойчивость к амоксициллину, тетрациклину, эритромицину, энрофлоксацину, линкоспектину, фенолу, формальдегиду.

Для определения чувствительности стафилококков использовали МПК для амоксициллина 10-15 мкг/мл, эритромицина – 10 мкг/мл, тетрациклина –



25 мкг/мл, энрофлоксацина – 10-15 мкг/мл в отношении 10000/мл и 100000/мл микроорганизмов.

Гемолитическую активность определяли на МПА с добавлением 5 % суспензии эритроцитов барана.

Определение вирулентности *S.aureus* определяли внутрибрюшинным заражением белых мышей взвесью суточной агаровой культуры стафилококков в дозах от 1 до 5 млрд. м.т. в объеме 0,5 мл. Гибель животных происходила через 5-7 суток.

Клинические признаки маститов у коров и диспепсия телят изучали путем наблюдения за больными животными непосредственно на фермах учхоза «Знаменское» и молочном комплексе «Надежда» Большесолдатского района Курской области.

Для диагностики коров, больных маститом использовали клинические, лабораторные исследования с мастидином.

Для выращивания *S.aureus* использовали, в сравнительном аспекте, существующие питательные среды и варианты модифицированных минеральных сред с экономически доступными солевыми компонентами, обеспечивающими стабильное высокое накопление микроорганизмов до 9-11 млрд/мл микробных клеток. В то же время при выращивании *S.aureus* на мясогидролизатном бульоне максимальная концентрация микроорганизмов достигала 3-5 млрд/мл. Выращивание стафилококков проводили в 2-х литровых биобутылях с объемом среды, равной 1 литру, в течение 9-12 суток. Концентрацию стафилококков определяли по стандарту мутности, изготовленный Контрольным институтом им. Тарасевича.

Изучение роста *S.aureus* проводили на разных вариантах питательных сред, с использованием лимонной кислоты, солевых компонентов и глицерина в 2-х литровых биобутылях с объемом среды, равной 1 литр.

Для культивирования *S.aureus* использовали мясопептонный, казеиногидролизатный бульон с глицерином с рН 7,2-7,3 и на вариантах минеральных средах с лимонной кислотой в диапазоне 3-5 г/л, макро- и микроэлементами, 1 % глюкозы, 4-5 г/л хлористого натрия и глицерина до 30 г/л. Реакцию среды устанавливали 5 % раствором аммиака до 7,4-7,5 перед автоклавированием. Выращенную суспензию *S. aureus* подвергали автоклавированию при 1,0 атм., в течение 30 минут.

Детоксикацию и полимеризацию комплекса стафилококковых токсинов проводили первоначально 0,2-0,3 % формальдегида или 0,2-0,3 % glutaraldehyde при 40<sup>0</sup>С в течение 3-5 суток, а затем 0,2 % алкилдиметилбензиламмония хлоридом.

Для выделения *S.aureus* использовали мясопептонный бульон и минеральную питательную среду с 2,5 % агара с рН 7,3-7,5. Приготовление плотной минеральной питательной среды проводили путем разведения жидкой синтетической среды в соотношении 1:1 и 1:2 при внесении 2,5 % агара и 1 % хлористого натрия. Полученную взвесь с агаром подогревали до расплавления агара, а затем разливали по флаконам, пробиркам и в чашки Петри в стерильных условиях.

Выделение *S.aureus* проводили из трупов и фекалий телят и пораженных сосков вымени с повышенным геомагнитным фоном. Перед посевом поверхность печени, лимфоузлов, сердца, селезенки фламбировали раскаленным шпателем.

Свежевыделенные и лабораторные штаммы *S.aureus* сохраняли на поверхности агара в пробирках и во флаконах с МПГБ и минеральной жидкой питательной среде в течение 2-4 недель с последующим пересевом на свежие питательные среды.

Детоксикация стафилококковых токсинов в 2 этапа основана на полученных данных о том, что в течение первой стадии быстрой и обратимой происходит взаимодействие свободных аминогрупп и в первую очередь

аминогруппы лизина и других аминокислот с формальдегидом и образованием метилоламинных групп. На втором этапе в реакции участвуют активные радикалы циклических аминокислот, содержащие амидозольные, индольные, фенольные и гуанидиновые группы – это аргинин, гистидин, тиразин, триптофан. Эти группы, сочетаясь за счет активных атомов водорода с метилоламинными группами, прочно соединяются с остатками лизина через метиленовые мостики. Это достигается добавлением в процессе детоксикации 0,2 % формалина. При этом блокирование формалином активных радикалов стафилококкового токсина приводит к его обезвреживанию и образованию полимеров, увеличению отрицательного заряда и образованию различных изоэлектрических точек в анатоксине в сравнении с токсином и существенным уменьшением количества аминного азота. Следовательно, при детоксикации происходит два процесса: собственно детоксикация токсина и стабилизация образованных полимеров, которая достигается дополнительным внесением формалина и повышением температуры детоксикации. Этот процесс детоксикации практически исключает превращение анатоксина в токсин.

Для лечения коров, больных маститом вводили интрацистернально стафилококковую анатоксин-вакцину по 5-7 мл в течение 2-5 суток полученную путем детоксикации и полимеризации комплекса стафилококковых токсинов 0,3-0,4 % формальдегида отдельно и 0,3 % глутаровым альдегидом с 0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида. Выращивание стафилококков в 2-х литровых биобутылях с объемом питательной среды равном 1 литру проводили в течение 10-12 суток до концентрации 9-11 млрд/мл микроорганизмов.

Изучение на безвредность 2-х вариантов стафилококковой анатоксин-вакцины проводили путем подкожного введения 7-10 мл препарата 2-3-х месячным телятам и коровам 2-хкратно с интервалом 2 суток и по 0,1 мл белым мышам 3-хкратно, с интервалом 3 суток.

В качестве контроля использовали взвесь автоклавированных *S.aureus* без детоксикации и полимеризации токсинов. Полученные 2 варианта анатоксин-вакцины вводили телятам подкожно двукратно с интервалом 12-13 суток по 7-10 мл.

После вакцинации 30-45 дневным телятам вводили подкожно и орально суспензию вирулентных стафилококков.

В качестве контроля использовали невакцинированных телят после подкожного введения суспензии вирулентных стафилококков.

Изучение эффективности иммуногенных свойств стафилококковой анатоксин-вакцины проводили определением титра специфических антител в сыворотки крови телят и после вакцинации. Титр реакции агглютинации с сывороткой крови телят проводили в лунках пластин с кроличьей плазмой.

Повышение биоцидных свойств тетрациклина и линкоспектина и офлоксацина проводили по принципу полимеризации и детоксикации бактериальных токсинов в первом варианте 0,2 % формальдегидом при 40<sup>0</sup>С в течение 3 суток, а во втором 0,1 % глутаровым альдегидом в смеси с 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлоридом. Полученный модифицированием тетрациклин и офлоксацин изучали на биоцидное действие в отношении вирулентных лабораторных и свежеприготовленных *S.aureus* и терапевтическую эффективность после орального и подкожного заражения телят.

Изучение биоцидного действия антибиотиков, подвергнутых полимеризации, проводили методом серийных разведений с использованием МПГБ и жидкой минеральной питательной среды и методом диффузии в агаре со стандартными бумажными дисками, пропитанные определенной концентрацией антибиотика. При этом штаммы *S.aureus* считали чувствительными к амоксициллина и энрофлоксацина при задержке роста микроорганизмов вокруг диска в пределах 15-25 мм и более, а менее 15 мм вокруг бумажного диска – резистентными.

Методом серийных разведений МИК определяли минимальную концентрацию антибиотика, задерживающей видимый рост микроорганизма в пробирках, флаконах с питательной средой, содержащих убывающие концентрации антибиотика. Учетным признаком является наличие или отсутствие мутности бульона (роста культуры) в пробирках. В контрольной пробирке должна быть мутность, в контроле антибиотика – нет. Величина МИК соответствует той минимальной концентрации антибиотика, при которой отсутствует рост *S.aureus* и мутность (бульон в пробирке прозрачен).

Для получения результатов методом диффузии в агаре использовали стандартизованные условия (состав и количество среды, количество засеваемых микробов, температура и сроки инкубирования, стандартные и опытные диски). Каждому значению диаметра зоны вокруг диска с антибиотиком соответствует определенное значение МИК. По диаметру зоны задержки роста стафилококков определяли степень чувствительности к тому или иному антибиотику: чувствительные (S), умеренноустойчивые (I) и устойчивые ®.

К категории S (от англ. Sensitive, чувствительный) относили те, для которых использование средних терапевтических доз будет достаточным для трехкратного превышения МИК.

В категорию I (от англ. Intermediate, промежуточный) относят те микробы, для подавления которых потребуются максимальные терапевтические дозы.

Категорию R (от англ. Resistans, устойчивый) составляют те микроорганизмы, в отношении которых данный антибиотик будет неэффективным *in vivo*.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютера с процессором Intel Core 2 Quad, пакета программного обеспечения Microsoft Office 2007 и Statistika 70 с применением

корреляционного однофакторного дисперсионного анализа по качественным показателям.

Полученные цифровые результаты обрабатывали статистически граничные значения, которые определяли по показателю Стьюдента для 5 % и 1% уровня значимости в зависимости от числа степеней свободы.

Эффективность используемых концентраций дозы стафилококковой анатоксин-вакцины и экспериментальных антибиотиков определяли по следующим показателям: суммарная продолжительность лечения животных – 80–100 % – высокоактивная доза, 40-80 % активная доза и менее 40 % слабоактивная доза, разница срока лечения и биоцидного действия производственных и экспериментальных тетрациклина и офлоксацина.

В целом исследования проводили по следующим разделам, представленным на рисунке 1.

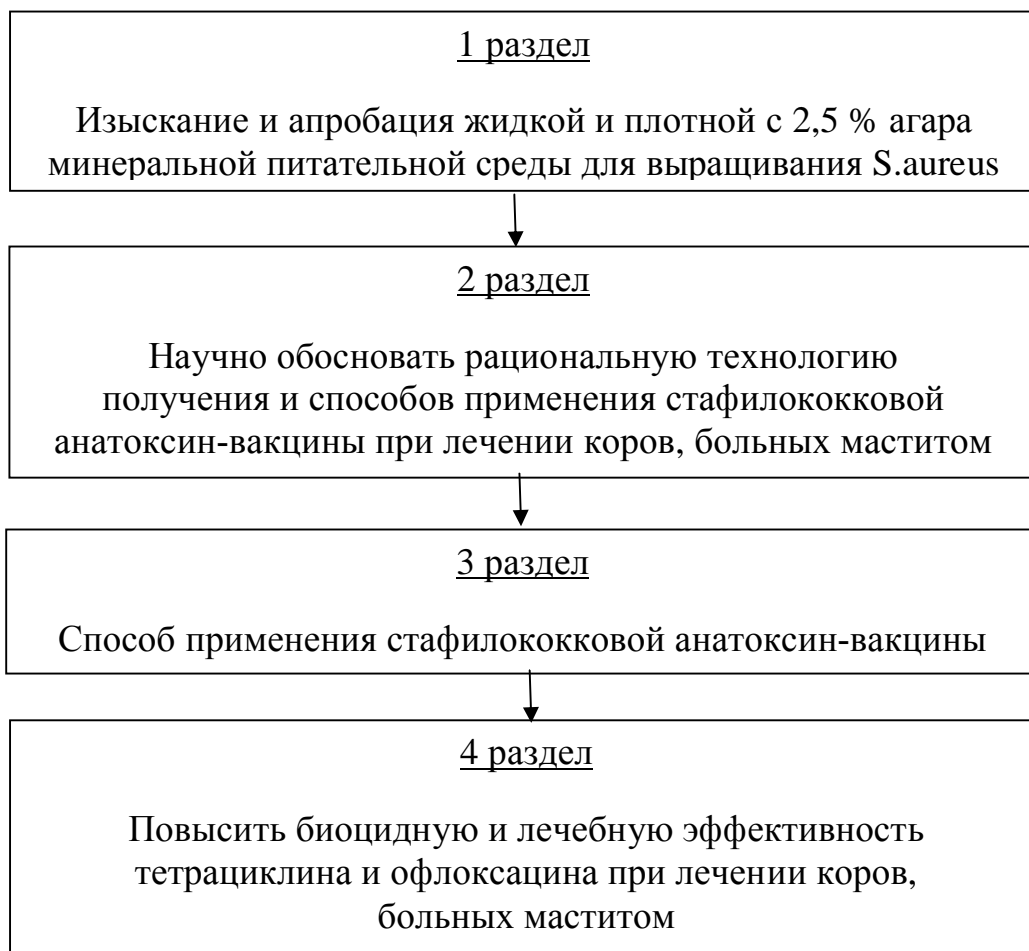


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

### **3.2 Изыскание рационального состава синтетической питательной среды для выращивания стафилококков и получения стафилококковой анатоксин-вакцины**

В настоящее время биофабричное производство стафилококковой анатоксин-вакцины для ветеринарной и гуманной медицины базируется на выращивании золотистого стафилококка на мясогидролизатном или казеиногидролизатном глицериновом бульоне в биобутылях с подачей углекислого газа для усиления токсинообразования и проведение детоксикации и полимеризации комплекса токсинов 0,5-0,7 % формальдегидом.

Основными недостатками технологии является слабое накопление стафилококков при выращивании на мясогидролизатном бульоне до 3-4 млрд/мл и использование формальдегида и ртутьсодержащего консерванта, обладающие канцерогенными свойствами. Кроме того формальдегид не обеспечивает полноту детоксикации стафилококковых токсинов и, соответственно, получения неполноценного анатоксина.

Для исключения балластных веществ мяса, казеина и повышения накопления стафилококков и их токсинов необходимо было разработать оптимальный состав синтетической питательной среды с доступными солевыми компонентами.

Несмотря на универсальность естественных (МПБ, МПА, МПГБ) и синтетических питательных сред для многих микроорганизмов возникает необходимость изыскания состава синтетических питательных сред, обладающие селективными, избирательными свойствами для определенного микроорганизма.

