

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

Красочки П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор^{1, 2}

Зуйкевич Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук¹

Морозов А.М., младший научный сотрудник¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ МОЛОКА ТРАНСГЕННЫХ КОЗ, С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СУБСТАНЦИЯМИ

Резюме

В статье изложены основные методы изучения эффективности действия рекомбинантного лактоферрина, полученного из молока трансгенных коз, с антибактериальными субстанциями. Приведены результаты исследования по изучению противомикробной активности, антибактериальных свойств, скорости формирования антибиотикорезистентности, бактерицидной и бактериостатической активности рекомбинантного лактоферрина и антибактериальных субстанций.

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин, антибактериальные субстанции, антибактериальная терапия инфекционных болезней животных, синергидный эффект, резистентность, комплексный препарат антибактериального действия.

Summary

The article presents the main studies of the effectiveness of the action of recombinant lactoferrin obtained from the milk of transgenic goats, with antibacterial substances. The results of the study of antimicrobial activity, antibacterial properties, the rate of formation of antibiotic resistance, bactericidal and bacteriostatic activity of recombinant lactoferrin and antibacterial substances.

Keywords: recombinant lactoferrin, antibacterial substances, antibacterial therapy for infectious diseases in animals, synergistic effect, resistance, and a complex antibacterial drug.

Поступила в редакцию 03.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших задач современного животноводства – получение здорового жизнеспособного молодняка, так как от состояния его здоровья зависит последующие рост, развитие, активная адаптация к неблагоприятным факторам окружающей среды и в конечном итоге – получение качественной продукции.

Заболевания органов дыхания и пищеварения у молодняка занимают одно из ведущих мест в инфекционной патологии. В хозяйствах чаще всего регистрируются ассоциированные вирусные и вирусно-бактериальные инфекции. Предрасполагающими факторами возникновения инфекционных пневмоэнтеритов являются стрессовые состояния, связанные обычно с нарушениями технологии содержания и кормления животных, использованием неполнценных и недоброкачественных кормов,

приводящих к угнетению иммунитета и ослаблению устойчивости организма к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды.

В такой ситуации возникает необходимость использования в ветеринарной медицине биологически активных препаратов природного происхождения, обладающих противовирусным, антимикробным и иммунопротективным действием. Данные соединения позволяют снизить количество применяемых химиотерапевтических средств и повысить тем самым качество получаемой сельскохозяйственной продукции [1]. Одним из таких препаратов является лактоферрин (ЛФ).

Лактоферрин – белок сыворотки молока млекопитающих, который представляет собой железосвязывающий многодоменный полифункциональный гликопротеид с молекулярной массой около 80 кДа,

отнесеный к семейству белков трансферринов [2]. Помимо молока, широко представлен в различных секреторных жидкостях организма, таких как слюна, слеза, секреты носовых желез. Кроме того, лактоферрин обнаружен в плазме крови, однако в значительно меньшей концентрации.

Молекула лактоферрина секретируется в свободной от железа форме (аполактоферрин) и обладает чрезвычайно высокой аффинностью к 3-валентному железу.

Лактоферрин является едва ли не единственным примером белка с уникальным набором биологических свойств различного характера. Будучи трансферриновым белком, он не только регулирует концентрацию ионов железа в крови и секретах, но и обладает ярко выраженным антимикробным, антивирусным и противогрибковым действием [3–5]. ЛФ считается одним из важнейших иммунных факторов молока. Он участвует в защитных реакциях организма и регулирует функции иммунокомпетентных клеток. Кроме того, установлены его противовоспалительные и противоопухолевые свойства [2].

Антибактериальная активность для этого белка была установлена в отношении ряда бактерий, включая патогенные для человека и животных штаммы *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Bacillus subtilis*. Было установлено, что бактериостатическая функция ЛФ определяется его способностью связывать железо из окружающей среды, что угнетает рост микроорганизмов.

