

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Саратовский государственный университет
генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»**

На правах рукописи

Тычинин Николай Дмитриевич

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НОВЫМ
МЕТОДОМ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА
ЦЫПЛЯТ**

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и
токсикология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент Ларионова О.С.

Саратов 2025

Оглавление

Введение	4
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Современное состояние проблемы сальмонеллёза	11
1.1.1. Роль антибиотикорезистентных штаммов в распространении данной инфекции	15
1.1.2. Способы профилактики и лечения сальмонеллеза	18
1.2. Краткая характеристика возбудителя сальмонеллёза	20
1.3. Классические и альтернативные антимикробные препараты	21
1.4. Предпосылки и перспективы применения антимикробных пептидов в ветеринарной медицине	25
1.5. Методы, используемые для получения антимикробных пептидов	29
1.6. Потенциальные возможности использования насекомых в производстве антимикробных пептидов	33
II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Объекты исследования	40
2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.2.1. Методика инактивации микроорганизмов	42
2.2.2. Иммунизация личинок инаktivированной культурой <i>S. Enteritidis</i>	42
2.2.3. Методика выделения пептидов из иммунизированных личинок насекомого <i>H. illucens</i>	43
2.2.4. Анализ выделенных пептидов	44
2.2.5. Методика определения чувствительности к антибиотикам штаммов сальмонелл	45
2.2.6. Определение острой токсичности	46
2.2.7. Методика изучения профилактической и терапевтической эффективности антимикробной композиции пептидов	48
2.2.8. Статистическая обработка экспериментальных данных	50
2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	51
2.3.1. Разработка метода выделения пептидов из личинок чёрной львинки ..	51
2.3.2. Анализ физико-химических свойств, выделенных АМП	53

2.3.3. Изучение чувствительности штаммов рода <i>Salmonella</i> к антибактериальным препаратам.....	62
2.3.4. Оценка острой токсичности полученных пептидов	65
2.3.5. Изучение действия антимикробных пептидов при профилактике и лечении сальмонеллеза цыплят	69
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	80
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	81
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	82
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	83
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	109

Введение

Актуальность темы

Сальмонеллы являются важной группой зоонозных патогенов, которые широко распространены среди домашней птицы и вызывают сальмонеллез птиц. Это заболевание обычно приводит к значительному снижению продуктивности домашней птицы, в том числе яйценоскости кур-несушек, выводимости цыплят и задержке роста бройлеров. В результате этого мировая птицеводческая отрасль терпит серьезные экономические убытки. Другим немаловажным аспектом является то, что заражение домашней птицы сальмонеллой вызывает серьезную проблему для общественного здравоохранения во всем мире. Эффективность лечения зоонозных инфекций, к которым относится сальмонеллез, затрагивает не только экономические аспекты, но и социальные, связанные с возможным инфицированием людей.

Сальмонеллы являются убиквитарными микроорганизмами, устойчивыми к воздействию физических и химических факторов. Нерациональное использование антибиотиков способствовало селекции антибиотикорезистентных штаммов сальмонелл, что является защитным механизмом, позволяющим им выживать в стрессовых условиях окружающей среды. Лечение заболеваний, вызванных данными штаммами затруднительно, и требует поиска новых альтернативных противомикробных агентов (Carmona-Ribeiro, A. M. et al., 2014; Крылова Л.С. и др., 2019; Мусин Х.Г., 2018).

Антимикробные пептиды (АМП), выделенные из насекомых, представляют собой перспективное решение данной проблемы (Brogden, N. K. et al., 2011; Сычева, М.В., 2016). Насекомые являются одним из самых многочисленных классов беспозвоночных на планете Земля. Одним из факторов, влияющих на их выживаемость, является наличие врождённого неспецифического иммунитета, обусловленного экспрессией антимикробных пептидов (Guangshun W., 2015). АМП, согласно исследованиям ряда авторов,

могут быть использованы в качестве антимикробных агентов по отношению к Грам+ и Грам- микроорганизмам, микроскопическим грибам, вирусам. Помимо этого, селекция антибиотикорезистентных штаммов под действием АМП маловероятна (Diamond, G. et al., 2009).

В этом контексте важно расширить спектр исследований антимикробных пептидов, выделяемых из различных животных и растений, что будет способствовать началу разработки прототипов препаратов на их основе с целью создания альтернативы антибиотикам, которую можно будет использовать, в том числе в животноводстве.

В настоящее время существует достаточно исследований биохимических свойств и антимикробной активности различных пептидов, но не хватает практической реализации подходов к получению данных антимикробных композиций и возможности их использования для профилактики и лечения сальмонеллеза. Для настоящего исследования в качестве источника получения пептидов были выбраны личинки насекомых. На этот выбор повлияло несколько факторов. Во-первых, насекомые необычайно широко распространены практически во всех регионах планеты, во-вторых, они обладают достаточно сильным врождённым иммунитетом, кроме того, их достаточно легко разводить в промышленных условиях. Таким образом, возникает необходимость разработки способов получения антимикробных пептидов и изучения возможности их использования для профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят, вызванного антибиотикорезистентными штаммами.

Степень разработанности темы.

В настоящее время опубликован ряд работ отечественных и зарубежных исследователей, в которых описываются пептиды, выделенные из насекомых и других объектов, а также представлены способы их получения и антимикробные свойства (Сычева, М.В. и др., 2019). Помимо этого, были предприняты попытки практического использования данных антимикробных агентов при сальмонеллезе (Жаркова М.С. и др., 2014).

В ряде работ также приводятся доводы в пользу перспективности исследований антимикробных пептидов, выделяемых именно из насекомых (Davis, R., 2009; Giuseppantonio M. et al., 2010; Ashby, M., 2014). Выбор темы данного исследования был продиктован ее актуальностью, перспективностью использования чёрной львинки *Hermetia illucens*, как биологического объекта для получения антимикробных композиций пептидов, а также изучением возможности профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят, в том числе вызванного мультирезистентными штаммами к действию антибиотиков.

Цель работы – разработка нового метода получения антимикробных пептидов и изучение возможности их использования для профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят, вызванного в том числе антибиотикорезистентными штаммами.

Для достижения поставленной цели были сформулированы задачи:

1. Разработать новый метод получения антимикробной композиции из пептидов *Hermetia illucens*.
2. Изучить физико-химические свойства выделенных пептидов.
3. Определить острую токсичность антимикробной композиции.
4. Оценить возможность профилактики сальмонеллеза цыплят полученной композицией антимикробных пептидов.
5. Изучить терапевтический эффект антимикробных пептидов при лечении сальмонеллеза цыплят.

Объект исследований – антимикробные пептиды, выделенные из личинок *Hermetia illucens*.

Предмет исследований – профилактический и терапевтический эффект применения композиции антимикробных пептидов при сальмонеллезе цыплят.

Научная новизна. Исследован профилактический и терапевтический эффект выделенной композиции антимикробных пептидов. Доказано, что пероральное использование полученной композиции антимикробных пептидов в течении недели, предшествующей экспериментальному

заражению цыплят сальмонеллезом, оказывает профилактическое действие с эффективностью 93,3 %. Максимальный терапевтический эффект возможен при сочетанном использовании энрофлоксацина и АМП *per os* после появления клинических признаков заболевания при экспериментальном заражении.

Для создания композиции антимикробных пептидов нами был разработан новый метод получения пептидов из личинок чёрной львинки *H. illucens*.

Анализируя, полученные композиции пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было выявлено, что использование эксклюзионной хроматографии позволяет получать смеси пептидов с различием в хроматографическом времени удерживания менее 1 минуты, что свидетельствует об их сходных физико-химических свойствах. Установлен размер изучаемых белковых фракций методом динамического рассеяния света (ДРС). Так, размер первой фракции белка составлял 68 - 141 нм; второй фракции – 37 - 79 нм, третьей фракции – 43 нм - 122 нм. Разработанный нами метод получения пептидов из биомассы личинок представляет собой алгоритм выделения и очистки пептидов, включающий холодную экстракцию, очистку белков, высаливание и молекулярно-ситовую хроматографию, а в дополнении с методом ДРС достоверно идентифицировать получаемые антимикробные пептиды.

Теоретическая и практическая значимость работы. Доказано, что изученные композиции антимикробных пептидов, согласно ГОСТ 32644-2014, относятся к 5 классу опасности. Показано, что эффективность при профилактике сальмонеллеза цыплят составила 93,3%. Терапевтическая эффективность лечения сальмонеллеза цыплят при внутрибрюшинном введении АМП составила 66,7%; при лечении энрофлоксацином 80%, при сочетанной терапии энрофлоксацином и АМП – 93,3%. При изучении антибиотикочувствительности штаммов сальмонелл выявлено, что штаммы *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, обладают множественной

резистентностью, т.е. устойчивы к действию более чем трёх фармакологических групп антибиотиков. Однако, были выявлены несколько антимикробных препаратов высокоэффективных в отношении штаммов *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*. Так, чувствительность к цефепиму продемонстрировали штаммы: *S. Abony*, *S. Enteritidis*; *S. Infantis*, *S. Enteritidis* – к амикацину. Штамм *S. Typhimurium* был умеренно чувствителен к цефуроксиму и амикацину. Следует отметить, что изученные штаммы сальмонелл были в той или иной степени чувствительны к действию энрофлоксацина.

Основные положения и результаты используются в рамках учебного процесса и научно-исследовательской работы в следующих университетах Российской Федерации: ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова», ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет».