Основой создания синтетической питательной среды явилось использование лимонной, янтарной, фумаровой органических кислот цикла Кребса (цикла ди- и трикарбоновых кислот), аспарагином, глицерином и солевыми компонентами, микроэлементами с глицерином. Изучено, что для

выращивания стафилококков необходимо повышенное содержание хлористого натрия и слабощелочной реакции в пределах 7,3-7,5 при конструировании питательных сред были изготовлены составы с разной концентрацией кислот, солей и микроэлементов. Особое внимание обращали на сохранность химических ингредиентов при разных температурных режимах и сроках хранения от 5°C до 40°C в течение 1 года. С учетом растворимости солевых компонентов в растворе лимонной кислоты были приготовлены варианты жидких питательных сред после предварительного смешивания разных концентраций ингредиентов в сухом виде при последующем внесении глицерина и нейтрализации 5% аммиаком до 7,4-7,6 до автоклавирования.

Приготовленные варианты жидких синтетических питательных сред расфасовали в 2-х литровые биобутыли с объемом среды, равной 1 литру. Стерилизацию проводили автоклавированием при 1 атм. в течение 30 минут. Посев суспензии стафилококков проводили из 100 и 200 мл флаконов в 2-х литровые биобутыли с объемом среды, равной 1 литру. Выращивание проводили в течение 10-12 суток при ежедневном встряхивании суспензии микроорганизмов в биобутылях.

Концентрацию стафилококков определяли по стандарту мутности в пробирках от 1 млрд/мл до 2,0 млрд/мл, а экзо- и эндотоксинов путем высушивания и сжигания 1-2 мл раствора в фарфоровых тиглях.

После многократных контрольных испытаний был определен оптимальный состав синтетической питательной среды, обеспечивающая максимальное накопление стафилококков и концентрацию экзо- и эндотоксинов.

Оптимальный состав синтетической жидкой питательной среды, представлен в таблице 1 и 2.

Представленный вариант синтетической питательной среды включает доступные ингредиенты, которые хорошо растворяются в дистиллированной воде. В отличие от наиболее распространенных питательных сред, предложенный состав не содержит дорогостоящих и дефицитных импортных ингредиентов, в том числе аспарагина.

Предложенный окончательный вариант среды был использован для выращивания лабораторных и свежесделанных *S.aureus* в 2-х и 5-ти литровых биобутылях.



Таблица 1 – Оптимальный состав жидкой синтетической питательной среды для выращивания стафилококков при получении анатоксин-вакцин

№ п/п	Наименование компонентов	Количество в граммах
1	Лимонная кислота	5
2	Фосфорнокислый калий 2-х замещенный	3
3	Фосфорнокислый натрий 2-х замещенный	3
4	Хлористый натрий	2
5	Сернокислый цинк	0,3
6	Сернокислый магний	1,0
7	Сернокислое железо	0,5
8	Глицерин	30 мл
9	Дистиллированная вода	До 1 литра

Реакция среды устанавливается 5 % аммиака до 7,4 – 7,6 перед автоклавированием.

Иллюстрация состава синтетической питательной среды представлена на рисунке 2.

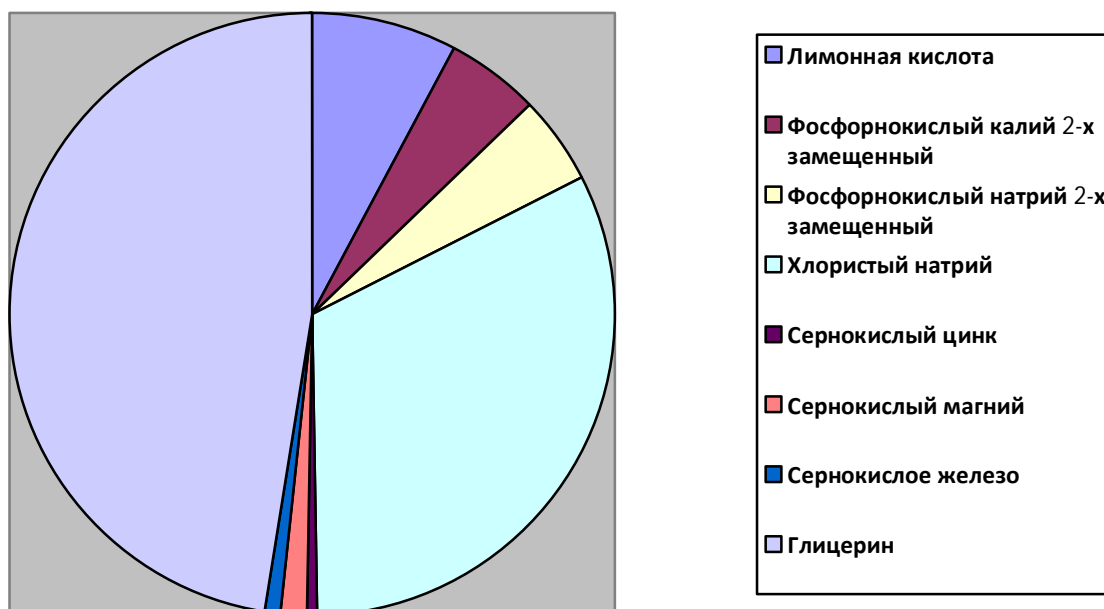


Рисунок 2 – Состав синтетической питательной среды

Полученные результаты культивирования микроорганизмов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Рост и накопление *S.aureus*

№ п/п	Наименование микроорганизмов	Сроки выращивания (суток)	Синтетическая среда		Мясопептонгидролизатный глицериновый бульон	
			Концентрация <i>S.aureus</i>	содержание экзо- и эндо-токсина	концентрация <i>S.aureus</i>	содержание экзо- и эндо-токсина
1	Лабораторный штамм <i>S.aureus</i>	5	4-5 млрд/мл	0,4 мг/мл	1-2 млрд/мл	0,2 мг/мл
		10	9-11 млрд/мл	0,9 мг/мл	3-4 млрд/мл	0,3 мг/мл
2	Свежевыделенный штамм <i>S.aureus</i>	5	4-5 млрд/мл	0,4 мг/мл	1-2 млрд/мл	0,2 мг/мл
		10	9-11 млрд/мл	0,9 мг/мл	3-4 млрд/мл	0,3 мг/мл

Из полученных данных следует, что максимальное накопление лабораторных и свежевыделенных *S.aureus* при выращивании на жидкой синтетической среде составляет 9-11 млрд/мл. В то же время при выращивании *S.aureus* на МПГБ концентрация биомассы и комплекса токсинов после автоклавирования составляет 3-4 млрд/мл, что практически более чем вдвое меньше показателей при использовании синтетической питательной среды.

Иллюстрация роста *S.aureus* в 2-х литровых биобутылях представлены на рисунке 3.



### 3.3 Получение плотной питательной среды с 2,5 % агара для определения чувствительности стафилококков к антибиотикам

С учетом нестабильного состава мясогидролизатнопептонного глицеринового бульона и низкой концентрации *S.aureus* по сравнению с предложенной синтетической жидкой питательной средой были приготовлены плотные среды с 2,5 % агара для ускоренного выделения стафилококков. В сравнительном аспекте были изготовлены и апробированы два варианта плотной среды с 2,5 % агара при разведении минеральной среды 1:1 и 1:2 при выращивании *S.aureus* в пробирках со скошенным агаром. После выращивания лабораторных и свежевыделенных *S.aureus* был установлен ускоренный рост на плотной питательной среде при разведении жидкой синтетической среды в соотношении 1:1.

Состав плотной минеральной среды с 2,5 % агара представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав плотной синтетической среды с 2,5 % агара для выделения и поддержания стафилококков

№ п/п	Наименование солевых компонентов	Количество в граммах
1	Лимонная кислота	2,5
2	Фосфорнокислый калий 2-х замещенный	1,5
3	Фосфорнокислый натрий 2-х замещенный	1,5
4	Хлористый натрий	1
5	Сернокислый цинк	0,2
6	Сернокислый магний	0,5
7	Сернокислое железо	0,25
8	Агар	2,5
9	Глицерин	15 мл
10	Дистиллированная вода	До 1 литра

Иллюстрация состава плотной минеральной среды представлена на рисунке 4.

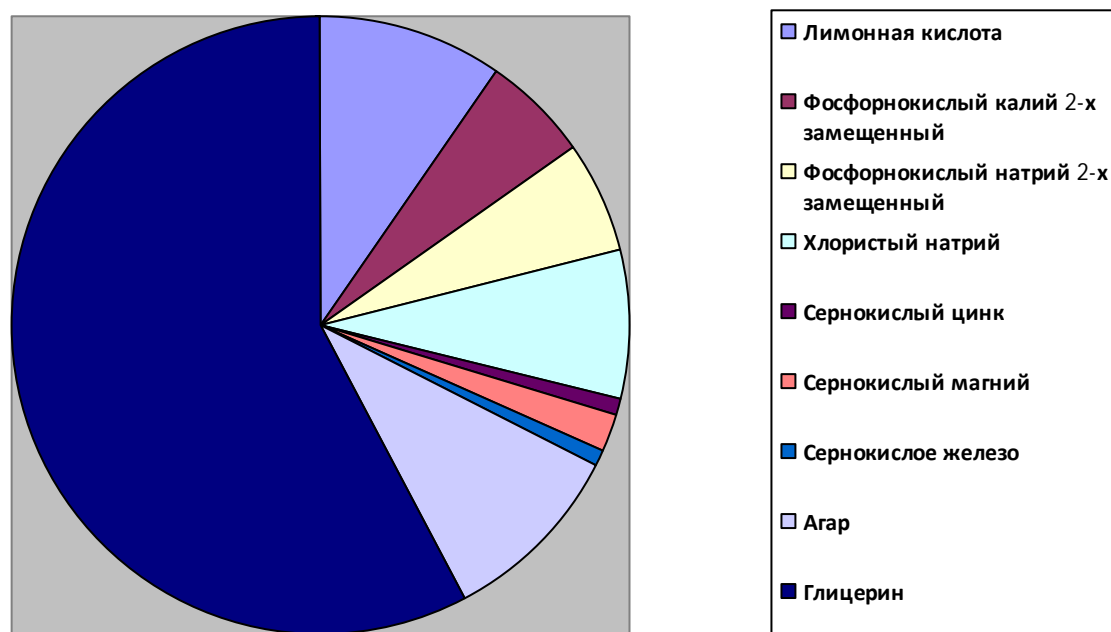


Рисунок 4 – Состав плотной минеральной среды

Нейтрализацию питательной среды с 2,5 % агара проводили 5 % аммиаком до 7,4-7,5 перед автоклавированием.

После посева *S.aureus* пастеровской петлей из суспензии бульонной культуры происходило полное покрытие поверхности агара в пробирках в течение 3-4 суток. Полученные результаты роста *S.aureus* на плотной питательной среде были использованы для определения чувствительности стафилококков к антибиотикам.

### 3.4 Результаты получения и применения стафилококковой анатоксин-вакцины

Повсеместное распространение стафилококков, способность вызывать более 100 различных болезней, в том числе пищевые отравления.

Повышенная их устойчивость к природным и химическим антибиотикам вызывает необходимость разработки рациональных технологий повышения протективной и лечебной эффективности анатоксин - вакцин и биоцидного и терапевтического действия антибактериальных препаратов.

Современная терапия и профилактика стафилококковых болезней предусматривает стимуляции иммунологической реактивности организма средствами активной профилактики с помощью анатоксина или вакцины и пассивный с использованием гипериммунных сывороток и иммуноглобулинов.

Изучено, что наиболее активным средством против стафилококкозов является анатоксин, т.к. патогенное действие многих микроорганизмов обусловлено токсинами, а ответные защитные реакции организма проявляются антитоксическими антителами.

На этом основана профилактика бактериальных болезней формоланатоксиннами и формолвакцинами, а терапия соответствующими сыворотками.

Для лечения животных от стафилококкозов впервые Н. Олштейн в 1936 году получил и применил анатоксин. Подкожные введения и примочки пораженных участков кожи анатоксином ускоряли прекращение нагноения, сокращали продолжительность болезни и обеспечивали выздоровление.

Наличие в препарате анатоксинов и обезвреженных автоклавированием стафилококков не отражало истинную трактовку, название препарата – анатоксином. Правомерным является предложенное название анатоксин-вакцина.

Использование мясогидролизатного пептонного глицеринового бульона не обеспечивало максимального накопления стафилококков, а 0,5-0,7 % формальдегид не приводил к полной детоксикации токсинов и следовательно, превращение их в полноценный анатоксин.

В последнее время установлено, что полноту детоксикации стафилококковых и стрептококковых токсинов обеспечивает этоний и другие четвертичные аммониевые соединения.

С учетом того, что многие альдегиды способны алкилировать аминосульфидрильные, карбоксильные группы белков и низкомолекулярные органические соединения возникло биотехнологическое обоснование повышения активности стафилококковой анатоксин-вакцины путем выращивания микроорганизмов на синтетических питательных средах и подборы более эффективных, доступных и экологически безопасных детоксикаторов и полимеризаторов комплекса токсинов.

В основе получения стафилококковой анатоксин-вакцины использовали синтетическую жидкую питательную среду для выращивания стафилококков. В сравнительном аспекте использованы более эффективные детоксикаторы и полимеризаторы стафилококковых токсинов глутаровый альдегид с алкилдиметилбензиламмония хлоридом или формальдегидом. Обеспечение полной детоксикации и инактивации стафилококковых токсинов - аллергенов получено с помощью глутарового альдегида с этонием и глутаровым альдегидом с алкилдиметилбензиламмония хлоридом. В целом этоний и алкилдиметилбензиламмония хлорид являются четвертичными аммонийными соединениями и проявляют сходные биоцидные, дезинфицирующие и лечебные свойства.

Сравнительная оценка полноты детоксикации и инактивации стафилококковых токсино – аллергенов не выявила различий между эффективностью глутарового альдегида с этонием или глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом.

В то же время при детоксикации стафилококковых токсино-аллергенов 0,3%; 0,5%; 0,7% и 1,0 % формальдегида установлена незавершенность полноты инактивации аллергенных и токсических свойств комплекса

стафилококковых токсинов. Совместимость глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом, промышленный их выпуск, экологичность и экономическая доступность определили технологическую обоснованность изготовления стафилококковой анатоксин-вакцины.

Проведенные способы изготовления и применения определили технологическую схему получения стафилококковой анатоксин-вакцины представленную на рисунке 5.