Исследования по антибактериальной активности лактоферрина проведены ведущими научно-исследовательскими лабораториями Института Фридриха Леффлера (Германия), Научно-исследовательским институтом ветеринарной медицины в Пулавах (Польша); Институтом вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Россия); Ганноверским университетом имени Лейбница (Германия). В результате исследований установлена синергидная эффективность лактоферрина со следующими антибиотиками: стрептомицин, амфотерицин, доксициклин и др.

Отечественными учеными в ходе программ Союзного государства «БелРос Трансген» и «БелРосТрансген-2» в 2010 г.

первыми в мире получен трансгенный лактоферрин из молока коз-продуцентов, в ДНК которых был встроен ген, ответственный за его выработку. Также зарегистрирован препарат ветеринарный «Арголаферрин» (ТУ ВУ 600049853.285-2018, производитель РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»). Указанный препарат содержит рекомбинантный лактоферрин, коллоидное серебро и карбоксиметилцеллюзу. Предназначен для лечения и профилактики пневмоэнтеритов молодняка свиней.

Принимая во внимание тот факт, что рекомбинантные субстанции могут значительно отличаться по своим биологическим свойствам от субстанций природного происхождения, необходимо тщательное изучение антибактериальных свойств белорусского рекомбинантного лактоферрина, полученного от трансгенных коз, с целью оценки возможности его применения для конструирования комплексных антибактериальных ветеринарных препаратов.

В связи с этим **целью** нашего исследования была оценка эффективности применения рекомбинантного лактоферрина в комплексной антибактериальной терапии инфекционных болезней животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательская работа проводилась на базе отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского» и вивария института.

Было исследовано взаимодействие ранее подобранных антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином. Для этого были проведены исследования по изучению противомикробной активности, антибактериальных свойств, скорости формирования антибиотикорезистентности, бактерицидной и бактериостатической активности рекомбинантного лактоферрина и антибактериальных субстанций.

Противомикробную активность рекомбинантного лактоферрина и наиболее активных антибактериальных субстанций, отобранных на предыдущем этапе работы (цефепим, цефотаксим, ципрофлоксацин, цефтриаксон, амоксициллин), с рекомбинантным лактоферрином изучали по пока-

зателю минимальной ингибирующей концентрации (Minimal Inhibitory Concentration – MIC) [5].

Далее были проведены исследования по определению антибактериальной активности рекомбинантного лактоферрина и при совместном его применении с антибактериальными субстанциями. В качестве тест-культур для определения antimикробной активности использовали штаммы бактерий *Escherichia coli* (КМИЭВ-39А), *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-В112), *Proteus mirabilis* (КМИЭВ-44), *Klebsiella pneumoniae* (КМИЭВ-В106), *Pasteurella multocida* (КМИЭВ-95), депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского».

Тест-культуры бактериальных штаммов выращивали на мясо-пептонном агаре при температуре 37 °C в течение 24 ч. Концентрацию бактериальных клеток тест-культур доводили 0,85%-ным раствором хлористого натрия до 3,1 единиц МакФарланда с использованием денситометра «Biosan DEN-1».

Для постановки реакции в опытные пробирки с 4,5 см³ мясо-пептонного бульона вносили по 1,0 см³ испытуемого препарата (в т.ч. монокомпоненты препаратов), а затем – по 0,1 см³ взвеси тест-культуры. В контрольные пробирки с мясо-пептонным бульоном добавляли по 0,1 см³ тест-культур и определяли положительный контроль оптической плотности содержимого опытных пробирок. Для постановки отрицательного контроля в пробирки с мясо-пептонным бульоном вносили по 1,0 см³ каждого образца препарата (в т.ч. монокомпоненты препаратов). После перемешивания содержимого опытных и контрольных пробирок из каждой пробирки отбирали по 1,0 см³ содержимого, которое вносили в кюветы рабочей длиной (10,0±0,1) мм, и измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра «Metertech SP-8001 UV-VIS» при длине волны 590 нм. Оставшееся содержимое в опытных и контрольных пробирках выдерживали в термостате при температуре 37 °C в течение 3 ч, а затем проводили три последовательных измерения оптической плотности содержимого.