Методология и методы исследований. Методология диссертационной работы заключалась в разработке нового метода получения пептидов из личинок чёрная львинка *H. illucens* и изучении профилактического и терапевтического потенциала антимикробных фракций пептидов при сальмонеллёзе цыплят. В выполнения диссертационных исследований нами были использованы микробиологические, физико-химические, клинические, гематологические, статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новый метод, позволяющий получить антимикробные пептиды, обладающие высокой антибактериальной активностью.
2. Физико-химические свойства антимикробных пептидов, полученных новым методом.
3. Оценка острой токсичности антимикробных пептидов.

4. Терапевтическая и профилактическая эффективность использования 20% раствора антимикробных пептидов.

Работа выполнена на кафедре микробиологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии Н.И. Вавилова».

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты исследований отличает высокая достоверность, обусловленная использованием значительного объема экспериментальных данных с подтверждением их методами математической статистики.

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-26-00167 «Антимикробные пептиды насекомых: выделение, идентификация, доклинические и клинические испытания» (2022-2023 г.г.).

Материалы диссертации были представлены на конференциях Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения 2023», г. Саратов; V Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии – драйвер развития территорий» (Вологда, 20-21 апреля 2023); Международная научно-практическая конференция «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Московская обл., п. Биокомбинат, 29-30 ноября 2023); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения 2024», г. Саратов.

Публикации. Основные результаты отражены в 4 публикациях, из них 2 статьи из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья, индексируемая в международной базе данных Scopus, 1 статья в других изданиях. Общий объем печатных листов составляет 2,0 п.л., лично соискателю принадлежит 1,7 печатных листов.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена Тычининым Н.Д. самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в подготовке, организации и осуществлении всех этапов диссертационной

работы: постановке цели и задач, анализе источников литературы, проведении физико-химических, микробиологических, фармакологических и клинических методов исследования, а также обсуждении полученных результатов и их формулировке, написании выводов, подготовке публикаций и апробации работы на научных конференциях различного уровня.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 135 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованных литературных источников, приложения. Список литературы представлен 217 источниками, в том числе 187 иностранными. Диссертационная работа включает 21 таблицу, 11 рисунков и 18 приложений.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современное состояние проблемы сальмонеллёза

Сальмонеллезная инфекция считается одним из наиболее опасных и распространенных заболеваний во всем мире, угрожающих животноводству и общественному здравоохранению (Barber L.Z. et al., 2013; Grammato, E. et al., 2013; Molino, M.G. et al., 2020).

Сальмонеллез домашней птицы, инфекционное заболевание пищевого происхождения, которое не только наносит значительный экономический ущерб птицеводческой отрасли, но и представляет серьезную угрозу для здоровья населения из-за загрязненных продуктов птицеводства. В частности, продовольственные товары, включая мясо птицы и яйца, являются основными источниками пищевого сальмонеллеза (Neto, J.D.F. et al., 2010; Ojha, S. et al., 2007).

Ежегодно во всем мире регистрируются десятки миллионов случаев заболевания людей сальмонеллезом пищевого происхождения (World Health Organization (WHO), 2020).

Кишечная сальмонелла (*Salmonella enterica*) является одним из наиболее частых возбудителей желудочно-кишечных расстройств у человека. Домашняя птица является основным резервуаром серовара *S. enterica Enteritidis*, частота инфицирования которым среди населения значительно возросла с начала 1990-х годов (EFSA J., 2007; Lahuerta A. et al., 2011). Поскольку домашняя птица является основным источником *Salmonella Enteritidis* для людей, считается, что меры, применяемые при производстве куриных яиц, которые приведут к снижению распространенности *Salmonella Enteritidis*, также повлияют на заболеваемость сальмонеллезом среди населения. Именно поэтому в настоящее время в ЕС реализуется программа, направленная на снижение распространенности сальмонелл в птицеводстве (EFSA J., 2007; Lahuerta A. et al., 2011). Несмотря на отсутствие выраженных клинических признаков, цыплята реагируют на пероральное заражение

нетифозными сероварами *S. enterica* умеренным воспалением слепой кишки, связанным с гетерофильной и моноцитарно-макрофагальной инфильтрацией слизистой оболочки слепой кишки.

Ежегодно в мире регистрируется 94 миллиона случаев сальмонеллезной инфекции у людей, из них более 155 000 человек с летальным исходом. Из них более 94% случаев заболевания связано с передачей инфекции пищевым путем (Senevirathne A. et al., 2021). Серовары *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* являются двумя основными патогенами, вызывающими сальмонеллез у более чем 1 миллиона человек в США в год (Mead P.S. et al., 1999). При этом более 410000 заболеваний вызывают антибиотикорезистентные штаммы (Punchihewage–Don, A.J. et al., 2022).

В Российской Федерации в последние 10 лет заболеваемость населения сальмонеллезом сохраняется на достаточно высоком уровне, около 30 – 37 положительных случаев на 100 тысяч человек ежегодно. Данному заболеванию подвержено в основном городское население (>85 %), что связано с интенсификацией производства пищевой продукции и употреблением продукции сетей общественного питания (Мезенцев С.В., 2015).

Чаще всего заболеванию подвержен молодняк сельскохозяйственных животных. Болеют крупный и мелкий рогатый скот, свиньи и лошади. Согласно исследованиям *S. Typhimurium* был одним из наиболее частых серотипов возбудителей сальмонеллеза дойных коров, что не только приносит экономический ущерб молочной промышленности, но и подвергает опасности заражения человека, так как возбудитель помимо прочего может выделяться с молоком (Chelsea L. et. al., 2017). Свиньи, как и крупный рогатый скот, подвержены заболеванию, вызываемому *S. Typhimurium*, что вызывает экономические затраты вследствие падежа свиней и отставании животных в развитии, а также угрожает жизни и здоровью людей (Jenkins N.L. et al., 2004; Soliani L. et al., 2023). Точные данные касательно инфицирования свиней сальмонеллезом установить затруднительно, так как эти животные могут

переносить заболевание в скрытой форме, осложняя диагностику и мониторинг болезни (Wong L.F. et al., 2002). Лошади подвержены заражению *S. abortus equi*, вызывающему аборт у кобыл, однако известно, что заболевания могут вызывать и другие сальмонеллы, в том числе *S. Enterditis*, особенно если иммунитет животного снижен.

Заражённые сельскохозяйственные животные – это основной фактор, влияющий на заболеваемость людей сальмонеллезом (Yan H. et al., 2010). За 2018-2020 гг. сальмонеллез был выявлен в 91 хозяйстве, общее число заболевших животных составило 422 головы (Козак, С.С. и др., 2023). Заражение молодых птиц *S. typhimurium* приводит к массовым заболеваниям и смертности, в то время как их восприимчивость к инфекции снижается с возрастом. Одно исследование показало, что пероральное заражение высокими дозами *S. typhimurium* приводит к 50 %, 20 % и 0 % смертности цыплят-бройлеров в возрасте 1, 3 и 7 дней соответственно (Fagerberg G.A. et al., 1977). Напротив, у взрослой домашней птицы при заражении высокими дозами *S. typhimurium* не наблюдается существенных клинических симптомов, однако инфекция у кур-несушек может привести к бактериальной колонизации репродуктивных путей и заражению яиц (Martelli M. et al., 2014; Pandey, M.M. et al., 2016).

Немаловажным фактором распространения данного заболевания является бессимптомное носительство, когда домашние и дикие животные являются переносчиками инфекции, часто без проявления видимых признаков болезни. Следовательно, такие животные, вызывают загрязнение окружающей среды и, являются потенциальной угрозой для здоровья других животных и человека. Сальмонеллезная инфекция тесно связана с птицеводством, вследствие чего предпринимается немало усилий для профилактики и лечения данного заболевания и сокращения распространения данной инфекции на различных этапах производства продукции мяса птицы и яиц. Мясо, полученное от животных с бессимптомным носительством, впоследствии могут загрязнять производственные помещения, мясо здоровой птицы может

быть инфицировано во время переработки и представлять опасность для здоровья человека. Для снижения уровня инфицирования продуктов птицеводства сальмонеллами при переработке необходимо соблюдать меры безопасности на различных этапах производства, в том числе птицеводческих предприятиях при составлении рационов, содержании, транспортировке и переработке птицы.

На сегодняшний день насчитывается более 2500 различных серотипов сальмонелл, и два из них являются причиной большинства случаев заболеваний людей, а именно *Salmonella Enteritidis*, на долю которой приходится 24,7 %, и *Salmonella Typhimurium*, на долю которой приходится 23,5 % от общего числа случаев заболевания людей в мире (Eng S. K. et al., 2015). Вышеуказанные штаммы *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* выделяют из организмов всех основных видов сельскохозяйственных животных, что обеспечивает их повсеместное распространение (Землянская Н.И., 2011). Оба этих серотипа распространены среди домашней птицы, и именно продукты птицеводства являются одними из главных источников заражения людей этими кишечными инфекциями (Freitas N. et al., 2010; Antunes P. et al., 2016).

Инфекции кур, вызванные *Salmonella Enteritidis* в полевых условиях, протекают субклинически и без явных симптомов, что увеличивает риск контаминации пищевых продуктов сальмонеллами. Сальмонелла проникает в организм хозяина оральным путем и накапливается в желудочно-кишечном тракте. Затем *S. Enteritidis* прикрепляется к ворсинкам кишечника и колонизируется в присутствии группы белков, известных как адгезины (Beachey E.H., 1981). Таким образом, наиболее эффективным методом профилактики бактериальной инфекции может быть предотвращение прикрепления *S. Enterithidis* к рецепторам эпителиальных клеток кишечника (Wizemann H. et al., 1999).