Рисунок 5 – Схема изготовления стафилококковой анатоксин-вакцины

Учитывая широкое распространение маститов кокковой этиологии было проведено испытание стафилококковой анатоксин-вакцины.

С этой целью было отобрано 340 коров, больных катаральным и гнойно-катаральным маститом стафилококковой этиологии, которые были разделены на 2 группы по 170 животных.

В первую группу входили 170 коров, в молоке которых при бактериологическом исследовании было выделено две культуры *S.aureus*, *E. coli* и *S. epidermidis*.

Для лечения коров, больных маститом использовали стафилококковую анатоксин-вакцину, которую вводили ежедневно больным животным интрацистернально – по 5 мл в течение 2-3 дней. Через десять дней проводили исследование секретов вымени с мастидином и на бактериологическую обсемененность. После лечения коров, больных маститом САВ реакция с мастидином сохранялась у 4 животных, в секрете вымени которых обнаружено культуры *S aureus* и *E. coli*. Выздоровело 100 коров (80%).

Во вторую группу было включено 170 коров, которых лечили мастисаном в дозах согласно наставлению по его применению. Выздоровело 85 животных (50 %).

Следует отметить, что мастисан в своем составе содержит антибиотики и сульфаниламиды (бензилпенициллин, стрептомецин, тетрациклин, сульфадимезин), который длительное время – до 10-15 дней выделяются с молоком.

Перед лечением из секрета вымени коров выделены культуры *S. aureus*, *E. coli* и *S. epidermidis*. Полученные результаты представлены в таблице 5.



Таблица 5 – Лечебная эффективность стафилококковой анатоксин-вакцины и мастисана при катаральном и субклиническом мастите у коров в молочном комплексе «Надежда» Большесолдатского района Курской области

Группы животных	Количество коров	Препарат	Выздоровело
1	170	Стафилококковая анатоксин-вакцина	155 коров (90%)
2	170	Мастисан–А в течение 4-5 суток	115 коров (67%)

Из данных, представленных в таблице 5 следует, что эффективность лечения коров, больных субклиническим и катаральным маститом САВ составило 90 % , а мастисаном-А – 67%, т.е. на 23 % меньше.

Результаты лечения коров, больных гнойно-катаральным маститом приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Сводные данные лечения коров, больных гнойно-катаральным маститом

№ п/п	Количество коров	Вид препарата	Сроки лечения	Наличие S aureus		Выздоровело
				до лечения	после лечения	
1	30	Стафилококковая анатоксин - вакцина	2–3 суток	S aureus у 30 коров	Не выделены	28
2	30	Мастисан–А	4–5 суток	S aureus у 30 коров	Выделены у 18 коров	20

Из данных, представленных в таблицах 5 и 6 следует, что наиболее эффективным при лечении коров, больных гнойно-катаральным маститом является стафилококковая анатоксин-вакцина. Из-за наличия в препарате 0,3 % глутарового альдегида и 0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида проявлялось биоцидное действие на микрофлору практически у всех коров, используемых в опыте.

Особую практическую ценность стафилококковая анатоксин-вакцина проявила при лечении коров, больных гнойно-катаральным маститом.

Исследования проводили в молочном комплексе «Надежда» и учхозе «Знаменское».

В указанных хозяйствах исследования коров на мастит проводят согласно ветеринарного законодательства через 1–1,5 месяцев.

Изучено, что гнойно-катаральный мастит проявляется как осложнение катарального мастита, травмированием тканей канала соска и сосковой цистерны с поражением в 2-3-х долей вымени.

При этом пораженная доля вымени не уменьшается после сдаивания из-за того, что молочные ходы заполнены густым экссудатом.

В исследовании использовано 180 коров с положительной пробой с 10 % раствором мастидина по образованию слабого или плотного сгустка. В пробах молока выявлены стафилококки, стрептококки, кишечная палочка, тетракокки.

Для лечения перед отелом коров, больных маститом использовали стафилококковую анатоксин-вакцину и мастисан-А.

Сводные данные о мастите и секрете вымени коров, больных маститом перед отелом представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Микрофлора секрета вымени коров, больных маститом перед отелом в молочном комплексе «Надежда» Большесолдатского района Курской области

№ п/п	Количество коров	Состояние вымени коров	Микрофлора	
			S aureus	E. coli
1	180	Субклинический и катаральный мастит	Выделены S. aureus у всех коров	Выделены S. epididymis у 40 коров
2	180	Гнойно- катаральный мастит	Выделены S. aureus у всех коров	Выделены S. epididymis у 15 коров

Из данных, представленных в таблице 7 следует, что секрет вымени коров перед отелом содержал S. aureus и E. coli у 360 коров, больных маститом.

После лечения коров мастисаном-А отмечено, что у 38 животных, из секрета вымени изолировано 28 культур золотистого стафилококка. Лечебная эффективность составляла – 50 %, т.е. выздоровело 90 животных, а после интрацистернального введения в течение 2-3 суток выздоровело 150 коров (80%).

Таким образом, сравнивая лечебное действие стафилококковой анатоксин-вакцины и мастисана-А следует отметить неоспоримое преимущество при мастите стафилококковой анатоксин-вакцины превосходящей на 30 % терапевтическую эффективность мастисана, содержащего антибиотики и сульфаниламиды.

Установлена безвредность, лечебная эффективность и преимущество стафилококковой анатоксин-вакцины при лечении коров, больных маститом в молочном комплексе «Надежда» Большесолдатского района Курской области. В дальнейшем препарат использовали с лечебной и

профилактической целью в учхозе «Знаменское» Курской ГСХА в осенний и весенний периоды года, результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Лечебная эффективность стафилококковой анатоксин-вакцины и мастисана-А при лечении коров, больных субклиническим и катаральным маститом в осенний и весенний периоды

Группа животных	Наименование препарата	Количество коров, больных маститом	Дозы и кратность введения	Процент выздоровления
<i>Осенний период</i>				
1	Стафилококковая анатоксин-вакцина	60	5-7 мл 2-3 дня	80 %
2	Мастисан-А	40	10 мл 4-5 дней	45 %
<i>Весенний период</i>				
1	Стафилококковая анатоксин-вакцина	40	5-7 мл 2-3 дня	80 %
2	Мастисан-А	20	10 мл 4-5 дней	40 %

Из данных, представленных в таблице 8, при лечении коров, больных маститом, следует, что стафилококковая анатоксин-вакцина обеспечивает выздоровление коров после 2-3 кратного введения, а при лечении коров мастисаном-А продолжительность лечения составила от 4 до 8 дней. Содержание антибиотиков сдерживает использование молока в течение 14-20 дней, а при лечении стафилококковой анатоксин-вакциной молоко и молочные продукты используют без ограничения.

Проблема мастита у коров связана с потерей молока, снижением его качественных показателей, состоянием здоровья новорожденных телят т.к.

молозиво является кроме основного источника питательных веществ, но еще и носителем защитных иммуноглобулинов, поступающих к новорожденному.

Изучено, что молодняк, выпаиваемый молоком от больных маститом коров, плохо развивается, заболевает диспепсией и погибает. Однако до сих пор не определена этиологическая связь между бактериальным маститом у коров и диспепсией новорожденных телят.

В связи с вышеизложенным возникла необходимость изучить этиологическую связь между маститом у коров стафилококковой этиологии и заболеваемостью диспепсией телят, полученных от этих коров.

Для исследования использовано 75 коров, которые распределены по 25 животных в каждой группе и, соответственно, количество, полученных телят.

Коровы, больные субклиническим и катаральным маститом в первой группе лечили мастисаном-А, во второй группе стафилококковой анатоксин-вакциной, а третья группа 25 коров, больных маститом оставлена в качестве контроля, т.е. без лечения.

У выделенных *S.aureus* и *E.coli* выявлено антибиотикочувствительность с использованием стандартных дисков с антибиотиками. При этом установлена устойчивость к полимиксину, гентамицину, неомицину, канамицину, амоксициллину и офлоксацину. В связи с полученными результатами было предложено соответствующее лечение.

Результаты проведенных исследований дают основание считать, что молозиво от больных маститом коров отрицательно влияло на состояние желудочно-кишечного тракта новорожденных телят, способствовало развитию у них диарей, тогда как у коров, леченных стафилококковой анатоксин-вакциной заболеваемость молодняка не проявлялась.

По-видимому, решающее значение в развитии болезни у новорожденных телят имеют низкие иммунные показатели молозива от больных маститом коров и загрязненность *S. aureus* и *E. coli*.

Заболевание характеризовалось частой дефекацией, жидким водянистым поносом, гнилостным запахом с примесью слизи. От всех заболевших телят до начала лечения были взяты пробы кала и направлены в лабораторию для бактериологического исследования. Во всех случаях были выделены патогенные *S. aureus* и *E. coli*.

Успешная детоксикация и полимеризация стафилококковых экзо- и эндотоксинов глутаровым альдегидом с алкилдиметилбензиламмония хлорида и лечебная и биоцидная эффективность стафилококковой анатоксин вакцины использовано для изучения биоцидной активности линкоспектина, тетрациклина, офлоксацина и получения вазелиновой мази для лечения коров, больных маститом.

### **3.5 Результаты повышения биоцидной эффективности тетрациклина и офлоксацина при лечении коров, больных маститом**

В настоящее время антибактериальные препараты разделены на природные и полусинтетические, синтезированные бактериями, грибами, растениями и синтетические, химические. В зависимости от источника получения различают 6 видов антибиотиков. Из 10000 различных антибиотиков в гуманной и ветеринарной медицине используют 150-200 препаратов, не считая дженериков и «кормовых» антибиотиков. В целом «кормовые» антибиотики в странах ЕС запрещены, а в США и ряде других стран 80% свиней, 50% индеек, цыплят и 10 % крупного рогатого скота выращиваются с применением антибиотиков. Обычно через 1-3 года после применения нового поколения антибиотика появляются устойчивые

микроорганизмы, а «кормовые» антибиотики формируют полирезистентность.

Установлено, что более 80 % бактериальной устойчивости обеспечивают ферменты, разрушающие антибиотики.

В настоящее время преодоление бактериальной резистентности проводится с помощью сочетания разных групп, создание новых более сильных препаратов с клавулановой кислотой, полученной в 1976 году из продукта метаболизма гриба *Streptomyces clavuligeris* в Словении не получило желаемого успеха.

Комплекс коммерческих химических антибиотиков из группы хинолонов, содержащие атом фтора в положении 6 цикла гетероциклической системы хинолона объединены общим названием фторхинолоны. Следует отметить, что 1 мг/л фтора способен вызвать ожоги слизистых кожи. Рекламированная зубная паста с фтором из-за противопоказаний изъята из производства, а для повышения биоцидного действия в состав фторхинолонов ввели трилон-Б, аргинин, колистин. Однако на фоне повышенной токсичности и дозы фторхинолоны не обеспечивают должного биоцидного и лечебного действия.

Впервые повышение ряда анатоксин-вакцин и антибиотиков в том числе левомецитина, метронидазола, энрофлоксацина, офлоксацина было достигнуто Ан.А. Евглевским и Д.А. Евглевским с помощью детоксикации и полимеризацией вначале 0,2-0,3 % формальдегида или 0,1-0,3 % глутарового альдегида с 0,2-0,5 % этония, а затем с 0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида. Однако канцерогенные свойства формальдегида, бета – пропилактона и дефицитность этония вызвали необходимость изыскания новых детоксикаторов и полимеризаторов бактериальных токсинов и антибиотиков. Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение обеспечения стабильной и полной детоксикации и

полимеризации стафилококковых токсинов позволили испытать способ повышения биоцидного и лечебного действия антибиотиков.

Положительные результаты биоцидного и лечебного действия стафилококковой анатоксин-вакцины с помощью глутарового альдегида и алкилдиметилбензиламмония хлорида были использованы для повышения биоцидного действия офлоксацина и тетрациклина, снижения дозы антибиотиков и изготовления мази для лечения коров, больных маститом.

Исходя из результатов исследований был определен способ получения экспериментальных тетрациклина и офлоксацина с помощью 0,1 % глутарового альдегида и алкилдиметилбензиламмония хлорида вместо дефицитного этония. Технология изготовления препаратов представлена на рисунке 6.

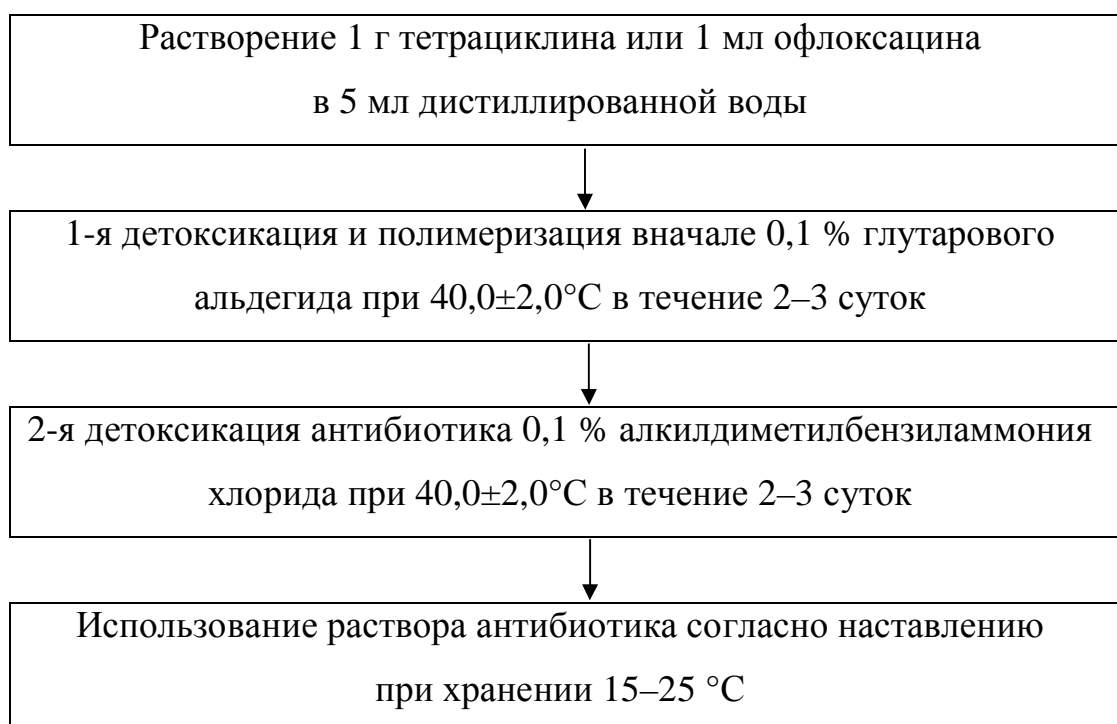


Рисунок 6 – Способ изготовления экспериментальных тетрациклина и офлоксацина детоксикацией и полимеризацией



При изготовлении экспериментальных детоксикацией и полимеризацией антибиотиков в больших объемах проводят растворение антибиотика из расчета 1–10–100 г порошка тетрациклина или 10 и 100 мг офлоксацина в 5–50–100 мл физиологического раствора или дистиллированной воды соответственно. Полученные экспериментальные препараты были подвергнуты исследованию на безвредность и биоцидные свойства.