Антимикробную активность рекомбинантного лактоферрина и при совместном его применении с антибактериальными

субстанциями в отношении штаммов бактерий определяли по формуле:

$$AAP = 100 - ((D_2 - D_1) - (D_{2PR} - D_{1PR})) / (D_4 - D_3) \times 100 \%,$$

где AAP – антагонистическая активность препарата;

D_1 – оптическая плотность содержимого опытных пробирок в начале опыта;

D_2 – оптическая плотность содержимого опытных пробирок через 3 ч термостатирования;

D_{1PR} – оптическая плотность содержимого пробирки отрицательного контроля в начале опыта;

D_{2PR} – оптическая плотность содержимого пробирки отрицательного контроля через 3 ч термостатирования;

D_3 – оптическая плотность содержимого пробирки положительного контроля в начале опыта;

D_4 – оптическая плотность содержимого пробирки положительного контроля через 3 ч после термостатирования;

100 – максимально допустимое значение активности препарата.

Результаты исследований оценивали ежедневно в течение 3-4 суток по отсутствию или проявлению дегенерации клеток в опыте.

Определение скорости формирования антибиотикорезистентности проводили с использованием лактоферрина, полученного из молока трансгенных коз, его сочетания с цефотаксимом и цефепимом (субстанции, показавшие наибольшую эффективность на предыдущих этапах исследований) и микроорганизмов *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*.

Для исследования лиофилизированные микроорганизмы растворяли в стерильном изотоническом растворе и производили посев на питательную среду, после получения роста периодически пересевали. Пересевы хранили при температуре от 2 °C до 8 °C, перед опытом проводили пересев и инкубацию в течение 1–2 суток при температуре 37 °C.

В исследованиях использовали принцип диффузионного теста по Kirby-Bauer, но с применением стандартных лунок и объема растворов антибиотиков. Для обеспечения ровного слоя среды в чашки Петри диаметром 90,0 мм, установленные

на строго горизонтальной поверхности, вносили 20,0 мл, а в чашки диаметром 100,0 мм – 25,0 мл расплавленного сердечно-мозгового агара (Brain Heart Infusion Agar). Чашки с готовой средой засевали суспензиями культур, затем вырезали по 2 лунки, вмещающие по 85,0 мкл разведений исследуемого антимикробного образца. Для первого разведения необходимо подобрать такую концентрацию препарата, чтобы зона задержки роста была в пределах 35,0–45,0 мм, для второго – концентрацию уменьшить в 5 раз.

При изучении всех трех образцов использовали разведения с примерно одинаковыми их концентрациями. Разведения образцов готовили на воде для инъекций или на диметилсульфоксиде при необходимости растворения препаратов на масляной основе и стерилизовали фильтрацией через фильтр Millex® 0,22 мкм.

Через 20–22 ч инкубирования посевов при температуре 37 °C проводили учет роста культур и определение размеров зон его задержки. Последующий пассаж осуществляли на следующий день после учета зон задержки роста. Для очередного пассажа брали бактериальную массу с границы двух зон задержки роста.

Оценку результатов скорости формирования антибиотикорезистентности проводили по изменению зон задержки роста в каждом пассаже, что свидетельствует о наличии резистентности микрорганизмов к препарату. Считали, что выраженная резистентность отмечается, если в очередном пассаже в первом разведении образца формируется зона диаметром 14,0 мм и меньше. При этом, как правило, второе разведение образца вообще не задерживает роста или зона задержки не превышает 10,0–11,0 мм.

Таблица 1 – Минимальная ингибирующая концентрация рекомбинантного лактоферрина и антибактериальных субстанций

Препарат	Минимальная ингибирующая концентрация, мг/мл	
	<i>E. coli</i>	<i>S. dublin</i>
Цефепим + ЛФ	3,12	3,12
Ципрофлоксацин + ЛФ	6,25	6,25
Цефотаксим + ЛФ	3,12	3,12
Цефтриаксон + ЛФ	6,25	6,25
Амоксициллин + ЛФ	12,5	12,5
ЛФ	50	50

Для изучения влияния образца препарата на бактерицидную и бактериостатическую активность исследования проводились в лабораторных условиях. При этом были использованы в качестве тест-объектов патогенные и условно-патогенные возбудители желудочно-кишечных инфекций телят (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*).