Многолетние исследования зарубежных ученых показали, что заболевания птиц сальмонеллезом, вызванным штаммами *S. Enteritidis*, произошло вследствие появления клона этого микроба в конце 1960х годов,

который заполнил нишу после элиминации специфических штаммов *S. Pullorum* и *S. Gallinarum*, патогенных для птиц (Patrick M.E. et al., 2004). Вследствие чего был зарегистрирован стремительный рост заболеваемости населения сальмонеллезом, вызванном *S. Enteritidis* (Hazenson L.A. et al., 1996). Как правило, во всех регионах мира заболевания этиологическим агентом которых являлись микроорганизмы *S. Enteritidis*, были взаимосвязаны с продуктами птицеводства (Pang J.C. et al., 2005). Тем не менее, заболеваемость в разных регионах мира значительно различается, в США регистрировали подъем заболеваемости населения сальмонеллезом в 4-6 раз, однако показатель заболеваемости не превышал 4,0 на 100 тысяч населения, а в Европе был на уровне 100 – 200 на 100 тысяч населения (Pang J.C. et al., 2005).

Проблема сальмонеллезной инфекции в настоящее время всё ещё остаётся актуальной не только в гуманной, но и в ветеринарной медицине, и требует поиска новых подходов для борьбы с ней (Holschbach, C. L. et al., 2017).

1.1.1. Роль антибиотикорезистентных штаммов в распространении данной инфекции

Потребность рынка фармацевтических препаратов в поиске новых эффективных антибактериальных субстанций продиктована стремительно растущей проблемой антибиотикорезистентности микроорганизмов к существующим фармакологическим группам антибактериальных препаратов.

Впервые резистентность микроорганизмов к пенициллину при антимикробной терапии у людей была зарегистрирована в 1940-х годах, что случилось всего через несколько лет после его промышленного выпуска (Wright G.D., 2010). В настоящее время проблема устойчивости микроорганизмов к антибиотикам имеет систематический характер и требует повышенного внимания исследователей к поиску природных альтернатив классическим антибиотикам (Payne D. J. et al., 2007; Arias C. A. et al., 2008; Tommasi R. et al., 2015; Martens E. et al., 2017).

Использование антибиотиков в птицеводстве было основным средством профилактики заболеваний и стимулирования роста в течение последних 70 лет. Первоначально антибиотики предназначались только для больных животных. Однако из-за передачи инфекции от птицы к птице часто было эффективнее лечить все стадо, вводя антибиотики с кормом или водой (McEwen S.A. et al., 2002).

Вследствие чрезмерного и ненадлежащего использования антибиотиков возник кризис и в области общественного здравоохранения. Сальмонеллы, как и другие микроорганизмы приобрели устойчивость к действию антибиотиков, и антибиотики стали менее эффективными при вспышке заболеваний.

Неконтролируемое применение антибиотиков в отрасли птицеводства способствовало селекции устойчивых штаммов, сохраняющих и передающих генетическую информацию, ответственную за резистентность к фармакологическим препаратам (Tollefson L., 2000; Liebana E., et al., 2013). Современные исследования говорят о развитии устойчивости к антимикробным препаратам у серотипов *Salmonella spp.*, выделенных от животных, содержащихся на фермах и употребляемых человеком в пищу (Clemente L. et al., 2013; Jong A.D. et al., 2015).

Наиболее часто причиной пищевых инфекций становятся продукты птицеводства инфицированные антибиотикорезистентными штаммами *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* устойчивыми к амоксициллин-клавулановой кислоте, ампициллину, цефокситину, цефтриаксону, гентамицину, стрептомицину, сульфаметоксазолу и тетрациклину, ципрофлоксацину, фосфомицину (Hur J. et al., 2012; Centers for Disease Control and Prevention, 2016; Centers for Disease Control and Prevention, 2017; Centers for Disease Control and Prevention, 2018; Centers for Disease Control and Prevention, 2020; Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Тенденцию к возникновению антибиотикорезистентности иллюстрируют данные, полученные в исследовании, в ходе которого сравнивалась резистентность *S. Gallinarum* и *S. Pullorum*, выделенных в разные

временные промежутки. Так, упомянутые микроорганизмы, выделенные спустя 7 лет, обладали повышенной устойчивостью к хинолонам, фторхинолонам, и другим классам антибиотиков, чего не было выявлено у микроорганизмов, выделенных на 7 лет ранее (Filho R.A.C.P. et al., 2016).

Ежегодно в США среди бактериальных патогенов сальмонеллы вызывают наибольшее количество заболеваний пищевого происхождения у людей (15,5 случаев на 100 000) и 410 000 инфекций, вызванных штаммами устойчивыми к антибиотикам. Домашняя птица, без соответствующего контроля, профилактики и лечения данной инфекции, является основным переносчиком сальмонелл, вызывающим заболевания людей.

По оценкам, число случаев лекарственно-устойчивых сальмонеллезных инфекций, вызванных нетифоидными сальмонеллами и сальмонеллами серотипа *Typhi*, составляет приблизительно 216 600, а число смертей, связанных с лекарственно-устойчивыми сальмонеллами, составляет почти 75 в год (Centers for Disease Control and Prevention, 2020). Сальмонеллы проявляют устойчивость ко многим антибиотикам из каждого класса/подкласса антибиотиков, включая аминогликозиды, аминопенициллины, β -лактамы, цефалоспорины (третьего поколения), цефамицины, фениколы и тетрациклины (Mazengia E. et al., 2014).

Устойчивость к антибиотикам у микроорганизмов распространяется не только вертикально, но и горизонтально, что осуществляется при помощи плазмид (Podolsky S.H., 2018). Большое опасение вызывают штаммы с множественной лекарственной устойчивостью, которые могут быть маловосприимчивы сразу к нескольким антимикробным препаратам (Jasopin E. et al., 2020).

Это вызывает острую необходимость создания модифицированных антимикробных лекарственных средств для лечения животных, инфицированных антибиотикорезистентными штаммами.

1.1.2. Способы профилактики и лечения сальмонеллеза

При лечении и профилактике сальмонеллезом применяется комплекс мер. Профилактика предусматривает недопущение на территорию птичника диких животных, использование доброкачественных кормов, а также применение специальных препаратов, таких как сальмофаг энтеритидис, бактериофаг, применяемый для лечения и профилактики (Санитарные правила. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней").

Одним из вспомогательных средств при лечении сальмонеллеза являются пробиотики, применение которых особенно важно на фоне приёма антибиотиков, угнетающих также и собственную микрофлору кишечника, что приводит к расстройствам пищеварения и также ослабляет устойчивость организма (Пименова В. В., 2017).

При лечении заболеваний, вызванных сальмонеллами, как правило используются следующие антимикробные препараты: энрофлоксацин, ципрофлоксацин, амоксициллин, неомицин, окситетрациклин и гентамицин (Hossain M.A., et al., 2015). В настоящее время имеются данные о том, что следующие антимикробные средства всё ещё активны в отношении сальмонеллёзных инфекций: тетрациклины (Ацидокс, Докси WS, Доксилор ОР, Доксиор 10%, Биовит Р-150), аминогликозиды (Гентамицин, Неомицин), нитрофураны, фторхинолоны (Энрофлокацин, Энрофлокс, Ципровет, Роксацин), цефаллоспорины (Иноксел, Эксенел), комбинированные антимикробные препараты (Амоксиклав 62,5%) (Пименова В. В., 2017).

Как отмечалось выше, наиболее часто заболевания птицы и людей вызывают *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Gallinarum-pullorum*. Серовары *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* демонстрируют полиустойчивость, оказались резистентны к клиндамицину, тилозину, олеандомицину, рифампицину, ампициллину, эритромицину, доксициклину, тетрациклину. Аминогликозиды и амфениколы угнетают рост 60-90%

штаммов. Резервные антибиотики ципрофлоксацин и энрофлоксацин, относящиеся к фторхинолонам, демонстрировали лучший показатель, угнетая рост от 80 до 100% изолятов. Антибиотики, относящиеся к фторхинолонам, демонстрировали более слабое воздействие на *S. Infantis*, из группы цефалоспоринов хорошо зарекомендовали себя цефалперазон и цефтриаксон (Лощинин М.Н. и др., 2020). В некоторых случаях целесообразно использовать два антибактериальных средства, например, неомицин и полимиксин. Для повышения эффективности лечебных мероприятий целесообразно перед началом лечения проводить бактериологическое исследование для выявления устойчивости конкретного штамма к антимикробному средству.

Для предотвращения заражения сальмонеллами продуктов птицеводства вакцинация является одной из наиболее перспективных стратегий (Jia S. et al., 2020). В программах вакцинации животных безопасность вакцин-кандидатов имеет первостепенное значение, поскольку вакцинные штаммы не должны вызывать загрязнения окружающей среды или заболеваний у иммунизированных животных. Преимущество живых вакцин заключается в том, что они способствуют образованию гуморального и клеточного иммунитета (Rana N., 2006). Однако, с точки зрения безопасности, инактивированные вакцины являются наиболее безопасными, хотя их иммуногенный потенциал может быть ниже, чем у живых вакцин (Singh B.R. et al., 2009). Иммунизация птиц является одним из способов профилактики сальмонеллеза для предотвращения передачи инфекции человеку через продукты птицеводства (Filho R.A.C.P. et al., 2009). Каждый из перечисленных способов обладает своими достоинствами и недостатками. АМП потенциально способны стать ещё одним средством борьбы с сальмонеллезными инфекциями, применяясь, как в профилактических, так и в лечебных мероприятиях.