*Испытание экспериментальных тетрациклина и офлоксацина на безвредность.*

Изучение токсичности экспериментальных антибиотиков проводили на 16 белых мышах путем подкожного введения ежедневно по 0,1 мл в течение 3–х суток. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты изучения экспериментальных антибиотиков на токсичность

№ п/п	Наименование препарата	Количество мышей	пало	выжило
1	Тетрациклин производственный (контроль)	4	3 (75%)	1
2	Офлоксацин производственный (контроль)	4	3 (75%)	1
3	Тетрациклин с 0,2 % формальдегида и 0,1% АДБАХ	4	3 (75%)	1
4	Офлоксацин с 0,2 % формальдегида и 0,1% АДБАХ	4	3 (75%)	1
5	Тетрациклин с 0,1 % глутаровым альдегидом и 0,1% АДБАХ	4	1 (25%)	3
6	Офлоксацин с 0,1 % глутаровым альдегидом и 0,1% АДБАХ	4	1 (25%)	3

Из представленных в таблице 9 данных следует, что практически белые мыши на введение экспериментальных тетрациклина или офлоксацина с

0,1 % глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида остались живы и на месте введения не было некротических поражений. В то же время 75 % белых мышей погибло на введение контрольных серий тетрациклина и офлоксацина с 0,2 % формальдегида и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида.

### 3.6 Мониторинг чувствительности стафилококков к производственным и экспериментальным тетрациклину и офлоксацину

Определение чувствительности *S. aureus* проводили в отношении повышенной до 10000/мл микроорганизмов. Результаты изучения биоцидных свойств экспериментальных и производственных тетрациклина и офлоксацина представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Оценка биоцидного действия экспериментальных и производственных тетрациклина и офлоксацина в отношении *S. aureus*

№ п/п	Наименование антибиотика	10000/мл <i>S. aureus</i> выделенных от коров, больных гнойно-катаральным маститом
1	Производственный тетрациклин	15–17 мкг/мл
2	Экспериментальный тетрациклин с 0,1 % ГА и 0,1 % АДБАХ	9–11 мкг/мл
3	Производственный офлоксацин	15–17 мкг/мл
4	Экспериментальный офлоксацин с 0,1 % ГА и 0,1 % АДБАХ	9–11 мкг/мл
5	Раствор 0,1 % ГА с 0,1 % АДБАХ	12–13 мкг/мл

где ГА – глутаровый альдегид и АДБАХ – алкилдиметилбензиламмония хлорид.

Из данных, представленных в таблице 10 следует, что экспериментальные тетрациклин и офлоксацин проявили бактерицидное действие на суспензию 10000 мл стафилококков в диапазоне 9-10 мкг/мл, а производственные проявили активность в пределах 5-17 мкг/мл. Установленное повышенное биоцидное действие 0,1 % ГА с 0,1 % АДБАХ на *S.aureus* явилось основанием изготовления крем-эмульсии без антибиотиков.

Исходя из полученных положительных результатов по повышению биоцидных свойств экспериментальных тетрациклина и офлоксацина был определен способ получения и испытания крем-эмульсии с тетрациклином, офлоксацином с 0,1 % глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензил-аммония хлорида. Способы изготовления крем-эмульсии представлены на рисунке 7.

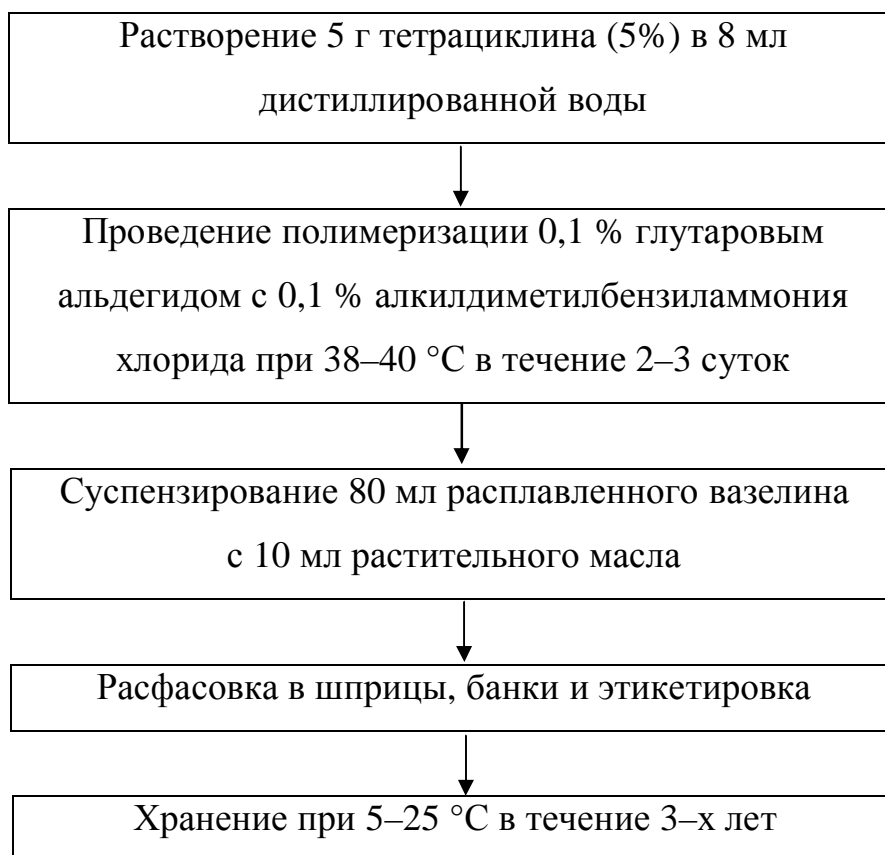


Рисунок 7 – Способ изготовления мази с тетрациклином

С учетом высокой биоцидной эффективности глутарового альдегида превышающая в 2-3 раза формальдегид и при биоразложении 90 % были изготовлены мази без антибиотиков.

Полученные препараты были использованы для лечения коров, больных маститом.

Лечение коров, больных маститом проводили путем дву и трехкратного интрацистернального введения коровам после доения с помощью шприца 10 мл крема-эмульсии с экспериментальными антибиотиками в каждый сосок и смазывание кожи вымени в течение 2-3 суток обеспечивало полное прекращение истечения из сосков вымени и заживления трещин на поверхности сосков и вымени. В то же время двух-трехкратное интрацистернальное введение коровам после доения с помощью шприца 5-10 мл крема-эмульсии и смазывание кожи вымени производственным офлоксацином или тетрациклином обеспечивало прекращение истечений из сосков и заживление трещин на поверхности сосков и вымени через 5-6 суток, а у отдельных коров процесс лечения протекал до 9-11 суток.

Сводные данные лечения коров, больных маститом представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты лечения коров, больных маститом

№ п/п	Название препарата	Кол-во коров, больных катаральным и гнойно-катаральным маститом	Сроки лечения (сутки)	Выздоровели
1	Тетрациклиновая мазь с ГА и АДБАХ	75	2 - 3	60
2	Офлоксациновая мазь с ГА и АДБАХ	75	2 - 3	60
3	Мазь с ГА и АДБАХ без антибиотиков	75	2 - 3	55
4	Мазь с тетрациклином без ГА и АДБАХ	45	6 - 7	30

где ГА - глутаровый альдегид;

АДБАХ – алкилдиметилбензиламмония хлорид.

Из представленных в таблице 10 результатов следует, что мази с экспериментальными тетрациклином и офлоксацином с 0,1% глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида и мази без антибиотиков с 0,1% глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида практически обладали равным терапевтическим действием при лечении коров, больных маститом.

В то же время при равном терапевтическом эффекте мази при лечении коров, больных маститом с 0,1% глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида без антибиотиков обеспечивают выпуск молока без ограничения срока.

Из результатов исследований следует, что повышение биоцидного и лечебного действия крем – эмульсии, мази с тетрациклином и офлоксацином достигнуто детоксикацией и полимеризацией  $0,15 \pm 0,05$  % ГА с  $0,15 \pm 0,05$  % АДБАХ при 38-40 °С в течение 2-3 суток с последующим внесением в 80 мл расплавленного вазелина и 10 мл растительного масла.

Полученные результаты по изготовлению и применению мази с экспериментальным тетрациклином и офлоксацином обеспечивают устранение трещин сосков, шероховатость кожи вымени и сокращение срока лечения коров, больных маститом.

В отличие от существующих линиментов (limier – втирать) мазей, крема – эмульсии предложенные препараты с усовершенствованием антибиотиками путем полимеризации 0,1 % глутаровым альдегидом и 1 % АДБАХ в 2 – 3 раза повышает лечебную эффективность.

Полученные результаты исследований позволили разработать рациональный состав жидкой и плотной синтетической питательной среды для выращивания и выделения стафилококков при получении стафилококковой анатоксин-вакцины и способ и средства выделения чистой культуры. Проведенная полимеризация стафилококковых токсино-

аллергенов с помощью 0,2-0,3 % глутарового альдегида с 0,2-0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида повысило биоцидные и лечебные свойства стафилококковой анатоксин-вакцины, антибиотиков и лекарственных средств в форме мази, крем-эмульсии без антибиотиков при лечении коров, больных маститом.

#### 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертация оформлена по традиционной форме и состоит из общей характеристики работы, обзора литературы, результатов исследований и их обсуждения, выводов и практических предложений и списка литературы.

Общая характеристика работы включает проблемы и актуальность работы, цель и задачи исследований, апробацию результатов исследований и положений, выносимых на защиту. Указанные составные компоненты отражают проблемы и перспективы их решения.

Исходя из актуальной проблемы повышения специфических и терапевтических свойств стафилококковой анатоксин-вакцины и биоцидной и лечебной эффективности лекарственных средств для профилактики и лечения коров, больных маститом были определены цель и задачи исследований.

Исходным началом диссертационной работы явилось проведение обзора литературы по основным задачам исследований, в частности представлены состояние, достижения и перспективы повышения эффективности профилактики и лечения коров, больных маститом.

Обзор литературы посвящен анализу современных источников по структуре и функции иммунной системы, молочной железы коров, характеристике стафилококков, способам получения и недостатки технологии изготовления стафилококковой анатоксин-вакцины и ее использования для лечения коров, больных маститом, мониторингу биологических свойств стафилококков, механизмов биоцидного и лечебного действия антибиотиков и проявления моно и полирезистентных микроорганизмов. Приоритет полученных результатов защищен патентом на способ получения стафилококковой анатоксин-вакцины № 2468078 от

27.11.2012 года, публикацией научных статей и апробацией их на научных конференциях.

В целом обзор литературы состоит из 8 подразделов, отражающие актуальность проблемы, цель и задачи исследований и стратегию перспективных исследований по совершенствованию диагностики, профилактики и лечению коров, больных маститом средствами и методами микробиологического выделения чистой культуры стафилококков, совершенствованию синтетических жидкой и плотной питательных сред, технологии получения и применения стафилококковой анатоксин-вакцины и повышению биоцидного и терапевтического действия природных и синтетических антибиотиков с помощью эффективных детоксикаторов и полимеризаторов токсино-аллергенов, вместо канцерогенного формальдегида, бета-пропилактона и ртутисодержащего мертиолята.

В целом представленные источники в последовательном и взаимосвязанном изложении определили перспективные исследования диссертационной работы.

Первый подраздел исследований посвящен анализу литературы, посвященный структуре и функции молочной железы в зависимости от породы, сезона года и функционирования в разные физиологические периоды, и условиям и средствам по профилактике и лечению нарушений ее функции. По данному разделу проанализировано более 30 научных источников [12, 125, 129, 136, 142].

На основе обзора литературы по анализу причин возникновения, способов и средств лечения коров, больных маститом представлены сведения о роли различной микрофлоры (микоплазм, стафилококков, стрептококков, грибов, актиномицетов, кишечной палочки), травмы, трещины сосков и вымени, загрязненная подстилка, доильных аппаратов, действие низких и



высоких температур, охлаждение, химические раздражители [124, 134, 152, 163].

Рядом авторов определены границы количества соматических клеток при заболеваемости коров, больных маститом от 400 тыс/см<sup>3</sup> и предложены разные средства и способы диагностики проб молока с мастидином, димастином [27, 37, 126, 131, 145].

Особую ценность представляют данные об идентификации выросших микроорганизмов, а для стафилококков реакция плазмокоагуляции, эффективности и недостатки антибиотикотерапии и перспективные исследования по их замене.

Для выращивания стафилококков используют в основном мясопептонный глицериновый и мясогоидролизатный бульоны и практически отсутствуют синтетические питательные среды, свободные от балластных веществ мяса, казеина, пептона и т.д.

При разработке синтетической питательной среды для выращивания стафилококков использованы солевые компоненты, глицерин, микроэлементы из ранее сконструированных питательных сред для выращивания микобактерий туберкулеза и ряда других микроорганизмов.

Изыскание питательной среды проводили в направлении замены или снижения концентрации дорогостоящих и дефицитных аспарагина, глицерина, нитрата аммония с помощью ряда ди- и трикарбоновых органических кислот (цикл Кребса или цикл лимонной кислоты).

Доказано, что ди- и трикарбоновые органические кислоты являются ведущим инструментом ассимиляционного процесса обмена веществ у микроорганизмов, животных, человека и растений.