Оценку бактерицидной активности изучали путем внесения исследуемого образца в суспензию тест-микроорганизмов в концентрации 500 млн микробных тел. После 3-часового контакта проводили определение концентрации бактерий на МПА путем последовательных разведений стерильным физраствором по общепринятой методике.

Оценку бактериостатической активности изучали следующим образом. На поверхность застывшего 2%-го агара наносили культуру условно-патогенных тест-культур микроорганизмов в концентрации 500,0–1000,0 млн микробных тел, помещенных в 0,8–1,2%-ный мягкий мясо-пептонный агар. После застывания агара в нем готовили лунки диаметром 9,0 мм и вносили изучаемые образцы. Результатом оценки бактериостатической активности препарата и его компонентов служит диаметр зоны задержки роста тест-культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации рекомбинантного ЛФ и антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином представлены в таблице 1. Результаты изучения антибактериальных свойств ЛФ и антибактериальных субстанций с рекомбинантным ЛФ представлены на рисунке и в таблице 2.



а – *P. mirabilis* + ЛФ + цефотаксим; б – *K. pneumoniae* + ЛФ + цефтриаксон; в – *E. coli* + ЛФ + цефепим; г – *S. typhimurium* + ЛФ + ципрофлоксацин; д – *P. multocida* + ЛФ + амоксициллин

Рисунок – Ингибирование роста бактерий лактоферрином и его комбинациями с антибактериальными субстанциями

Таблица 2 – Результаты изучения антибактериальной активности лактоферрина и его комбинаций с антибиотиками

Препарат	Антибактериальная активность в отношении				
	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. multocida</i>
ЛФ	18±2,6	17±3,8	15±3,3	23±8,3	19±1,3
Цефотаксим + ЛФ	29±2,2	22±1,2	23±2,6	27±3,1	23±3,2
Цефтриаксон + ЛФ	29±1,3	19±2,5	25±1,6	26±2,2	22±1,2
Цефепим + ЛФ	25±3,2	28±2,2	24±1,8	27±1,6	20±2,5
Ципрофлоксацин + ЛФ	24±3,3	17±1,4	15±1,5	32±1,3	19±4,3
Амоксициллин + ЛФ	22±2,2	18±0,2	16±1,1	25±2,1	20±3,6

Результаты исследований по оценке скорости формирования антибиотикорезистентности антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином представлены в таблице 3.

Результаты исследований по определению бактерицидной активности комплексных препаратов на основе антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином для сельскохозяйственных животных представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 3 – Результаты исследований по оценке скорости формирования антибиотикорезистентности антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином

Штамм	Зона задержки роста, мм						
	пассаж						
	1 лунка/ 2 лунка	1 лунка/ 2 лунка	1 лунка/ 2 лунка	1 лунка/ 2 лунка	1 лунка/ 2 лунка	1 лунка/ 2 лунка	1 лунка/ 2 лунка
цефепим с рекомбинантным лактоферрином							
<i>P. mirabilis</i>	32/33	30/30	27/27	27/27	25/25	25/25	25/25
<i>E. coli</i> A20	37/35	29/28	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24
<i>K. pneumoniae</i>	27/29	25/25	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
<i>S. typhimurium</i>	34/34	29/28	26/26	24/23	24/23	23/23	23/23
цефотаксим с рекомбинантным лактоферрином							
<i>P. mirabilis</i>	36/36	31/31	27/27	27/27	25/25	25/25	25/25
<i>E. coli</i> A20	30/31	30/31	30/31	30/31	30/31	30/31	30/31
<i>K. pneumoniae</i>	26/28	21/21	16/16	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	45/45	34/34	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30

Таблица 4 – Результаты исследований определения бактерицидной активности комплексного препарата на основе цефепима с рекомбинантным лактоферрином