Таким образом, для реализации эффективных сценариев профилактики сальмонеллеза необходимо внедрять комплексный подход, заключающийся в соблюдении санитарных требований, рациональном применении

антибиотиков, разработке вакцин широкого спектра действия и новых противомикробных альтернатив.

1.2. Краткая характеристика возбудителя сальмонеллёза

Род *Salmonella* относится к семейству *Enterbacteriaceae* и характеризуется наличием антигенов O, H и Vi (Giannella R.A., 1996). Сальмонеллы являются внутриклеточными грамотрицательными подвижными бактериями диаметром от 0,7 до 1,5 мкм, длиной от 2 до 5 мкм, с перитрихозными жгутиками, не образуют спор, являются факультативными анаэробами с оптимумом роста 37°C, pH от 4 до 9, образуют сероводород и каталазу, фермент оксидаза отсутствует (Li H. et al., 2013). Данный возбудитель достаточно термолабилен и погибает при температуре 70°C, вместе с тем при определенных условиях может выживать в пыли и суровых условиях окружающей среды в течение 2 лет и более (Davies R. H., 1996).

Изоляты сальмонелл чаще всего идентифицируются в соответствии с их серотипом. Серотипирование сальмонелл основано на идентификации соматического антигена и жгутикового антигена (Eng S. et al., 2015). *Salmonella enterica* серотип Enteritidis является наиболее распространенным сероваром сальмонелл, который оказывает менее патогенное воздействие на птиц, однако при передаче человеку может приводить к тяжелому течению болезни (Tarabees R. et al., 2017).

Salmonella Gallinarum и *Salmonella Pullorum* обладают определенной специфичностью к хозяину, и вызывают заболевания у молодняка домашней птицы. Заражение *S. Gallinarum* или *S. Pullorum* в основном вызывает септицемию и энтерит у птиц, серьезно снижая продуктивность и приводя к значительной смертности молодняка, а также к стойкой латентной инфекции у взрослых птиц (Evangeloroulou G. et al., 2013). Напротив, другие общие для хозяина серотипы, такие как *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* и *Salmonella Indiana*, редко вызывают существенные клинические симптомы

или патологические изменения у инфицированной домашней птицы, но могут передавать сальмонеллез людям по пищевой цепи (Pan J. et al., 2024).

Salmonella Enteritidis, являясь зоонозным возбудителем, обычно встречающимся у домашней птицы, является причиной многих вспышек сальмонеллеза среди людей в результате употребления зараженных пищевых продуктов, особенно приготовленных из продуктов птицеводства (Altekruse, S.A. et al., 2006, Humphrey, T. et al., 2006, Gast, R.K. 2007). Существует два основных пути заражения яиц *Salmonella Enteritidis*, горизонтальная передача при проникновении через яичную скорлупу из колонизированного сальмонеллами кишечника или загрязненного помета (Reu K., et al., 2006). При вертикальной передаче происходит прямое заражение желтка, белка, оболочек яичной скорлупы или яичной скорлупы до откладки яиц через инфицирование репродуктивных органов *Salmonella Enteritidis* (Wibisono, F. M. et al., 2020).

Преобладающими серотипами сальмонелл, которые выделяют из кур являются *S. Kentucky*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg* (Parveen S. et al., 2007).

1.3. Классические и альтернативные антимикробные препараты

В настоящее время известно большое количество антибиотиков (180 согласно базе данных «AWaRe»), для их систематизации используют различные классификации.

В зависимости от оказываемого воздействия на патоген антибиотики делятся на бактериостатические (микроорганизмы не погибают, однако теряют способность к размножению) и бактерицидные (микроорганизмы погибают).

В зависимости от химической структуры антибиотики принято классифицировать на: аминогликозиды, беталактамы, гликопептиды, линкозамиды, макролиды, полимексины, рифамицины, тетрациклины, сульфаниламиды, нитрофураны и прочие антибиотики (Бузмакова У.А., 2018).

В зависимости от активности антибиотиков против конкретных микроорганизмов, они разделяются на: противобактериальные, противопротозойные, противоопухолевые, противогрибковые, активные в отношении Гр- микроорганизмов, обладающие широким спектром активности, противовирусные.

Однако использование антибактериальных препаратов в птицеводстве сокращается из-за роста числа штаммов микроорганизмов устойчивых к антибиотикам. Для решения проблем селекции антибиотикорезистентных штаммов, загрязнения продукции птицеводства остаточными количествами данных препаратов применяется множество альтернативных способов получения безопасного, дешевого и экологически чистого мяса птицы. Использование пробиотиков, пребиотиков, симбиотиков, органических кислот, эфирных масел, циннамальдегида, хитозана, наночастиц и вакцин показало многообещающие результаты в борьбе с сальмонеллезом птиц, которое гарантирует стратегии борьбы и профилактики сальмонеллеза птиц как в развивающихся, так и в развитых странах, а также обеспечивают безопасность домашней птицы.

В качестве противомикробных альтернатив антибактериальным препаратам могут быть использованы следующие средства: вакцины, пробиотики, лизины, бактериофаги, иммуностимуляторы, пептиды.

Вакцины. Биопрепараты, содержащие в себе антигены к одному или нескольким возбудителям, стимулирующие формирование иммунитета к этим заболеваниям. Преимуществом является хорошая изученность и широкое внедрение в профилактику многих заболеваний. Недостатками можно назвать возможные побочные эффекты, сложность применения вакцин при определенных заболеваниях, а также то, что не для всех заболеваний разработаны соответствующие препараты для профилактики.

Пробиотики. Живые микроорганизмы, вводимые в адекватных количествах в организм пациента, усиливающие его иммунитет. Как правило, применяются при лечении инфекционных заболеваний желудочно-кишечного

тракта. Являются антагонистами многих патогенных и условно-патогенных бактерий, заселяющих желудочно-кишечный тракт. Применяются в том числе при лечении дисбактериоза, вызванного приёмом антибиотиков. Недостатком можно выделить то, что область применения сильно ограничена.

Бактериофаги. Преимуществом является способность бактериофагов размножаться внутри бактериальных клеток мишеней и их специфичность. Однако недостатком можно назвать потенциальную возможность приобретения бактериофагом новых признаков в процессе эволюции внутри организма пациента. Перспективно выглядит использование генетически модифицированных бактериофагов. Преимуществом является возможность влиять на характеристики бактериофагов и создание наиболее выгодных комбинаций. Однако, как недостаток можно считать необходимость повышения вводимой дозы бактериофагов, если лишить их способности к репликации.

Лизины. Ферменты, способные разрушать микробные стенки, и выделенные из бактериофагов. Оказывают прямое воздействие на антибактериальный агент. Могут быть использованы как в отношении Гр⁺, так и в отношении Гр⁻ бактерий.

Иммуностимуляторы. Разнообразная группа химических соединений, повышающих резистентность к патогенным микроорганизмам. Иммуностимуляторы получают из природных источников или синтезируют. Иммуностимуляторы могут оказывать эффект по принципу антигенов, стимулируя выработку организмом специфических антител. Иммуномодуляторы, не обладающие антигенной активностью, неспецифически стимулируют иммунный ответ на другие антигены.

Пептиды. Пептидами называют цепочечные молекулы, которые содержат от двух до ста аминокислотных остатков, соединённых пептидными связями. В 1963 году группа американских учёных успешно выделила из нейтрофилов морской свинки пептиды, продемонстрировавшие антимикробные свойства. Впоследствии выделенные пептиды получили

название дефензинов (Мусин Х.Г., 2018). Пептиды присутствуют во всех организмах, включая организм человека (Niyonsaba, F. Et al., 2002). К настоящему моменту в общей сложности насчитывается уже около 5000 известных антимикробных пептидов (Zhao X. et al., 2013; Xu B.C. et al., 2020).

Существует несколько классификаций антимикробных пептидов, основанных на различных факторах, таких как:

1. Источник выделения антимикробного пептида (из млекопитающих, амфибий, насекомых, грибов, бактерий).

2. Активность пептидов в отношении конкретных источников заболеваний (активность против грибков, вирусов, бактерий, опухолей, паразитов).

3. Структурная организация пептида (Lei, J. et al., 2019).

4. Пептиды, содержащие аминокислотные остатки.

Наиболее актуальными к настоящему моменту являются антимикробные пептиды, полученные из насекомых и микроорганизмов, а также ядов животных и растений. Антимикробные пептиды обеспечивают врождённый иммунитет и являются частью неспецифической системы защиты организма, возникшей около 2,6 млрд. лет назад. Благодаря трудам И. Мечникова и П. Эрлиха стало известно, что врождённый иммунитет у беспозвоночных является основным способом защиты организма от бактерий и включает в себя клеточный и гуморальный компоненты (Хаитов Р.М. и др., 2002). К последнему относятся и антимикробные пептиды. Помимо антибактериальной активности, АМП обладают целым рядом биологических функций, таких как регуляция иммунитета, ангиогенез, заживление ран и противоопухолевая активность (Mookherjee N. et al., 2020; Thomas, S. et al., 2009). Внутри организма пептиды могут оказывать не только прямое, но и опосредованное влияние на болезнетворные микроорганизмы. Роберт Хэнкок и Аннет Розек в своем исследовании показали, что внутри бактериальных клеток существует множество различных потенциальных мишеней. Например, клеточные мембраны, процесс деления клеток, процесс синтеза

ДНК, РНК или белка, активация аутолизина и другие. В таком случае отдельные пептиды будут стремиться "выбрать" одну или несколько из возможных целей в качестве предпочтительной мишени (Hancock R.E.W., 2002; Мусин Х.Г., 2018).