В последующих главах представлены сведения о гео- и электромагнитного воздействия на биологические свойства стафилококков и других микроорганизмов, данные о вирусах и физиологии стафилококков,

достоинствах и недостатках природных питательных сред и перспективы разработки синтетических сред для выращивания стафилококков при изготовлении стафилококковой анатоксин-вакцины.

Изучение источников литературы позволило проводить исследования по использованию ряда солевых компонентов и микроэлементов при разработке рационального состава синтетической питательной среды, обеспечивающая максимальное накопление стафилококков и способу и средствам выделения чистой культуры.

Заключительные разделы обзора литературы содержат современные данные о свойствах стафилококковых токсино-аллергенов, средствах их детоксикации и полимеризации вместо формальдегида, о механизмах биоцидного действия антибиотиков и проявления устойчивости к ним микроорганизмов.

Анализ современных источников определил рациональные направления исследований по созданию синтетических питательных сред, изысканию более эффективных детоксикаторов и полимеризаторов стафилококковых токсино-аллергенов, изготовлению и применению экспериментальных природных и синтетических антибиотиков и лекарственных форм для лечения коров, больных маститом [38, 153, 162, 172].

В соответствии с задачами и разделами исследований необходимо было изыскать и апробировать оптимальный состав синтетической питательной среды для выращивания стафилококков при получении анатоксин-вакцины.

Основу создания синтетической питательной среды составило использование ряда органических кислот – лимонной, янтарной, пировиноградной, кислот цикла Кребса, внесение солевых компонентов – магний, фосфор, натрий, микроэлементов, хлористого натрия, глицерина при

изъятии или снижении содержания амида аспарагиновой кислоты – аспарагина.

Хороший и стабильный рост стафилококков получен на вариантах сред с лимонной и янтарной кислотами при нейтрализации среды 5,0-10,0 % раствором аммиака.

В последующих исследованиях стабильные результаты по накоплению бактериальной массы стафилококков были получены при внесении в состав среды одной лимонной кислоты при замене цитрата аммония. Увеличение количества лимонной кислоты до 10 г/л дистиллированной воды, а ее нейтрализация раствором аммиака приводит к образованию цитрата аммония и естественно его внесение в состав среды явилось излишним.

Использование лимонной кислоты в питательной среде имеет ряд преимуществ перед другими органическими кислотами цикла Кребса. Лимонная кислота образует комплексы со многими катионами, а так же обычные соли сукцинаты способствуют полному растворению ряда ингредиентов, солей микроэлементов, что весьма важно при конструировании синтетических питательных сред, включающие различные по своей химической природе соединения.

Особое внимание было обращено на полное растворение фосфорнокислого калия, сернокислого цинка, сернокислого магния, хлористого натрия и других химических ингредиентов.

В начале в состав среды было введено железо в форме лимоннокислого аммиачного зеленого. Выбор основывали на возможной большей совместимости вносимых солей и их лучшей растворимости.

Однако это соединение железа с успехом для роста микроорганизмов заменили на сернокислый, а для улучшения буферной емкости среды использовали хлористый натрий и сернокислый натрий.

Особо следует отметить, что при избыточном подщелачивании (нейтрализации) среды 5 % раствором аммиака питательную среду можно вновь нейтрализовать лимонной кислотой.

После многократных испытаний был определен оптимальный состав синтетической питательной среды, обеспечивающая стабильный рост стафилококков до 9–11 млрд/мл после 11–13 суточного выращивания в 2-х литровых бутылках с объемом среды равной 1 литру [71, 207, 214].

Максимальное накопление стафилококков позволило увеличить концентрацию эндотоксинов после воднотермического гидролиза (автоклавирования) микроорганизмов, необходимых для изготовления анатоксин-вакцины.

Стабильный рост стафилококков на жидкой синтетической питательной среде был положен в основу изготовления плотной минеральной среды с 2,5 % агара по типу использования мясопептонного агара.

Испытание питательных свойств плотной среды определило возможность изготовления среды при разведении 1:1 или 1:2 синтетической среды с 2,5 % агара. На предложенной плотной среде скошенной поверхности пробирок или в чашках петри происходил сплошной рост стафилококков через 2-3 суток после посева микроорганизмов.

Стабильный рост стафилококков на поверхности плотной минеральной среды с 2,5 % агара был использован для определения чувствительности стафилококков к антибиотикам.

Полученные результаты по разработке состава жидкой и плотной минеральной среды, выращиванию стафилококков и способа их выделения согласуются с данными многих авторов и создают основу для получения стафилококковой анатоксин-вакцины и изучению биологических свойств, чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, дезвеществам.

Проблема повсеместного гео- и электромагнитного воздействия на живые организмы, многочисленность исследований по изучению влияния на биологические свойства стафилококков остается малоизученным и разрозненным [72, 121].

В определенной степени нарушения физиологического состояния макро- и микроорганизмов при геомагнитном и электромагнитном воздействии, недостатки тех или иных макро- и микроэлементов, стрессе необходимо считать эндемическими, региональными (от греч. *endemos* – местный), болезнями, а при массовом проявлении имеются биогеохимические или факторные [74, 123].

Пробел в этом направлении был частично решен в сообщениях многих исследователей и полученных нами результатов на проявление у стафилококков устойчивости к антибиотикам, температуре, дезинфицирующим средствам (полученные данные следует учитывать в качестве маркеров при проведении санитарных и лечебных мероприятий).

Следующим разделом исследований явилось получение и применение стафилококковой анатоксин-вакцины. В сообщениях В.И. Покровского, О.К. Поздеева (1999), А.И. Коротаева (1998) указывается, что энторотоксины стафилококков обладают устойчивостью к действию формалина и не превращаются в полноценные анатоксины, а этоний обеспечивает полноту детоксикации и инактивации стафилококковых и стрептококковых токино-аллергенов [200, 208, 210].

Однако способы детоксикации стафилококковых токсино-аллергенов с помощью одного этония или других детоксикаторов и в сочетании с формальдегидом или другими альдегидами не изучены.

Известно, что постинфекционный иммунитет при стафилококкозе обусловлен как гуморальными, так и клеточными факторами. Ведущая роль

принадлежит анатоксинам, антитоксическим, антимикробным и антиферментным антителам, Т-лимфоцитам и фагоцитам [201, 216].

В опытных вариантах изготовления стафилококковой анатоксин-вакцины проводили по традиционному способу путем детоксикации токсино-аллергенов 0,3-0,5 % формальдегидом при 40<sup>0</sup>С в течение 3-5 суток.

Недостатком предложенной анатоксин-вакцины явилось гибель 40-50 % белых мышей после 3-х подкожных введений САВ в объеме 0,1 мл. В последующем формальдегид был заменен на 0,2-0,3 % глутаровый альдегид с 0,2-0,3 % этония. Целесообразность использования глутарового альдегида объяснялось повышением в 2-3 раза биоцидного действия формальдегида при высокой степени биоразложения свыше 90 % и повышенной полимеризующей активностью [45, 42, 199].

Применение этония – бесчетвертичное аммониевое соединение – этилен–бисдиметил–карбодецелоксиметил аммоний дихлорид основано на способности проявлять детоксицирующие действия на стафилококковой и стрептококковой токсины, а широкое его применение в виде мазей, паст для заживления ран, трофических гнойных язвах, трещинах сосков дерматозах, стоматитах, лучевых поражений кожи, при язвах роговицы, кератитах в определенной степени создали основу для повышения лечебных, ранозаживляющих свойств стафилококковой анатоксин-вакцины.

Полученная анатоксин-вакцина не вызвала гибели белых мышей, сокращала сроки выздоровления больных маститом коров при интрацистернальном введении.

Однако дефицитность этония и комплексное одновременное использование глутарового альдегида (ГА) и алкилдиметилбензиламмония хлорида (АДБАХ) являются как этоний четвертичным аммониевым

соединением вызвало интерес при изготовлении стафилококковой анатоксин-вакцины.

Проверка токсичности путем подкожного введения белым мышам и морским свинкам 0,1-0,3% глутарового альдегида отдельно и с 0,2-0,3 % АДБАХ не вызвало гнойных поражений кожи и гибели животных.

Это создало предпосылки изготовления САВ путем детоксикации и полимеризации токсинов 0,2-0,3 % ГА с 0,2-0,3% АДБАХ [69, 218, 202].

Полученная САВ с успехом использована при лечении коров, больных маститом, трещин кожи сосков и вымени.

Заключительный раздел посвящен изысканию средств и способов повышения биоцидной и лечебной эффективности природных и синтетических антибиотиков в форме растворов *in vitro* и *in vivo* в форме мази, крем-эмульсии.

Известно, что применение антибиотиков вызывает устойчивость у микроорганизмов [71, 206, 215, 217].

Проведенный мониторинг чувствительности стафилококков в разных районах Курской области выявил повышенную устойчивость ко многим антибиотикам и повышенную резистентность в регионе с повышенным геомагнитным полем в зоне Курской магнитной аномалии [54, 55, 67, 68, 89].

В частности офлоксацин проявил бактериостатическое действие к 1000/мл и 10000/мл стафилококков в концентрации 0,5-1,0 мкг/мл, а МПК тетрациклина составила 2-3 мкг/мл.

С учетом детоксицирующего, полимеризирующего и биоцидного действия глутарового альдегида с АДБАХ при изготовлении САВ были проведены исследования по повышению биоцидной и лечебной эффективности антибиотиков-синтетического офлоксацина и природного тетрациклина в отношении стафилококков *in vitro* и при лечении коров, больных маститом.

Изучено, что создание и применение новых более сильных антибиотиков, сочетание одних антибиотиков с другими, внесение в их состав клавулановой кислоты, фтора, пиперазинового радикала, трилона-Б, колистина и т.д. не снижает их токсичности, а продолжает формировать резистентность к ним микроорганизмов [41, 63, 203, 205].

Научные публикации и патенты ряда авторов по повышению лечебного и биоцидного действия антибиотиков с помощью 0,2 % формальдегида с 0,2 % этония и 0,1 % глутарового альдегида отдельно и с этонием вызвали интерес и возможность обеспечения эффективности антибиотиков глутаровым альдегидом с другими четвертичными аммониевыми соединениями [52, 61, 171, 194, 198].

С учетом выпуска растворов глутарового альдегида с АДБАХ были изготовлены растворы с офлоксацином и тетрациклином.

После установления повышенной биоцидной эффективности экспериментальных офлоксацина и тетрациклина в отношении стафилококков были изготовлены мази и крем-эмульсии для лечения коров, больных маститом.

Полученные результаты при лечении коров, больных маститом в разных хозяйствах создали возможность и перспективу исследований по изготовлению мази, крем-эмульсии без антибиотиков на основе глутарового альдегида и АДБАХ.

Экспериментальное исследование при лечении коров, больных маститом, ссадин и трещин сосков и вымени с помощью мази, крем-эмульсии с глутаровым альдегидом и АДБАХ подтвердили терапевтическую эффективность препаратов и получения доброкачественного молока.

На основе полученных результатов разработана жидкая синтетическая питательная среда для выращивания стафилококков при получении САВ, а на ее минеральной основе создана плотная с 2,5 % агара среда для



выделения чистой культуры стафилококков, определен эффективный детоксикатор и полимеризатор стафилококковых токсино-аллергенов, состоящий из глутарового альдегида и АДБАХ для повышения лечебно-профилактической активности стафилококковой анатоксин-вакцины и биоцидного и терапевтического действия антибиотиков при лечении коров, больных маститом и гнойно-некротических поражений кожи сосков и вымени.

## 5 ВЫВОДЫ

1. Для выращивания стафилококков разработана синтетическая жидкая питательная среда, содержащая в 1 литре дистиллированной воды следующие солевые компоненты в граммах: лимонная кислота – 5 г; фосфорнокислый калий 2-х замещенный – 3 г; фосфорнокислый натрий 2-х замещенный – 3 г; хлористый натрий – 2 г; сернокислый цинк – 0,3 г; сернокислый магний – 1,0 г; сернокислое железо – 0,5 г; глицерин – 30 мл. Реакция среды устанавливается 5 % аммиаком до 7,4-7,5 перед автоклавированием.

2. После 11-13 суточного выращивания в 2-х литровых бутылках с объемом среды равной 1 литру, концентрация стафилококков достигает 9-11 млрд/мл.

3. Детоксикация и полимеризация комплекса стафилококковых токсинов с автоклавированными стафилококками 0,2-0,3 % глутарового альдегида с 0,2-0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида при 40°C в течение 2-3 суток обеспечивает получение стафилококковой анатоксин-вакцины, обладающей повышенным биоцидным действием к стафилококкам и эффективностью лечения коров, больных маститом.

4. Экспериментальная стафилококковая анатоксин-вакцина проявляет терапевтическую эффективность до 80 % при лечении коров больных маститом и позволяет использовать молоко без ограничений.

5. Стафилококковая анатоксин-вакцина обеспечивает выздоровление коров после 2-3 кратного введения, а при лечении коров мастисаном-А продолжительность лечения составила от 4 до 8 дней.

6. Полимеризация тетрациклина и офлоксацина 0,1 % глутаровым альдегидом с 0,2 % алкилдиметилбензиламмония хлорида при 40°C в течение 2-3 суток повышает биоцидные свойства в отношении 10000/мл стафилококков.

7. Мази, приготовленные с экспериментальными антибиотиками и мази с 0,1 % глутаровым альдегидом и 0,3-1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида без антибиотиков обеспечивают сокращение на 3-5 суток сроки лечения коров, больных маститом.

## 6 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Разработанную жидкую синтетическую питательную среду целесообразно использовать для выращивания стафилококков и получения стафилококковой анатоксин-вакцины, а плотную – с 2,5 % агара на основе синтетической питательной среды в разведении 1:1 или 1:2 для оперативного изучения чувствительности к антибиотикам.

2. Предложенный способ получения стафилококковой анатоксин-вакцины позволяет лечить коров, больных маститом, без антибиотиков.