Соотношение препарата и микроорганизмов	Концентрация микроорганизмов после 3-часового контакта, тыс. КОЕ				
	<i>P. multocida</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
1:1	465	465	470	480	460
2:1	455	450	440	475	430
3:1	415	390	380	420	400
1:2	475	470	485	485	480
1:3	485	480	490	485	490
1:5	500	490	500	490	495
5:1	315	260	250	260	290
0:1	500	500	500	500	500

Таблица 5 – Результаты исследований определения бактерицидной активности комплексного препарата на основе цефотаксима с рекомбинантным лактоферрином

Соотношение препарата и микроорганизмов	Концентрация микроорганизмов после 3-часового контакта, тыс. КОЕ				
	<i>P. multocida</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
1:1	480	480	475	485	480
2:1	450	470	460	465	465
3:1	410	430	445	440	450
1:2	485	485	480	485	480
1:3	490	485	490	490	490
1:5	500	490	500	495	500
5:1	310	230	290	270	250
0:1	500	500	500	500	500

Результаты оценки бактериостатической активности комплексных препаратов на основе антибактериальных субстан-

ций с рекомбинантным лактоферрином для сельскохозяйственных животных представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты оценки бактериостатической активности комплексных препаратов на основе антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином

Препарат и его компоненты	Диаметр зоны задержки роста, мм				
	<i>P. multocida</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Цефотаксим с рекомбинантным лактоферрином	25	23	24	22	22
Цефепим с рекомбинантным лактоферрином	23	22	21	20	19

В результате проведенных исследований установлена минимальная ингибирующая концентрация рекомбинантного лактоферрина, которая составила 50 мг/мл.

Наиболее выраженная антибактериальная активность в отношении тест-культур наблюдалась при совместном использовании антибиотиков цефотаксима и цефепима с лактоферрином, при этом антибактериальная активность лактоферрина наблюдается по отношению ко всем тест-культурям.

При оценке скорости формирования антибиотикорезистентности антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином установлено, что при первом применении они эффективно действуют на все типы используемых в исследовании бактерий, и их чувствительность снижалась только после третьего контакта с препаратом. Важно, что после трех контактов цефотаксима с рекомбинантным лактоферрином и *K. pneumoniae* сформировалась выраженная резистентность, и это необходимо учитывать при применении препарата животным. Применение цефепима с рекомбинантным лактоферрином не вызывает выраженной резистентности.

Таким образом, комплексное использование при бактериальных инфекциях антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином эффективно действует на все типы исследуемых бактерий, и их чувствительность снижается по мере уменьшения концентрации препарата. При применении антибактериальных субстанций с рекомбинантным лактоферрином важно учитывать результаты предыдущих исследований, особенно касающихся резистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение антибактериальных свойств белорусского рекомбинантного лактоферрина, полученного из молока трансгенных коз, и его сочетаний с антибактериальными субстанциями позволило оценить противомикробную активность лактоферрина, установить синергидный эффект применения отечественного лактоферрина с антибиотиками. Это даст возможность уменьшить дозу, токсический эффект, снизить антибиотикорезистентность и повысить эффективность применения в комплексной антибактериальной терапии.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Изучение влияния протеолитических компонентов лактоферрина на иммунную систему лабораторных животных / С. А. Староверов [и др.] // Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Саратов, 2012 г. / ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» ; редкол.: А. А. Волков [и др.]. – Саратов, 2012. – С. 298–299.
2. Gonzalez-Chavez, S. A. Lactoferrin: structure, function and applications / S. A. Gonzalez-Chavez, S. Arevalo-Gallegos, Q. Rascon-Cruz // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2009. – Vol. 33. – P. 301–308.
3. Pakkanen, R. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums / R. Pakkanen, J. Aalto // Int. Dairy J. – 1997. – Vol. 7. – P. 285–297.
4. Rainard, P. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria / P. Rainard // Vet. Microbiol. – 1986. – Vol. 11. – P. 387–392.
5. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk / N. Y. Lee [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2004. – Vol. 66. – P. 1267–1269.