Таким образом, недостаточная изученность темы и высокий потенциал разностороннего применения пептидов в фармакологии делает их перспективной темой для исследования.

1.4. Предпосылки и перспективы применения антимикробных пептидов в ветеринарной медицине

Одной из самых острых проблем современного животноводства является нарастающая антибиотикорезистентность микроорганизмов к существующим антибактериальным препаратам. Следует отметить, что в 2006 году был введен запрет на использование в кормах животных стимуляторов роста, а с 1 марта 2025 года вступили в действие новые правила по использованию антибиотиков в животноводстве. Данный документ вводит запрет на бесконтрольное применение антибактериальных препаратов и направлен на предотвращение развития антибиотикорезистентности микроорганизмов. Нерациональное использование антибиотиков, вследствие использования препаратов, предназначенных для людей, не соблюдения назначений ветеринарного врача усугубляет проблему антибиотикорезистентности. Для решения этих проблем всё чаще предлагается использовать АМП, которые могут стать заменой классическим методам лечения во многих отраслях животноводства, включая птицеводство, свиноводство, и аквакультуру, способствовать повышению производственных показателей (Бао Н. et al., 2009; Bahar, A. A., et al., 2013; Zhang, C. et al., 2018). Иногда эффективно совместное применение антибиотиков с АМП, оказывающих более сильное ингибирующее воздействие на патогенные микроорганизмы при комбинированном использовании. Бактерии с множественной лекарственной устойчивостью возможно сделать

восприимчивыми к антибиотикам, посредством их обработки АМП. Активность АМП и воздействие на клеточную мембрану бактерий позволяет пептиду сенсibilизировать бактерии к антибиотикам. АМП действуют как усилители, повышая активность антибиотиков, изначально неэффективных против устойчивых патогенов (Shahrour H. et al., 2019). *In vivo* пептиды обладают способностью воздействовать на возбудителей инфекций не только прямым, но и опосредованным способом (Пурыгин П.П. И др., 2007; Ganz T. et al., 2003). Антимикробные пептиды воздействуют на жизнеспособность микроорганизмов не только через клеточную мембрану, но и другие механизмы, а именно вызывая нарушение важнейших внутриклеточных процессов и взаимодействуя с мишенями внутри клеток (Wang X.M. et al., 2010).

Исследования некоторых авторов свидетельствуют о том, что комбинации 24-аминокислотного пептида и одного из антибиотиков (тетрациклина или новобиоцина) повышали чувствительность к антимикробным препаратам возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии (Cote S.K. et al., 2020). АМП, выделенный из кишечника свиней, показал эффективность при обработках им эмбрионов цыплят для профилактики вируса инфекционного бронхита (Sun Q. et al., 2019). Добавление АМП, выделенного из кишечника свиней, в рацион также оказало положительный эффект на бройлеров, увеличился среднесуточный прирост массы тела и повысилась эффективность кормления (Бао Н. et al., 2009). АМП каерин, выделенный из лягушек, АМП дицентрин европейского морского окуня и НК-лизиновые пептиды ингибируют развитие рост и размножение многих возбудителей болезней рыб, которые являются губительными для рыбоводства (Leon R. et al., 2020). АМП в соевой муке, ферментированной *B. subtilis* E20, ингибирует *V. parahaemolyticus* и *Vibrio alginolyticus* и повышает уровень устойчивости к *V. parahaemolyticus* при добавлении в корма (Cheng A.C. et al., 2017).

При лечении инфекций, вызванных патогенными бактериями, целесообразно использовать пептиды, выделенные из насекомых: АМП чешуекрылого *Hyalophora cecropia*, АМП гловерин, АМП жука-носорога *Oryctes rhinoceros* (Patent No.: US 6476189), Patent No.: FR 2695392, Patent No.: US 6337093).

АМП обладают значимыми преимуществами при использовании в качестве антибактериальных агентов. Кроме этих эффектов, АМП способны обезвреживать токсины, образующиеся вследствие гибели клеток патогенных микроорганизмов (Peschel A., 2006).

В процессе создания лекарственных препаратов на основе АМП особое внимание необходимо уделить созданию узкоспециализированных препаратов, нацеленных на конкретные структуры внутри микроорганизмов, а также на отключение основных механизмов резистентности бактериальных клеток и факторов вирулентности, характерных для инфекций.

С целью облегчения задачи и повышения антимикробного эффекта АМП можно заключать пептиды в специальные капсулы, например, мицеллы и липосомы. Такие носители будут нести на положительный заряд, благодаря этому они смогут взаимодействовать исключительно с бактериальными мембранами, несущими на себе отрицательный заряд, следуя принципу электростатического сродства (Bloch-Shilderman E. et al., 2002).

Мицеллы и другие капсулы для антимикробных пептидов способны работать вместе с различными минералами. Есть данные о получении мицелл с антимикробным агентом, свободно прикрепляющиеся к зубной эмали, а затем способные продолжительное время угнетать рост бактерий *Streptococcus mutans* (Chen F. et al., 2013).

Значительный объем исследований по изучению антибактериальной активности пептидов был проведен рядом исследователей, и свидетельствовал об их эффективности против ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий (Thomas S. et al., 1999; Vexfield A. et al., 2004; Huberman L. et al., 2007; Jaklic D. et al., 2008).

АМП могут применяться при лечении хирургических инфекций, возникающих в результате воздействия различных травмирующих факторов (ожоги, раны), которые ослабляют естественную резистентность организма и могут представлять большую опасность для жизни человека и животного (Thapa R.K. et al., 2020). АМП PXL150 оказался эффективен при лечении ожоговых ран мышцей, а также показывал антимикробное действие в отношении *S. aureus* (Bjorn C. et al., 2015).

Согласно некоторым исследованиям, специальные марли, содержащие ковалентно иммобилизованные АМП, показали антибактериальную активность в отношении таких бактерий, как *S. aureus* и *E. coli.*, и данные микроорганизмы не образовывали бактериальных плёнок, что важно в контексте их высокой антибиотикорезистентности к традиционным антибиотикам (Yang et al., 2019, Gao et al., 2019).

Согласно недавно опубликованной работе, авторам удалось синтезировать новый антимикробный препарат, основанный на модификации антимикробного пептида, выделенного из желез лягушки Андерсона (*Odorrana andersonii*). Основываясь на результатах проведённых доклинических испытаний, полученный антибиотик показал антимикробную активность в отношении Гр- микроорганизмов, а также не обладал цитотоксическим действием. Отмечалось, что у исследуемых бактерий не было выявлено резистентности к данному препарату (Ageitos L., et al., 2025).

На фармацевтическом рынке постепенно появляются препараты, в состав которых входят пептиды. Среди уже доступных для использования лекарств можно выделить бацитрацин, полимиксин, фузеон (Ongey, E.L. et al., 2018). И всё же пока массовое использование, разработка и появление на рынке пептидных препаратов идёт недостаточно быстро вследствие таких факторов, как низкая биодоступность, не у всех пептидов изученная способность к гемолизу, а также неизвестная токсичность, изучение которых требует времени и ресурсов (Shen, W. et al., 2018).

Немаловажной проблемой в разработке подобного класса препаратов является разработка алгоритма получения АМП, обеспечивающего экономическую целесообразность процесса и возможность масштабирования.

1.5. Методы, используемые для получения антимикробных пептидов

Для получения АМП используется несколько основных методов. Среди них: выделение из организма-хозяина, синтез в культуре клеток-продуцентов и химический синтез АМП. Каждый из этих методов обладает своими преимуществами и недостатками.

Выделение АМП из организмов животных трудоёмкий и затратный процесс, требующий усовершенствования, тем не менее, именно благодаря ему были открыты многие антимикробные пептиды, и благодаря этому появилась возможность говорить об искусственном синтезе АМП. Помимо этого, следует учитывать, что при выделении АМП из организмов, необходимо избегать примесей в виде балластных соединений (Пат. 2552157 от 26.12.2013).

Для химического синтеза пептидов могут применяться разные стратегии. Одна из таких стратегий – это жидкофазный синтез, классический метод, который использовали ученые, когда впервые открыли способ конструирования пептидов *in vitro*. Этот способ до сих пор широко используется для крупномасштабного синтеза. Недостатком жидкофазного метода является то, что синтез является медленным и трудоемким, так как после каждого этапа продукт необходимо удалять из реакционного раствора вручную. Кроме того, этот подход требует наличия еще одной химической группы для защиты С-конца первой аминокислоты. Преимуществом жидкофазного синтеза является то, что продукт очищается после каждого этапа, поэтому побочные реакции легко обнаружить. Также можно проводить конвергентный синтез, при котором синтезируются отдельные пептиды

соединяются вместе для создания более крупных пептидов (Полянский М. А., 2021).