3. Предлагаем использовать полученную экспериментальную стафилококковую анатоксин-вакцину и модифицированные антибиотики с помощью 0,1-0,3 % глутарового альдегида и 0,2-0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида и мази без антибиотиков для лечения коров, больных маститом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акатов, А.К., Стафилококки / А.К. Акатов // М.: Медицина, 1999.- 256 с.
2. Акатова, Е.А., Молекулярно – биологический подход к видовой идентификации коагулазоотрицательных стафилококков /Е.А. Акатова // ЖМЭИ.- 1993.- N 3.-С. 3 – 6.
3. Алексеев, А.Г., Холодов Ю.А. Электромагнитная экология / А.Г. Алексеев, Ю.А. Холодов // Актуальные вопросы применения магнитных и электромагнитных полей в медицине: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Л.,1990. – С.19
4. Алиев, Н.Н. Исследование биологического действия электромагнитных полей на ряд генетических свойств некоторых патогенных бактерий / Н.Н. Алиев // автореф.дис. канд.мед.наук. – Баку, 1996.- 23 с.
5. Алферов, О.А. Влияние ослабленного геомагнитного поля на некоторые свойства микроорганизмов / О.А. Алферов // Авиакосмическая медицина: Тез.докл. У1 Всесоюзн. симп. По космической биологии и авиакосмической медицине, Калуга, 5-7 июня 1999. – М.- Калуга, 1989.- Ч.II.- С.141 – 143.
6. Ачкасова, Ю.Н. Метаболизм и скорость размножения микроорганизмов, развивающихся при экранировании электрических и магнитных полей / Ю.Н. Ачкасова // Влияние электромагнитных полей на биологические объекты: Тр.Крым. гос.мед.ин-та. – Харьков, 1993. – Т.ЛШ. – С.51-56.
7. Безгин, В.М. Основы промышленной иммуобиотехнологии / В.М. Безгин, Н.Н. Быкова, В.Е. Козлов // Уч. пособие.- Курск: Изд-во КГСХА, 2011.- С.512.
8. Безгин, В.М. Практикум по основам биотехнологии / В.М. Безгин, В.Е.Козлов, А.В. Сверчков // Уч. пособие.- Курск: Изд-во КГСХА, 2009.- С.52.

9. Белоненко, Г.А. Особенности комбинированной антимикробной терапии при стафилококковом мастите / Г.А. Белоненко, Л.Д. Тараненко, Ю.С. Варенко // Вестн. хирургии.- 1993.- № 3-4. - С.96-98.
10. Бельский, В.В. Изучение изменений структуры популяций стафилококков / В.В. Бельский //ЖМЭИ.- 1989.- № 3.- С. 16-20.
11. Балкова, И.И. Влияние электромагнитного излучения на микрофлору молока / И.И. Балкова, А.Г. Самоделкин, В.И. Лопарев// Ветеринария. – 1994. - №9.- С.37 – 40.
12. Батраков, А.Я. Опыт лечения коров при маститах в совхозе «Детскосельский» / А.Я. Батраков // Записки Ленинградского Ордена Трудового Красного Знамени, СХИ. – Л., 1992.- Т.110.
13. Батраков, А.Я. Разработка и совершенствование профилактических и лечебных мероприятий при воспроизводстве крупного рогатого скота с высокой молочной продуктивностью / А.Я. Батраков: автореф. дисс.- Воронеж, 1998. – С.43.
14. Беляев, В.И. Адаптивность показателей организма устойчивых и восприимчивых к маститу коров / В.И. Беляев, О.С. Трусова и др. // Экономическая генетика растений и животных.- Кишинев, 1991.- С.16 – 18.
15. Бельский, В.В. Биофизические и медикобиологические аспекты магнитобиологии / В.В. Бельский, П.В. Калуцкий, М.П. Попов// Курск, 1997. – С.146.
16. Байрамова, Л.А., Исследование биологического действия магнитных полей на генетико – биохимические свойства стафилококка / Л.А. Байрамова // Материалы Всесоюз. симп. «Влияние искусственных магнитных полей на живые организмы». – Баку, 1992. – С.217 – 218.
17. Бронников, Ю.Н. Влияние постоянного магнитного поля на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам / Ю.Н. Бронников // Хи-

миотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов: Тез. докл. Всесоюз. конф. – М., 1983. – С. 61 – 63.

18. Бухарин, О.В. Экологическая детерминированность способности стафилококков к инаktivации ряда факторов естественной противoinфекционной резистентности / О.В. Бухарин // ЖМЭИ.- 1997.- № 4.- С. 60 – 63.

19. Бухарин, О.В. Дифференциация резидентной и транзитной стафилококковой микрофлоры при бактерионосительстве / О.В. Бухарин //Клин. лаб. Диагностика.- 1994.- № 1.- С. 44 – 46.

20. Бухарин, О.В. Характеристика антилизозимной активности золотистого стафилококка при разных типах течения экспериментальной инфекции / О.В. Бухарин // Бюл. эксперим. биологии и медицины.- 1999 б.- № 2.- С. 178 – 180.

21. Бухарин, О.В. Изменение биологических свойств стафилококков при воздействии природных сероводородсодержащих газов / О.В. Бухарин // ЖМЭИ.- 1994.- № 5.- С. 72 – 74.

22. Бригадиров, Ю.Н. Комплексная система мероприятий по профилактике и борьбе с респираторными и желудочно – кишечными болезнями свиней в современных условиях производства / Ю.Н. Бригадиров // Ю.Н. Бригадиров, О.В. Казимиров, С.В. Борисенко // Ветеринарная патология. – 2011. - №4. – С. 40 – 45.

23. Борисенко, С.В. Изучение влияния диоксинора орального на качественный и количественный состав микрофлоры фекалий больных диареей поросят / С.В. Борисенко // Ветеринарный врач. – 2012. - №3. – С. 12 – 15.

24. Бригадиров, Ю.Н. Диоксинор – оральный новый комплексный препарат при желудочно – кишечной и респираторной патологии свиней / Ю.Н. Бригадиров // Ю.Н. Бригадиров, Е.В. Михайлов, С.В. Борисенко// Актуальные проблемы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации:

Матер. 3-го съезда фармакологов и токсикологов России. – С. Пб., 2011. – С. 77 – 79.

25. Борисенко, С.В. Экономическая эффективность применения Диоксина оральное при желудочно – кишечных заболеваниях поросят / С.В. Борисенко // Иновационные процессы в АПК: Сборник статей 4 международной научно – практической конференции преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов. – М., 2012. – С. 109 – 111.

26. Воробьев, А.А. Современные направления в разработке новых иммунологических препаратов /А.А. Воробьев// Журнал микробиологии.- 1999.- №5. – С.16-21.

27. Василев, В.Г. Терапия коров, больных маститом в сухостойный период / В.Г. Василев // Ветеринария. – 1998. - №1. – С.38 – 41.

28. Васильев, В.Г. Морфологические изменения при скрытом мастите / В.Г. Васильев // Ветеринария. – 1998. - №12. – С.49 – 50.

29. Варганов, А.И. Экологически чистый противомаститный препарат / А.И. Варганов // Научные аспекты профилактики и терапии болезней сельскохозяйственных животных.- Воронеж, 1996.- С. 73.

30. Васильев, В.Г. Лечение коров, больных маститом / В.Г. Васильев // Ветеринария.- 1994.- №7.- С. 52 – 53.

31. Вейдрих, Г. Маститы сельскохозяйственных животных и борьба с ними / Г.Вейдрих // Перевод с немецкого А.В. Бесхлебного и В.А. Бесхлебного. - М., Колос.- С. 111, 1998.

32. Гончаров, В.П. Профилактика и лечение маститов у животных / В.П. Гончаров // М., Россельхозиздат, 1987. – С. 53.

33. Волкова З.И. Влияние постоянного магнитного поля на некоторые свойства патогенного стафилококка / З.С.Волкова, Н.А. Харькова.



34. Волкова З.С. Влияние постоянного магнитного поля на некоторые свойства патогенного стафилококка. /З.С.Волкова и др. // Журн. Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1996. – N1. – С. 145 – 146.

35. Дерябин, Д.Г. Способность к инаktivации факторов естественной резистентности в биологии и экологии стафилококков / Д.Г. Дерябин: автореф. дис. докт. мед. наук.- Челябинск, 1997.

36. Егорова, Н.В. Иммуногенная активность производственных и свежесыводенных стафилококков / Н.В. Егорова, Л.И. Корзая // Журнал микробиологии.- 2009.- №3. – С. 41 – 43.

37. Евглевский, Д.А. Способ профилактики мастита / А.А. Евглевский, Н.В. Воробьева, Д.А. Евглевский // Патент № 2239422 с приоритетом от 25.03.2003. – Бюл. №31. – опубликован 10.11.04.

38. Евглевский, Д.А. Способ получения стафилококковой анатоксин-вакцины / А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский, Л.А. Майстренко // патент № 2377013 с приоритетом от 16 апреля 2008 года. – Бюл. №36. – опубликован 27.12.2009.

39. Евглевский, А.А. Основы повышения эффективности стафилококковых биопрепаратов / Д.А. Евглевский, А.В. Поздеев, Б.М. Тагирмирзоев // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии.- №4. – 2012. – С.109 – 112.

40. Евглевский, Д.А. Потенцирование эффективности диагностики, профилактики и терапии бактериальных болезней животных / Д.А. Евглевский // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии.- №4. – 2012. – С.109 – 112.

41. Евглевский, Д.А. Потенцирование эффективности редуцирование токсичности антибиотиков полимеризацией / Д.А. Евглевский // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии.- №5 – 2012. – С. 66 – 67.

42. Евглевский, Д.А. Современные подходы к отбору иммунопротективных штаммов стафилококков при изготовлении анатоксин-вакцины / Д.А. Евглевский, Е.А. Тимкова, И.Г. Швакова // Сборник научных трудов Курских вузов «Актуальные проблемы образования и медицины», издательский центр «ЮМЭКС». – Курск, 2009. – С. 23 – 25.

43. Евглевский, Д.А. Результаты изучения факторов внешней среды на биологические свойства микроорганизмов / А.Ю.Айдиев, Д.А. Евглевский // Сб. науч. Тр. КГСХА «Современные проблемы ветеринарной медицины и животноводства».- Курск: Изд-во Курской ГСХА. – 2009. – С. 6 – 8.

44. Евглевский, Д.А. Получение и применение стафилококковых анатоксин-вакцин / А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский, В.В. Иванов // Материалы Всероссийской научно – практической конференции, посвященной 120 – летию ветеринарной службы Курской области. – Курск, 2009.- С. 130 – 132.

45. Евглевский, Д.А. Способ получения стафило – стрептококковой анатоксин-вакцины / А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский, Л.А. Майстренко // Патент № 2377016 с приоритетом от 27 декабря 2009 года. – Бюл. №36. – опубликован 27.12.2009.

46. Евглевский, Д.А. Способ получения стафилококкового аллергена / А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский, Л.А. Майстренко // Патент № 2378369 с приоритетом от 29. 04.200 года. – Бюл. №1. – опубликован 10.01.2011.

47. Евглевский, Д.А. Способ создания биологической модели аллергии к стафилококковому аллергену / А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский // Патент № 2405146 с приоритетом от 6 мая 2009 года. – Бюл. №33. – опубликован 29ю11.2010.

48. Зверева, Г.В.. Особенности выявления мастита у коров в период сухостоя / Г.В. Зверева // Научные аспекты профилактики и терапии болезней сельскохозяйственных животных.- Воронеж, 1996.- С. 73.

49. Зинькевич, В.Г. Воспаление молочной железы в период запуска и сухостоя и перинатальная патология у коров / В.Г. Зинькевич: автореф. канд. дисс.- Воронеж, 1999. – С. 24.

50. Ивашура, А.И. Гигиена производства молока / А.И. Ивашура // М., Россельхозиздат, 1994.- С. 127.

51. Иноземцев, В.П. Квантовая терапия коров при воспалительных заболеваниях матки и молочной железы / В.П. Иноземцев: докт. дисс.- С.Пб., 1999. – С. 369.

52. Иванов, Н.Р. Молекулярно – клеточные аспекты гемолитического действия стафилококкового  $\alpha$ - токсина / Н.Р. Иванов, Г.Е. Бриль // ЖМЭИ.- 1984.- № 9.- С. 3 – 9.

53. Игнатов, В.В. Биохимия стафилококка.- Саратов: Изд – во Сарат. ун – та, 1985, С. 147.

54. Калущий, П.В. Динамика изменений структуры популяций *Staphylococcus aureus* с различным уровнем иммунной защиты / П.В. Калущий: дис...канд.мед.наук. – Курск, 1988. – С. 128.

55. Калущий П.В. Магнитное поле как экологический фактор / П.В. Калущий, В.В. Киселева // Материалы Междунар. экологич. форума Современные экологические проблемы провинции.- Курск, 1995.- С. 116 – 117.

56. Карташова, В.М. Индикация патогенных бактерий в молоке и молочных продуктах / В.М Карташова.- М., 1993.

57. Карташова, В.М. Эффективность санитарных мероприятий в профилактике мастита коров/ В.М Карташова. – Ветеринария, 1995, №10.

58. Карташова, В.М. Контроль состояния вымени у коров / В.М Карташова// Ветеринария, 1987, №8.

59. Карташова, В.М. О формировании стада для молочных комплексов / В.М. Карташова, Н.К. Оксамитный // Молочное и мясное скотоводство.- 1987.- №1.

60. Копорина, Э.П. . Торможение молокоотдачи при нарушениях стереотипа машинного доения / Э.П. Копорина, С. Исрамлижанов // В кн.: Материалы IV Всесоюз. симпоз. по физиологическим основам машинного доения.- Алма – Ата, 1985.

61. Калитина, Л.А. Заболеваемость коров маститом в зависимости от экстерьерно – конституционного типа / Л.А. Калитина // Совершенствование племенных и продуктивных качеств в условиях Алтайского края.- Барнаул, 1992.- С. 30 – 36.

62. Камышанов, А.С. Мастит у высокопродуктивных молочных коров в период лактации и их высокопроизводительная функция / А.С. Камышанов: автореф. канд. дисс., 2000. – С. 24.

63. Кондаков, К.Э. Сравнительная характеристика иммуномодулирующих свойств белка *Staphylococcus aureus* различного происхождения / К.Э. Кондаков// ЖМЭИ.- 1999.- № 12.- С- 66.

64. Константинов, В.К. Изменение микрофлоры ран у больных гнойным маститом/ В.К. Константинов // Вестн. Хирургии.- 1997.- № 11.- С. 73 – 74.

65. Касымов, К.Т. Иммунологическая толерантность в патогенезе носительства патогенных стафилококков / К.Т. Касымов // Лаб.дело.- 1999.- № 5.- С. 30.

66. Кузьменко, О.М. Эффективность безклеточной стафилококковой вакцины «стафиловак» на показатели иммунной системы мышей / О.М. Кузьменко, Н.К. Ахматова, И.М. Груббер // Журнал микробиологии.- 2009.- №3. – С. 32 – 37.

67. Лигерс, Я.А. Влияние места с биолокальными аномалиями на заболеваемость коров маститом / Я.А. Лигерс // Вопросы ветеринарной фармации и фармакотерапии.- Рига, 1992.- С. 127 – 129.

68. Липовцев, И.П. Интраартериальные инъекции новакаина с пенициллином в среднюю маточную, во внутреннюю и наружную подвздошные

артерии коров при эндометритах и маститах / И.П. Липовцев: автореф. докт. дисс., 1994. – С. 32.

69. Логвинов, Д.Д. Болезни вымени у коров. Киев: Изд-во Урожай, 1999.

70. Мирцхулава, М.Б. Влияние электромагнитных полей геомагнитного диапазона на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам / М.Б. Мирцхулава // Магнитобиология и магнитотерапия в медицине: Тез.докл.Всесоюз.симп. с международным участием . – Сочи – Куйбышев, 1991. – С. 48 – 49.

71. Мусина, Л.Т. Оценка токсинообразования у *Staphylococcus aureus* с различной чувствительностью к метициллину / Л.Т. Мусина // ЖМЭИ.- 1955.- № 6.- С. 76 – 77.

72. Мутовин, В.И. Борьба с маститами коров / В.И. Мутовин.- М., 1974.

73. Новиков, О.Г. Рациональные методы применения диофура для лечения больных маститом коров / О.Г. Новиков: автореф. канд. дисс.- Воронеж, 1996.

74. Оксамитный, М.К. Субклинические маститы коров / М.К. Оксамитный.- Киев, Урожай, 1993. – С. 27.

75. Павлович, С.А. Влияние магнитных полей на микроорганизмы / С.А. Павлович: автореф. дис...докт. мед. наук.- Днепропетровск, 1976. – С. 23.

76. Павлович, С.А. Влияние магнитных полей на изменчивость грамотрицательных бактерий / С.А. Павлович // Материалы второго Всесоюз. совещ. по изучению влияния магнитного поля на биологические объекты. – М., 1989. – С. 173 – 176.

77. Поликарпов, Н.А. Солнечная активность и продукция потенциально – патогенными микроорганизмами факторов агрессии / Н.А. Поликарпов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологию – 1994. – № 6. – С. 19 – 20.

78. Поликарпов, Н.А. О влиянии солнечно – магнитной активности на точность лабораторных методов различения *Staphylococcus aureus* и *S.epidermidis* / Н.А. Поликарпов // Клинич. лаб. диагностика. – 1995. – № 5. – С. 49 – 52.

79. Поликарпов, Н.А. Гелиогеомагнитная активность и биологические свойства *Staphylococcus aureus* / Н.А. Поликарпов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1995. – № 6. – С. 8 – 9.

80. Поликарпов, Н.А. О связи показателей солнечно – магнитной активности и автоколебаний биологических свойств у субкультур *Staphylococcus aureus* 209 in vitro / Н.А. Поликарпов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1996. – № 1. – С. 27 – 30.

81. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология / О.К. Поздеев.- М. : ГЭОТАР – Медиа, 2010. – С. 768.

82. Падейская, Е.Н. Антимикробные препараты группы фторхинолонов / Е.Н. Падейская, В.П. Яковлев.- М. : Изд-во Логата, 1998. – С. 352.

83. Павлович, С.А. Влияние экранирования геомагнитного поля на золотистый стафилококк / С.А.Павлович // Влияние магнитных полей на биологические объекты: Материалы 3 – го Всесоюз.симп. – Калининград, 1985. – С. 58 – 59.

84. Париков, В.А. Мастит у коров (профилактика и терапия) / В.А. Париков // Ветеринария. – 2009. - №11. – С. 34 – 37.

85. Подберезный, В.В. Битерапия и биофилактика мастита у коров / В.В. Подберезный: автореф. докт. дисс.- Воронеж, 1995. – С. 384.

86. Полянцев, Н.И. Клинико – экспериментальная оценка маста – 30 / Н.И. Полянцев // Научные аспекты профилактики и терапии болезней сельскохозяйственных животных.- Воронеж, 1996. - С. 108.

87. Поляков, А.А. Об условиях получения молока высокого санитарного качества / В.М. Карташова // Вестн. с.-х. науки.- 1985.- №7.

88. Поликарпов, Н.А. О влиянии солнечно – магнитной активности на стафилококки / Н.А. Поликарпов // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. - №5. – С.49 – 52.

89. Поликарпов, Н.А. О связи показателей солнечно – магнитной активности на биологические свойства *Staphylococcus aureus in vitro* / Н.А. Поликарпов // ЖМЭИ. – 1996.- №1. – С. 27 – 30.

90. Райкис, Б.Н. Перспективы химической модификации антигенов / Б.Н. Райкис, Н.А. Иллютович // ЖМЭИ. – 1991. - №3. – С. 18 – 21.

91. Рамон, Г. 40 лет исследовательской работы / Г. Рамон // М.: Медицина, 1969. – С. 148.

92. Раскин, Б.М. Проблема питательных сред на современном этапе / Б.М. Раскин // ЖМЭИ. – 1998. - №6. – С. 84 – 88.

93. Сашина, Л.Ю. Эпизоотическая ситуация по респираторным болезням свиней и разработка новых средств, их профилактики и терапии / Л.Ю. Сашина: автореферат док. вет. наук.- М., 2013. – С. 54.

94. Самуйленко, А.Я. Биотехнология производства новых ветеринарных препаратов / А.Я. Самуйленко, В.И. Ермец, Т.А. Авдеева.- Харьков : Ветеринарная медицина. – 2005.- Вып.85. – С.959 – 961.

95. Самуйленко, А.Я. Биологические и технологические аспекты разработки и производства пробиотических препаратов / А.Я. Самуйленко.- Харьков: Ветеринарная медицина. – 2005. – Вып.85. – С. 959 – 961.

96. Самуйленко, А.Я. Перспективы направления в технологии культивирования бактерий при производстве вакцин для ветеринарной медицины / А.Я. Самуйленко, А.А. Раевский.- Харьков : Ветеринарная медицина. – 2005. – Вып.85. – С. 961 – 963.

97. Самуйленко, А.Я. Специфическая профилактика и антибиотикотерапия колибактериоза свиней / А.Я. Самуйленко, Д.А. Евглевский // Вестник

Курской государственной сельскохозяйственной академии.- 2013.- №7.- С. 52 - 53.

98. Семенова, И.Б. Принципы коррекции вторичных иммунодефицитов двумя различными по своей природе иммуномодуляторами – очищенными стафилококковым анатоксином и ликолипидом/ И.Б. Семенова // ЖМЭИ. – 2005. - №1. – С. 100 – 104.

99. Светоч, Д.И. Антимикробная активность бактерицина / Д.И. Светоч, И.П. Левчук // Антибиотики и химиотерапия.- 2011.- №1 – 2. – С. 3 – 7.

100. Сорокин, Г.В. Клиническая и фармакологическая эффективность амоксициллина, клавуланата (амоксиклава) / Г.В. Сорокин // Российский вестник педиатрии. – 2008. - №5. – С. 49 – 56.

101. Стегний, Б.Т. Ранняя диагностика и профилактика инфекционных болезней / Б.Т. Стегний, А.М. Коваленко, А.А. Евглевский и др. // Харьков : Ветеринарная медицина. – 2004. – Вып.84. – С. 570 – 576.

102. Степанова, Э.Д. Модификация питательных средств для выращивания условнопатогенных микроорганизмов / Э.Д. Степанова, Ю. Р. Юносова // Журн. Микробиологии.- 2012.- №2.- С. 117 – 119.

103. Скворцов, В.Н. Антимикробная активность офлоксацина в отношении микроорганизмов, выделенных от больных животных / В.Н. Скворцов, Н.А. Сафонова, В.В. Маханев // Ветеринарная патология.- М.: 2011.- №3.(37). – С. 98 – 101.

104. Солдатов, А.П. Генетическая устойчивость крупного рогатого скота к маститу / А.П Солдатов.- М., 1996.

105. Студенцов, А.П. Ветеринарное акушерство и гинекология / А.П. Студенцов, В.С. Шипилов.- М., Агропромиздат, 1986.

106. Тихонов И.В. Проблемы и перспективы биотехнологии / И.В. Тихонов, В.А. Гаврилов // Ветеринарная медицина. – 2007. - №3. – С. 31 – 33.



107. Тутов И.К. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов / И.К. Тутов, В.И. Ситьков // Ставрополь, Уч. пособие.- СГСХА, 1997. – С. 253.

108. Тофило, П.П. Влияние слабых магнитных полей на кинетику роста патогенных стафилококков в присутствии антибиотиков / П.П. Тофило // Магнитное поле в биологии, медицине и сельском хозяйстве: Тез.докл. II обл. науч. – практ. конф. – Ростов н/Д., 1985. – С. 52 – 53.

109. Чижевский, А.Л. Электрические и магнитные свойства эритроцитов. Киев, 1974. – С. 85.

110. Чижевский, А.Л. Земное эхо солнечных бурь. Изд. 2 – е. – М.: Мысль. – 1976. – С. 376.

111. Чижевский А.Л. Вся жизнь. Годы и люди. Изд-во Советская Россия, 1974. – С. 208.

112. Червинец, В.М. Изменчивость эшерихий в условиях геомагнитного поля / В.М. Червинец // Влияние магнитных полей на биологические объекты: Материалы 3 – го Всесоюзн. симпоз. – Калининград, 1985. – С. 54.

113. Червинец, В.М. Характеристика изменчивости бактерий в условиях моделирования пульсаций геомагнитного поля / В.М. Червинец: автореф. дис...канд.мед.наук. – Л., 1987. – С. 26.

114. Шахов, А.Г. Применение липотона для повышения терапевтической эффективности диоксигена при респираторных болезнях поросят / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина // Ветеринарный врач. – 2011. - №6. – С. 14 – 18.

115. Шахов, А.Г. Лечебная эффективность цидисепта в сочетании с липотоном при респираторных болезнях поросят / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина // Вестник РАСХН. – 2012. - №2. – С. 69 – 72.

116. Хилькевич, Н.М. О сочетаемости маститов и болезней матки и об их лечении у коров / Н.М. Хилькевич, С.Н. Хилькевич // Научные аспекты профилактики и терапии болезней сельскохозяйственных животных.- Воронеж, 1996. – С. 79 – 81.

117. Шахов, А.Г. Изменения ультраструктуры золотистого стафилококка, эшерихий и пастерелл под воздействием антимикробного препарата диоксинор / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина // Вестник РАСХН. – 2013. - №3. – С. 65 – 69.

118. Шахов, А.Г. Многофункциональные изменения у эшерихий, пастерелл и золотистого стафилококка под влиянием бактерицидных концентраций комплексного антимикробного препарата диоксиген / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашина, Д.В. Федосов // Ветеринария сегодня. – 2012. - №1 (4). – С. 18 – 23.

119. Яблоков, М.И. Комплексная противомаститная программа. «Профайзер» по крупному рогатому скоту. Союзмолоко / М.И. Яблоков. – М., 2013. – С. 29.

120. Яковлев, В.П. Фармакокинетическое взаимодействие между фторхинолонами и другими лекарственными средствами / В.П. Яковлев // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. - №7. – С. 36 – 44.

121. Яковлев, В.П. Фармакокинетическое взаимодействие между фторхинолонами и метилксантинами / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. - №3. – С. 35 – 41.

122. Яковлев, В.П. Антибактериальные препараты: современное состояние и перспективы / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. - №1. – С. 19 – 23.

123. Яременко, Н.А. Задачи по созданию эпизоотологического благополучия птицеводства России / Н.А. Яременко, С.С. Яковлев // Ветеринария. – 1998. - №12. – С. 3 – 7.

124. Alber G., Hammer D. K., Fleisher B. Relationship between enterotoxic – and T lymphocyte – stimulating activity of staphylococcal enterotoxin B // Immunol. 1990. V. 144? N 12. P. 4501 – 4506.

125. Amir M., Nasopharyngeal carriage \*\*\* Staphylococcus aureus and carriage of tetracycline-resistant strains associated w\*\*\* HIV-seropositivity // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1995. V. 14, N 1. P. 34 - 40 \*\*\*
126. Baselga R., Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis // Vet. Microbiol. 2004. V. 39, N 3-4. P. 195-204.
127. Bertino J. S. Intranasal mupirocin for outbreaks of methicillin-resistant Staphylococcus aureus // Am. J. Health Syst. Pharm. 2007. V. 54, N 19. P. 2185-2191.
128. Bhakdi S., Isolation and partial characterization of staphylococcal de-complementation antigen //Infect. Immun.2005 b. V. 47, N 1. P. 47-51.
129. Bhakdi S., Tranum J. J. Alpha-toxin of Staphylococcus aureus // Microbiol. Rev. 2009. V. 55, N4. P. 733-751.
130. Birgersson A. O. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders // Vet. Microbiol. 1998. V/ 31, N 2-3. P. 181-189.
131. Bonventre P. F. Toxicity of recombinant toxic shock syndrome toxin 1 and mutant toxins produced by Staphylococcus aureus in a rabbit infection model of toxic shock syndrome // Infect. Immun. 1998. V. 61, N 3. P. 793-799.
132. Booth M. C., Atkuri R. V., Nanda S. K. et al. Accessory gene regulator controls Staphylococcus aureus virulence in endophthalmitis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci \*\*\* . V. 36, N 9. P. 1828-1836.
133. Baddour L.M. Virulence ulase-deficient mutans of Staphylococcus aureus in experimental/ L.M. Baddour, M.M. Tayidi // Med. Microbiol. 2009. – V.41. – N.4. – P.259-263.
134. Bailey C.J. Smith epidermolytic toxins of Staphylococcus aureus / C.J. Bailey // Med. Microbioi. and Immunol. Berl. – 2009. – V. 41. – N.4. – P.259-263.