На сегодняшний день наиболее распространенным методом синтеза пептидов является твердофазный синтез. Вместо защиты С-конца химической группой С-конец первой аминокислоты соединяется с активированной твердой опорой, такой как полистирол или полиакриламид. Такой подход выполняет двойную функцию: смола действует как С-концевая защитная группа и обеспечивает быстрое отделение растущего пептидного продукта от различных реакционных смесей во время синтеза. Как и во многих других биологических производствах, были разработаны синтезаторы пептидов, позволяющие автоматизировать процесс и сделать его высокопроизводительным (Lloyd-Williams P. et al., 1997).

При помощи химического синтеза затруднительно получить пептиды высокой массы, так как синтез пептида с последовательностью более 30 аминокислот весьма сложен. Несмотря на это, химический синтез обладает серьёзным преимуществом. Благодаря этому методу возможно синтезировать пептиды в большом количестве и высокой чистоты. Химический синтез пептидов дорогостоящ и затруднителен для получения длинных цепей, обладающих трехмерной организацией.

При синтезе в культуре клеток необходимо применять генно-инженерные методы. Использование этих методов позволяет получать АМП любой необходимой длины. Недостатками этого подхода можно назвать недостаточную точность при воссоздании пространственного строения АМП. Как и химический синтез, синтез в культуре клеток-продуцентов требует значительных материальных вложений.

Выделение АМП из организма-хозяина даёт возможность выделять целые комплексы АМП и позволяет воссоздать структуру активных компонентов. К недостаткам этого метода относится то, что он не позволяет выделять АМП в полностью чистом виде, выделенные соединения являются

смесью веществ с диапазоном молекулярных масс. Также высок риск повреждения выделяемого продукта.

В этой связи наши усилия при разработке антимикробной композиции на основе антимикробных пептидов были направлены на минимизацию указанных выше недостатков. Для получения пептидов целесообразно использовать различные виды насекомых. Они просты в содержании и уходе, дают быстрый прирост биомассы и вырабатывают достаточное количество разных фракций антимикробных пептидов.

Так, группой исследователей были выделены и изучены пептиды из личинок домашней мухи (*Musca domestica*). Для выделения антимикробных пептидов навеску из личинок домашней мухи измельчали до однородной массы в ступке с песком. По мере перетирания добавляли раствор, содержащий 0,25% азиды натрия и фосфатный буфер. Смесь перемешивали в течение 4 часов. После этого её центрифугировали и отделяли надосадочную жидкость, содержащую антимикробные пептиды, от осадка. Затем осуществляли высаливание, добавляя к полученному раствору $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. После этого раствор на 24 часа оставляли в морозильной камере при 5°C с дальнейшим центрифугированием в течение 40 минут со скоростью 4200 оборотов в минуту при 5°C . Выделение фракций осуществлялось при помощи хроматографии.

Основные стадии метода - высаливание, хроматографическое разделение на колонке BioSep SEC S2000 и создание конечной фармацевтической композиции.

Данным методом авторам удалось выделить 6 фракций антимикробных пептидов, одна из которых показала выраженный антибактериальный эффект на исследуемые группы микроорганизмов (Патент № 2714128 С1 Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения. Л. С. Крылова, Б. И. Древко, Е. А. Фауст [и др.]).

Одним из доступных источников пептидов широкого спектра действия является насекомое чёрная львинка (*Hermetia illucens*). Пептиды, выделенные

из личинок этих насекомых, оказывают избирательное воздействие на микроскопические грибы, а также на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Была показана высокая антимикробная активность пептидов из *Hermetia illucens* по отношению к таким возбудителям, как *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* (Смирнова К.Ю. и др., 2020). В качестве источника пептидов использовали биомассу личинок чёрной львинки (*Hermetia illucens*). Личинок измельчали, после чего проводили экстракцию водорастворимых пептидов 0,1 М фосфатно-солевым буфером. Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили с использованием колонки BioSepS2000 (300×2120 mm) при длине волны 280 нм и объеме петли 1575 мкл. В качестве элюента использовали 0,1 М фосфатно-солевого буфера. Было выделено 7 белковых фракций, две из которых обладали выраженным антибактериальным эффектом по отношению к изученным группам микроорганизмов (Смирнова К.Ю. и др., 2020).

Пептиды также выделяют из личинок восковой моли (*Galleria mellonella*). Для этого осуществляют сбор гемолимфы из предварительно охлаждённых личинок. Гемолимфу личинок смешивают с кристаллами фенилтиомочевины, после добавляют ингибитор протеаз и антикоагулянт, содержащий хлорид натрия, ЭДТ и цитратный буфер. Затем супернатант центрифугируют повторно. Для элюирования липидов используют гексан. При помощи повторного центрифугирования элиминировалась гексановая фракция. Для элиминирования фракции этилацетата также использовалось центрифугирование с добавлением ацетилацетата. После этого к раствору добавлялась смесь из воды, ледяной уксусной кислоты и метанола и далее раствор подвергался центрифугированию для осаждения белковой фракции. Для обращённо-фазовой хроматографии супернатанта использовался картридж Wakerbond spе C-18. Для элюции применялся Na-фосфатный буфер. В результате исследователи выделили 4 различных белковых фракции,

отличающихся временем элюции. Для количественного определения содержания пептидов применялся колориметрический метод Лоури. Все пробы разводили в дистиллированной воде в соотношении 1:2, после чего использовали спектрофлуориметр Solar CM-2330 (интервал волн составлял 200-3000 нм) (Костина Д.А. и др., 2013).

Помимо сырья, получаемого из биомассы насекомых, для выделения пептидов также используется сырьё, полученное из других животных. В 2015 году вышла статья отечественных учёных, в которой было описано получение антибактериальных пептидов из лиофильно высушенных экстрактов слизистых оболочек свиней. Сырьё замораживали и тщательно измельчали. Экстракцию проводили на лабораторной диспергирующей установке. Полученные экстракты центрифугировали, после чего отбирали надосадочную жидкость и подвергали её ультрафильтрации. Экстракты разделяли на три фракции в зависимости от их молекулярных масс. Далее фракции подвергали лиофильному высушиванию. Исследование выделенных пептидов проводили при помощи электрофореза с использованием полиакриламидного геля и лаурилсульфата натрия ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) на предварительно подготовленных образцах с концентрациями 0,5 и 0,6 мг/мл в буфере для разведения.

Следует отметить, что тщательное изучение антимикробных пептидов насекомых может расширить горизонты использования и создать жизнеспособные альтернативы традиционным противомикробным соединениям для ветеринарной медицины.

1.6. Потенциальные возможности использования насекомых в производстве антимикробных пептидов

АМП являются частью врождённого иммунитета живых существ, обеспечивающего неспецифическую защиту организма против чужеродных агентов (Martin, S.F., 2014; Lu H.– L. et al., 2016). Пептиды состоят из остатков аминокислот, соединённых в цепи при помощи пептидных связей. Число

таких последовательностей может достигать до 50 цепей, как правило представленных L-аминокислотами (Sirtori, L.R., 2008). Многие АМП обладают способностью напрямую уничтожать патогенные микроорганизмы благодаря остаткам лизина и аргинина, которые также определяют положительный заряд пептида. Преимущество использования пептидов в качестве противомикробных средств заключается в том, что они проявляют эффективность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе и мультирезистентных бактерий (Sirtori, L.R., 2008; Ursic-Bedoya R. et al., 2011; Vonkavaara M. et al., 2013; Khanum, R. J., et al., 2017). Многие АМП реализуют антимикробный потенциал благодаря способности разрушать структуры клеточной мембраны и воздействовать на внутриклеточные тела (Thomas S. et al., 1999; Mahlapuu, M., 2016).

Согласно ряду источников АМП могут найти широкое применение в ветеринарной медицине, так как могут быть использованы в роли иммуномодулятора (Kruse T. et al., 2008; Vilcinskas A. et al., 2011; Fjell C.D. et al., 2012). АМП эффективны в профилактике рака кожи, лечении раневых инфекций и аутоиммунного диабета (Chernysh, S. et al., 2002; Sun J., 2015; Tonk M. et al., 2016; Patocka J. et al., 2019). Многообещающие результаты АМП предполагают его использование в новых терапевтических препаратах (Arora S. et al., 2010; Mahlapuu, M., 2016).

АМП были найдены среди представителей всех царств, в том числе у простейших, бактерий, грибов, растений и животных. Представители класса насекомых демонстрируют успешную приспособляемость к условиям среды, в которых они обитают, в том числе устойчивость к патогенным микроорганизмам (Hillyer J.F., 2016). Большое видовое разнообразие насекомых делает их подходящим источником для выделения АМП (Moretta, A. et al., 2020; Manniello D. et al., 2021).

Антибактериальная активность среди насекомых самой первой была изучена на иммунизированных куколках гигантских шелкопрядов *Samia Cynthia* и *Hyalophora cecropia* (Voman, H.G. et al., 1974; Faye I. et al., 1975).

Вскоре антимикробные свойства были обнаружены и у пептидов, выделенных из мух дрозофил *Drosophila melanogaster*, заражённых бактериями (Robertson, M. et al., 1986). Выделенный в 1980 году из насекомых АМП цекропин получен из куколок самой большой моли в Северной Америке *H. cecropia* (Steiner H. et al., 1981). Из фруктовой дрозофилы *D. melanogaster* успешно выделено несколько классов пептидов, оказывающих антимикробное действие (цекропин, аттацин, дефензин, дрозомидин, диптерицин, дрозонин и метниковины) (Imler J.L. et al., 2005).

В настоящее время есть ряд насекомых, недостаточно изученных на предмет содержания АМП в их составе. Например, сравнительно недавно появились работы по иммунизации *Zophobas morio* и выделению из них АМП. Был выявлен антимикробный и протекторный эффект пептидов, содержащихся в гемолимфе личинок *Zophobas morio*. Пептиды были эффективны как в отношении Гр⁺, так и в отношении Гр⁻ микроорганизмов, что даёт основания полагать об их высоком терапевтическом потенциале в отношении возбудителей мастита коров, помимо этого была отмечена низкая гемолитическая активность используемых концентраций (Du, M. et al., 2020; Lee, J.H. et al., 2021).

Постепенно появляются всё новые исследования, изучающие потенциал использования различных насекомых, как источника получения антимикробных пептидов. Из пчелиного яда был выделен пептид мелитин, демонстрирующий антимикробную активность в отношении патогенных микроорганизмов *Borrelia burgdorferi* (Socarras, K.M. et al., 2017), *Listeria monocytogenes* (Wu X. et al., 2016), *S. aureus* и *P. aeruginosa* (Chen J. et al., 2016; Jamasbi E. et al., 2018).

Из иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* выделен антимикробный пептид персукатузин, и была подтверждена его антимикробная активность в отношении некоторых штаммов *S. aureus* (Mylonakis E. et al., 2016; Miyoshi N. et al., 2017).

Из маточного молока медоносных пчёл *Apis mellifera* был выделен ряд пептидов, иммуномодулирующих и антимикробных. Пептид джеллин проявил активность в отношении грибов, Гр⁺ и Гр⁻ микроорганизмов, исследования перспектив его использования ещё продолжаются (Fontana R. et al., 2004; Barnuti L.I. et al., 2011; Jia F. et al., 2018).

Из мясных *Sarcophaga peregrina* и плодовых мух *D. melanogaster* были выделены пептиды диптерицины, проявившие антимикробную активность, а отношении Гр⁻ бактерий *E. coli* К, *Erwinia hericola* Т и *Erwinia carotovora* (Reichhart J.M. et al., 1992; Ishikawa M. et al., 1992).

По современным данным на класс насекомых, включающий около 2 000 000 миллионов видов, приходится около 80% от всего биоразнообразия на планете. По некоторым оценкам количество особей насекомых достигает 10¹⁸.

Благодаря своему биоразнообразию и высокой степени приспособляемости к условиям окружающей среды, насекомые всё чаще становятся объектами исследований при поиске новых терапевтических препаратов (Kroeckel S. et al., 2012; Stamer A. et al., 2014; Józefiak D. et al., 2016).

Одним из преимуществ содержания и использования насекомых в промышленных масштабах в качестве источников полезных соединений является относительная простота их содержания в искусственных условиях. Предпочтительным является крупное промышленное производство, позволяющее не только создать и поддерживать необходимые условия микроклимата в инсектариях, но также обеспечить достаточное пространство для размещения большого количества особей, что позволит избежать негативных последствий инбридинга. Например, считается, что при содержании небольшого количества особей, в течение первых пяти поколений у насекомого *Hermetia illucens* в популяции могут накапливаться негативные мутации, приводящие к дегенерации мух и потере ими ценных качеств, а также уменьшению количества кладок и отложенных яиц. Для предотвращения этого рекомендуется не только содержать большое число

особей, но и вводить время от времени самцов мухи, для поддержания разнообразия генофонда (Pestsov G.V., et al., 2023).

Насекомые удивительно устойчивы к бактериальным инфекциям. Защита насекомых от патогенов обеспечивается клеточными и гуморальными механизмами, причем в последней категории доминирует врожденный иммунитет. При обнаружении бактерий активируется сложный генетический каскад, который в конечном итоге приводит к синтезу антибактериальных пептидов и их высвобождению в гемолимфу. Пептиды обычно состоят из 20-40 аминокислотных остатков. В то время как пептиды, богатые пролином, и пептиды, богатые глицином, преимущественно активны в отношении грамотрицательных штаммов, дефензины избирательно убивают грамположительные бактерии, а кекропины активны в отношении обоих типов. Антибактериальные пептиды насекомых очень эффективны: их IC₅₀ (50% ингибирования роста бактерий) колеблется в субмикромольном или низком микромольном диапазоне. Большинство пептидов действуют путем разрушения бактериальной мембраны или вмешательства в сборку мембраны, за исключением дрозодина, апидецина и пиррокорицина, которые, по-видимому, дезактивируют бактериальный белок стереоспецифическим образом. В соответствии со своей биологической функцией мембраноактивные пептиды образуют упорядоченные структуры, например, альфа-спирали или бета-плиссированные листы, и часто образуют проницаемые ионные поры. Их цитотоксические свойства использовались в исследованиях *in vivo*, направленных на прогрессирование опухоли. Хотя нативные пептиды быстро разлагаются в биологических жидкостях, отличных от гемолимфы насекомых, структурные модификации делают пептиды устойчивыми к протеазам без ущерба для биологической активности. Действительно, аналог пиррокорицина демонстрирует отсутствие токсичности *in vitro* и *in vivo* и защищает мышей от экспериментальной инфекции кишечной палочки (Bencivengo A.M. et al., 2002).

Иммунная система насекомых включает два фактора: клеточный и гуморальный. Первый представлен фагоцитами, второй включает в себя белки и пептиды (Lee, K.S., 2020). Иммунный ответ насекомых на воздействие патогенных микроорганизмов можно разделить на конститутивный, т.е. немедленный, и индуцированный, развитие которого занимает до 3 часов (Haine E.R., 2008; Arora S. et al., 2011). Из павлиноглазки *Hyalophora cecropia* был получен первый выделенный АМП цекропин (Steiner H. et al., 1981). До сих пор известно более 5000 АМП, из которых 2301 выделены у животных. *Hermetia illucens* подходящий источник для выделения пептидов из-за ее резистентности ко многим болезнетворным микроорганизмам (Lalander C.H. et al., 2014). Среда обитания *Hermetia illucens*, чьи личинки в качестве субстрата используют разлагающиеся органические остатки, определила высокую устойчивость насекомого к патогенным агентам.

При анализе возможных путей получения АМП, следует обратить внимание на насекомых ввиду их высокой устойчивости к выживанию в загрязненных объектах окружающей среды. Насекомые питаются веществами, сильно обсемененными инфекционными агентами, что может являться причиной инфекционных заболеваний. Следует отметить, что возбудители заболеваний у людей могут быть такими же, что и у насекомых. Вместе с тем, насекомые для предотвращения инфицирования и выживания в агрессивной среде могут синтезировать АМП (Barnes K. M. et al., 2010). Следовательно, АМП, выделенные из насекомых, также обладают высоким потенциалом для борьбы с патогенами сельскохозяйственных животных и человека (El-Bassiony G. M., 2016).

Когда микробный агент пытается проникнуть в организм насекомого, физический барьер действует как первая линия защиты, и в случае, если хозяин способен бороться физическими барьерами, активируются клеточные и гуморальные реакции, что приводит к выработке АМП (Lu H.L. et al., 2016). Микробная клетка защищает внутриклеточные компоненты и их синтез через клеточную мембрану. Любое повреждение клеточной мембраны увеличивает

гибель клеток из-за взаимодействия внутриклеточных компонентов, таких как нуклеиновые кислоты, белки, ферменты и многие другие, с разрушающим агентом. Полный функциональный механизм АМП все еще изучается, но внутриклеточное и внеклеточное вмешательство рассматривается как способ действия (Scocchi M. et al., 2016).

Из насекомых выделено большое количество антимикробных пептидов, что в том числе объясняет их широкую приспособляемость к различным условиям существования и широкое распространение на планете (Masiero F. S. et al., 2016).

АМП у насекомых, как правило, синтезируются в жировом теле и гемолимфе (Vilcinskas A., 2013). Однако, у разных видов насекомых содержится разное количество пептидов. Так, из чёрной львинки было выделено 50 АМП в то время, как из других насекомых, как например гороховой тли *Acyrtosiphon pisum*, пептиды выделить не удалось, что-либо говорит о не разработанности методик выделения, либо об их меньшем содержании в организме насекомого (Shelomi M. et al., 2020). Одним из наиболее хорошо изученных семейств АМП насекомых являются цекропины. Первоначально цекропины, оказывающие противои инфекционное и противораковое действие, были выделены из куколок бабочки павлиноглазки цекропии *Hyalophora cecropia*, но позже он был обнаружен и во многих других насекомых, среди которых мухи дрозофиллы, шелкопряды, пчёлы (Dutta P. et al., 2019). В дрозофилах помимо цекропинов было выделено ещё 7 семейств, включавших 34 АМП (Tzou P. et al., 2002). АМП дефензины, выделенные из дрозофил показали эффективность в отношении грибов и Gr⁺ бактерий (Tzou P. et al., 2002).

Из вышеперечисленного можно сделать вывод, что огромное разнообразие насекомых предоставляет большие возможности для их изучения. Необходимо продолжать исследование их иммунных механизмов, что позволит открывать всё новые антимикробные соединения, которые можно будет использовать, как основу для создания новых лекарственных

средств, как заменяющих классические антибиотики, так и оказывающих лечебное действие в синергии с ними.

II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами для исследования служили личинки насекомого чёрная львинка *Hermetia illucens*, выращенные и культивируемые на базе лаборатории кафедры микробиологии и биотехнологии Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова.

Муха черная львинка *Hermetia illucens* – это крупная муха из семейства львинок *Stratiomyidae*, естественный ареал распространения которой считается Северная и Южная Америка (Rozkošný R. A., 1983).