135. Balwit J.M. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells/ J. M. Balwit, P. J. Infect. Dis. – 2009 – V.170. – N.4. – P. 1033-1037.
136. Barhothy M.F. Biological effect of magnetis fields// Chicago: Nature. – 2009. – V.261. – N.34. – P.411-419.
137. Bartlett P.C. Clinical mastitis and intramammury infection on Ohio dairy farms/ P.C. Bartlett, J. Miller // Prev. Vet. Med. – 2009. – N.12. – P. 59-71.
138. Baselga R. *Staphylococcus aureus* capsule and meas virulence factors in ruminant mastitis/ R. Baselga, // Vet. Med. – 2009. – V.39. – N.3-4. – P.195-204.
139. Battish, V.K. Variations in growth of *S. aureus* after heat stress in milk / V.K. Battish, B. Natarai, // Fait., 2007. – Vol. 70. P. 453 – 457.
140. Cheung A. L., Insertional inactivation of a chromosomal locus that modulates expression of potential virulence determinants in *Staphylococcus aureus* // J. Bacteriol. 1995 a. V. 177, N 11. P. 3220 – 3226.
141. Christensen G. D. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis* // Infect. Immun. 2000. V. 58, N 9. P. 2906 - 2911.б
142. Coia J. E., Comparison of enterotoxins and haemolysins produced by methicillin-resistant (MSSA) *Staphylococcus aureus* // J. Med. Microbiol. 2002. V. 36, N 3. P. 164 – 171.
143. Cone L. A., A recalcitrant, erythematous, desquamating disorder associated with toxin-producing staphylococci in patients with AIDS // J. Infect. Dis. 2002. V. 165, N 4. P. 638 – 643.
144. Christensen, G. D. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis* / G. D. Christensen, L. P. Barker // Infect. Immun. – 2009. – V. 58. – N 9. – P. 2906 – 2911.

145. Christner, R. B. Role of staphylokinase in the acquisition of plasmin(ogen)-dependent enzymatic activity by staphylococci / R. B. Christner, M. D. Boyle // *J. Infect. Dis.* – 2006. – V. 173. – P. 104-112.
146. Cote, M. Bacterial exotoxin as superantigen in protein S. aureus / M. Cote // *Clin. Microbiol.* – 2009. – V. 8. – P. 411-426.
147. Dowd, J. E. Inhibition of antigen-specific cell activation by staphylococcal enterotoxins / J. E. Dowd, D. R. Karp // *J. Immunol.* – 2005. V. 154. – N 3. P. 1024-1031.
148. Dowd J. E. Inhibition of antigen-specific T cell activation by staphylococcal enterotoxins // *J. Immunol.* 2005. V. 154, N 3. P. 1024-1031.
149. Farrell A. M. Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the *Staphylococcus aureus* hyaluronate lyase gene // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 130, N 1. P. 81-85.
150. Ferens W. A. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by Staphylococcal enterotoxin C // *Infect. Immun.* 2008. V. 66, N 2. P. 573-580.
151. Fernandez C. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial to evaluate the safety and efficacy of mupirocin calcium ointment for eliminating nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among hospital personnel // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 35, N 3. P. 399-408.
152. Fleurette J. Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents // *Res. Microbiol.* 2009. V. 140, N 2. P. 107-118.
153. Ferens, W. A. Activation of Bovine lymphocyte subpopulations by Staphylococcal enterotoxin C / W. A. Ferens, W. C. Davis // *Infect. Immun.* – 2008. – V. 66. – N 2. – P. 573-580.
154. Fluckiger, U. Characterisation of sar homolog of *Staphylococcus epidermidis* / U. Fluckiger, K. Wolz, // *Infect. Immun.* – 2008. – V. 66. – N 6. – P. 2871-2878.

155. French, G. L. Hong Kong methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* have similar lence / G. L. French // *J. Hosp. Infect.* – 2000. – V. 15. – N 2. – P. 117-125.

156. Gatermann, S. Expression of *Staphylococcus saprofitos* surface properties is modulated by composition of the atmosphere / S. Gatermann, H. G. Meyer // *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* – 2005. – V. 184. – N 2. – P. 81-85.

157. Grant C. E., Sewell D. L., Pfaller M. et al. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative staphylococci to species level // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004. V.18, N 1. P. 1-5.

158. Greene C., Mc Devitt D., Francois P. et al. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 17, N 6. P. 1143-1152.

159. Gustafson J., Strassle A., Hachler H. et al. The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon // *J. Bacteriol.* 2004. V. 176, N 5. P. 1460-1467.

160. Harkaway K. S. Antibiotic resistance patterns in coagulase-negative staphylococci after treatment with topical erythromycin, benzoyl peroxide, and combination therapy // *Br. J. Dermatol.* 2002. V. 126, N 6. P. 586-590.

161. Harris T. O. Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins // *Infect. Immun.* 2003. V. 61, N 8. P. 3175-3183.

162. Harshman S. Staphylococcal alpha toxin: a study with chronically instrumented awake sheep // *Infect. Immun.* 2002. V. 60, N 9. P. 3489-3496.

163. Harshman S., Sugg N. Induction of muscle-relaxing factor by staphylococcal alpha-toxin // *Infect. Immun.* 2004. V. 62, N 2. P. 421-425.

164. Igimi S., *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dog with external ear otitis // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 2000. V. 40, P. 409-411.

165. Igimi S. Characterization of the most frequently encountered *Staphylococcus* in cats // *Vet. Microbiol.* 2004. V. 39, N 3-4. P. 255-260.

166. Jarlov J. O. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. V. 40, N 2. P. 241-249.

167. Jesudason M. V. Incidence of methicillin resistant coagulase positive and coagulase negative staphylococci in blood cultures // *Indian J. Med. Res.* 2007. V. 105, P. 155-157.

168. Jett M., Identification of staphylococcal enterotoxin B sequences important for induction of lymphocyte proliferation by using synthetic peptide fragments of the toxin // *Infect. Immun.* 2004. V. 62, N 8. P. 3408-3415.

169. Ji G., Beavis R. C., Novick R. P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 92, N 26. P. 12055-12059.

170. Johnson H. M. Staphylococcal enterotoxin superantigens // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2001. V. 198, N 3. P. 765-771.

171. Jonas D., Walev I., Berger T. et al. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. // *Infect. Immun.* 2004. V. 62, N 4. P. 1304-1312.

172. Jones J. W. A study of coagulase-negative staphylococci with reference to slime production, adherence, antibiotic resistance patterns and clinical significance // *J. Hosp. Infect.* 2002. V. 22, N 3. P. 217-227.

173. Jorgensen J. H. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 1999. V. 12, N 1. P. 14-19.

174. Kloos W. E., A comparison of the distribution of *Staphylococcus* species on human and animal skin // *Staphylococci and Staphylococcal Disease* / Ed. J. Jeliaszewicz. Stuttgart, 1996. P. 969.

175. Kobayashi N., Analysis of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by a molecular typing method based on coagulase gene polymorphisms // *Infect.* 2005. V. 115, N 3. P. 419-426.

176. Kreger A. S., Bernheimer A. W. Disruption of bacterial protoplasts and spheroplasts by *Staphylococcal delta toxin* // *Infect. Immun.* 2001. V. 3, N 3. P. 603-605.

177. Kum W. W., Improved purification and biologic activities of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 31, N 10. P. 2654-2660.

178. King I. W. Weather and earth's magnetic fields // *Nature.* – 1994. – V. 247, No1. – P. 131-134.

179. Kirschvink I. L. A paleomagnetic approach to the precambrian-cambrian boundary problem. Biogenic magnetite: its role in the magnetization of sediments and as the basis of magnetic field detection // *Diss.Abstr.Intern.* – 2009. – V. 40, No3. – P. 1096-1098.

180. Olmsted, S. B. Effect of specific antibody on adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells / S. B. Olmsted, N. L. Norcross // *Infect. Immun.* – 2002. – V. 60. – N 1. – P. 249-256.

181. Patel, A. H. Virulence of S protein-A and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement / A. H. Patel // *Infect. Immun.* – 2007. – V. 55. – 12.- P. 3103-3110.



182. Patrick, C. H. Relate-dens of strains of methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococcus colonizing hospital personnel and producing bacteremias in a neonatal intensive care unit / C. H. Patrick // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2002 a. – V. 11. – N 11. – P. 935-940.

183. Perl, T. M. Comparison of identification systems for Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative Staphylococcus species / T. M. Perl // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2004. – V. 18. – N 3. – P. 151-159.

184. Roberson, J. R. Ecology of Staphylococcus aureus isolated from various sites on dairy farms / J. R. Roberson, L. K. Fox, \*\*\* *Dairy. Sci.* – 2009. – V. 77. – N 1. – P. 3354-3364.

185. Roberson, J. R. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci / J. R. Roberson, L. K. Fox // *J. Clin. Microbiol.* – V. 30. – N 12. – P. 3217-3219.

186. Schwars S. Use of antimicrobials preparaty medicine and mechanism of resistance in S. aureus. // *Vet. Res.*, 2009. – Vol. 32. № 3-4 P. 201-205.

187. Stackebrandt E., Teuber M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria // *Biochimie.* 1998. V. 70, P. 317-324.

188. St. Geme J. W., Harris M.C. Coagulase-negative staphylococcal infection in the neonate // *Clin. Perinatol.* 1998. V. 18, N 2. P. 281-302.

189. Su Y. C., Wong A. C. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61, N 4. P. 1438-1443.

190. Sumita Y., Degradation penicillin-binding protein 2' in methicillin-resistant Staphylococcus aureus // *Chemotherapy.* V. 41, N 3. P. 172-177.

191. Sutra L., Pourel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovi \*\*\* intramammary infections due to Staphylococcus aureus // *J. Med. Microbiol.* 1994. V. 40, N 2. P. 79-89.

192. Tanabe T. Possible receptor for exfoliative toxins produced by Staphylococcus hyicus and Staphylococcus aureus // *Infect. Immun.* 1995. V. 63, N 4. P. 1591-1594.

193. Tanabe T. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus aureus* // *Vet. Microbiol.* 1996. V. 48, N 1-2. P. 9-17.

194. Takana M. Mechanisms of 4-quinolon\*\* resistance in quinolone-resistant and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* \*\*\* lates from Japan and China // *J. Med. Microbiol.* 1995. V. 42, N 3. P. 214-219.

195. Tani K. Autobacteriographic studies on the distribution and localization of *Staphylococcus aureus* in mice // *Nippon Saikingaku Zasshi.* 1995. V. 50, N 3. P. 871-879.

196. Tanimoto A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* forming the fried egg appearance colonies isolated from a patient with septicemia // *Rinsho. Byori.* 1995. V. 43, N 10. P. 1061-1065.

197. Teufel P., Gotz F. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 175, N 13. P. 4218-4224.

198. Timmerman C. P. Characterization of a proteinaceous adhesion of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene // *Infect. Immun.* 1999. V. 59, N 11. P. 4187-4192.

199. Todome Y. Superantigenic exotoxin production by isolates of *Staphylococcus aureus* from the Kawasaki syndrome patients and age-matched control children // *J. Med. Microbiol.* 1995. V. 42, N 2. P. 91-95.

200. Von. Eiff C. A site-directed *Staphylococcus aureus* hemB mutant is small-colony variant which persists intracellularly // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179, N 15. P. 4706-4712.

201. Voss A., Milatovic D., Wallrauch-Schwarz C. et al. Methicill \*\*\* resistant *Staphylococcus aureus* in Europe // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1994. V. 13, N 1. P. 50-55.

202. Walev I. Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions // *Infect. Immun.* 2003. V. 61, N 12. P. 4972-4979.

203. Walker B., Bayley H. Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270, N 39. P. 23065-23071.

204. Walmrath D., Scharamann M., Konig R. et al. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs // *J. Appl. Physiol.* 2003. V. 74, N 4. P. 1972-1980.

205. Watts J. L., Naidu A. S., Wadstrom T. Collagen binding, elastase production and slime production associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections // *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 28, N 3. P. 580-583.

206. Wegener H. C., Watts J. L., Salmon S. A., Yancey R. J. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs // *J. Clin. Microbiol.* 1994. V. 32, N 3. P. 793-795.

207. Wenzel R. P., Perl T. M. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection // *J. Hosp. Infect.* 1995. V. 31, N 1. P. 13-24.

208. Westh H. Erm genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci // *APMIS.* 2005 a. V. 103, N 3. P. 225-232.

209. Westh H., Hougaard D. M., Vuust J., Rosdahl V. T. Prevalence of erm gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988 // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005 b. V. 39, N 2. P. 369-373.

210. Wilcox M. H. True identity of control *Staphylococcus aureus* strains and their performance in the tube coagulase test // *J. Med. Microbiol.* V. 44, N 6. P. 496-499.

211. Wiley B. B., Rogolsky M. Molecular and serological differentiation of *Staphylococcal* exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control // *Infect. Immun.* 2007. V. 18, N 2. P. 487-494.

212. Wilkinson B. J., Peterson P. K., Quie P. Cryptic peptidoglycan and the antiphagocytic effect of the *Staphylococcus aureus* capsule: model for the antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers // *Infect. Immun.* 2009. V. 23, P. 502-508.

213. Wimblad S., Ericson C. Sensitized sheep red cell as a reactant for *Staphylococcus* protein A // *Acta Path. Scand.* 2003. Sect. B. V. 81, P. 150-156.

214. Yeaman M.R. Platelet microbicidal protein alone and in combination with antibiotics reduces *Staphylococcus aureus* adherence to platelets in vitro // *Infect. Immun.* 2004. V. 62, N 8. P. 3416-3423.

215. Yokomizo Y. Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens *staphylococcal* enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 // *J. Vet. Med. Sci.* 2005. V. 57, N 2. P. 299-305.

216. Yoshida E. Conversion of biological and immunological properties during a process of decapsulation in a strain of *Staphylococcus hyicus* // *J. Appl. Bacteriol.* 2001. V. 71, N 4. P. 347-353.

217. Zaria L. T. In vitro inhibition of some grampositive bacteria by *Staphylococci* and *Aerococcus viridians* of porcine origin // *Cent. Eur. J. Public. Health.* 2003. V. 1, N 2. P. 96-100.

218. Zavizion B. Effects of *Staphylococcus aureus* toxins on the growth of bovine mammary epithelial cells (MAC-T) in culture // *J. Dairy. Sci.* 2005. V. 78, N 2. P. 277-284.