Развитие чёрной львинки включает в себя несколько последовательно сменяемых стадий, которые проходит насекомое: яйцо, личинка, предкуполка, куполка, имаго. Размер имаго насекомого крупный и колеблется от 15 до 20 мм. Размер тела самцов меньше, чем самок. Цвет тела чёрный, конечности светлые. Взрослые особи не едят, но пьют, ротовой аппарат лижущего типа. Голова насекомого широкая, с большими, широко разведёнными глазами. Насекомые этого вида способны размножаться в искусственных условиях на протяжении всего года, что делает их содержание и использование практичным и удобным (Bessa L. et al., 2020; Садыкова Э.О. и др., 2021).

Эти насекомые способны круглогодично развиваться в чистой культуре в искусственных условиях, что позволяет использовать их биомассу в целях получения фармацевтических композиций.

Разработка основ технологии разведения личинок черной львинки, актуальная тема, значение которой существенно повысилось в настоящее время в связи с необходимостью импортозамещения и поиска новых

эффективных биологических антибактериальных субстанций для сельскохозяйственных животных.

Взрослые насекомые и их личинки содержались в инсектарии. Для взрослых имаго и личинок чёрной львинки были сконструированы 3 инсектария, объёмом по 0,90 м³, а также использовался промышленный инсектарий. Температура в помещении, где содержались личинки, поддерживалась на уровне 30°C, что создавало благоприятные условия как для жизнедеятельности и спаривания взрослых насекомых с последующей кладкой яиц, так и для развития личинок насекомых. При данной температуре взрослые особи наиболее активны в создании кладок, а личинки активнее потребляют кормовой субстрат, что ускоряет прохождение ими стадий цикла развития от личинки до имаго. Влажность в инсектарии поддерживалась на уровне 40%, что является оптимальным уровнем, как для взрослых особей, так и для личинок. Для поддержания влажности в помещении применялся ручной пульверизатор с чистой водой. Также использовались напольные поилки. Так как имаго чёрной львинки не употребляют пищу в силу строения челюстного аппарата, для продления жизни взрослых особей в боксах с насекомыми были расставлены специальные поилки с водой, подслащённой разведённым в ней сахаром.

В данном исследовании использовали следующие микроорганизмы рода *Salmonella*: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Abony* ГИСК 103/39 (*S. Abony*), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Infantis* Томск 1 (*S. Infantis*), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhimurium*1626 (*S. Typhimurium*), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Enteritidis* 25 (*S. Enteritidis*).

Salmonella – граммотрицательные, короткие, подвижные палочки с закругленными концами. Не образуют капсул и спор. На бульоне Хоттингера вызывают равномерное помутнение бульона, на агаре Хоттингера образуют гладкие, нежные, круглые полупрозрачные колонии. Способны ферментировать до газа и кислоты глюкозу, мальтозу, арабинозу, маннит, глицерин. Не ферментирует сахарозу, лактозу. Образуют индол, сероводород.

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1. Методика инактивации микроорганизмов

Для получения бактериальной взвеси суточную культуру *S. Enteritidis* с соблюдением правил стерильности смывали с поверхности агара. Для этого наносили 1-3 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (ФСБ) на поверхность среды и, осторожно, шпателем смывали культуру бактерий. Взвеси собирали в стерильные центрифужные пробирки на 50 мл. Затем отмывали в стерильном ФСБ 3 раза при 6 тыс. об/мин в течение 30 минут на центрифуге с угловым ротором (Eppendorf 580R, Германия). Определение концентрации бактериальной взвеси определяли при помощи денситометра DEN-1 и набора готовых разведений для калибровки (BioSan, Латвия).

Для этого в 10 мл ФСБ вносили по 100 мкл исходной взвеси, сравнивали со стандартом мутности на 10^9 и фиксировали в журнале. Затем исходя из того, сколько добавили исходной взвеси, рассчитывали количество взвеси исходной культуры, необходимое для иммунизации в требуемой дозировке 1×10^8 . Для приготовления убитых взвесей в пробирки с готовыми концентрациями смывов бактериальных культур добавляли 1%-й р-р мертиолята натрия в дистиллированной стерильной воде в соотношении 1/100 и инкубировали 48 часов при температуре 37 °С. Затем производили контрольные высевы из каждой пробирки и культивировали 3 суток для подтверждения успешной инактивации. Далее производили отмывку от мертиолята натрия стерильным ФСБ 3 раза при 6 тыс. об/мин в течение 30 минут на центрифуге Eppendorf 580R с угловым ротором. Затем подсчитывали концентрации микробных клеток (Куличенко А.Н. и др., 2001).

2.2.2. Иммунизация личинок инактивированной культурой *S. Enteritidis*

Личинки чёрной львинки, достигшие пятого возраста, иммунизировали инактивированной бактериальной взвесью *S. Enteritidis*. Иммунизацию проводили согласно методике, разработанной учёными Университета

Лиссабона (Serrano I., et al., 2023). Отобранные личинки (300 г) отмывали в стерильной воде от примесей, обусловленных физиологическими процессами, после чего личинок оставляли на 1 день без еды в специально подготовленной чистой ёмкости. Через сутки их промывали повторно. Иммунизацию проводили в стерильном боксе при помощи микроиглы, вводя по 5 мкл подготовленной взвеси с убитой культурой *S. Enteritidis* с концентрацией микроорганизмов 10^8 КОЕ/мл. В качестве контроля другой части личинок вводили физиологический раствор. Инокуляции осуществляли в последний левый сегмент брюшной полости, поверхность которого предварительно дезинфицировали 70% спиртом с помощью ватного тампона. Инъекция в последний сегмент позволяла увеличить пространство для введения иглы и равномерно распределить посевной материал по всему телу.

После проведения иммунизации личинок чёрной львинки оставляли на 24 ч в термостате (ТВ-20-ПЗ-К, Россия) при 28 °С без кормления. Личинки находились в лабораторных стаканах, с затянутым стерильной марлей верхом.

2.2.3. Методика выделения пептидов из иммунизированных личинок насекомого *H. illucens*

После иммунизации личинок чёрной львинки инактивированными бактериями *S. Enteritidis*, был получен испытуемый образец и контроль. Личинки были заморожены, после чего были лиофильно высушены. Для механического измельчения использовалась шаровая мельница с керамическими шарами диаметром 1 и 3 мм. Перетирание осуществляли в цилиндрах, а также лабораторных ёмкостях из стекла с плотно прилегающими крышками. Затем проводили экстракцию и отмывку пептидов от примесей. Пептиды растворяли в стеклянном лабораторном стакане на 1000 мл в 700 мл дистиллированной воды. На дно стакана опускали продолговатый магнит, а затем стакан с растворёнными пептидами ставили на магнитную мешалку без включения подогрева. В раствор с пептидами дробно добавляли серноокислый аммоний ((NH₄)₂SO₄) (исходя из формулы 70 грамм серноокислого аммония

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) на 100 мл дистиллированной воды). Сила перемешивания устанавливалась в половину от максимально возможной. Когда сернокислый аммоний растворялся в дистиллированной воде настолько, что визуально вода становилась прозрачной, раствор разливали по стерильным центрифужным пробиркам (центрифужная пробирка винтовая крышка, ПП, 50 мл, Китай) и центрифугировали (при температуре 5 °С, скорость составляла 5600 оборотах в минуту, время центрифугирования - 15 минут). После центрифугирования надосадочную жидкость декантировали. Осадок на дне центрифужных пробирок собирали посредством вымывания небольшим объёмом дистиллированной воды. Очистку надосадочной жидкости осуществляли посредством эксклюзионной хроматографии (молекулярно-ситовая, гель-проникающая, гель-фильтрационная хроматография) при использовании сит с размером пор 3,5 кДа и 7 кДа (MEMBRA-CEL, Франция). Дистиллированная вода использовалась как подвижная фаза с целью понижения негативного воздействия солевых растворов и различных примесей на пептиды. Диализный мешок с растворённым осадком помещали в стеклянный цилиндр на 1000 мл, заполненный дистиллированной водой. Диаметр пор диализной мембраны позволял очистить водорастворимые пептиды, поскольку соли сернокислого аммония проходили сквозь поры диализного мешка, а пептиды оставались внутри. После этого проводили центрифугирование каждого образца при 5400 оборотах в минуту. Водный раствор после центрифугирования собирали для лиофилизации, жир декантировали.

2.2.4. Анализ выделенных пептидов

Содержание белка в исследуемых фракциях определяли по методу Лоури на спектрофотометре «ShimadzuUV-1280» (Shimadzu Corporation, Япония) при длине волны 450 нм (Lowry O. H. et al., 1951).

В сравнительном аспекте антимикробного действия пептидных фракций, полученных разными методами, для разделения водорастворимых пептидов использовали метод высокоэффективной жидкостной

хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектором (стайер-Аквилон, Россия). Кроме этого, хроматографический анализ проводили с целью определения химической чистоты получаемых пептидов на хроматографе Стайер Аквилон (Аквилон, Россия) с УФ-детектором и колонке BioSep-SEC-s2000 (Phenomenex, США), в качестве элюента использовали дистиллированную воду при скорости потока 0.5 мл/мин и длине волны 254 нм. Перед проведением хроматографического исследования в образцы с пептидами доливали небольшое количество ФСБ с целью растворения осадка. Анализ проводили при следующих условиях: температура колонки 25 °С, объем вводимой пробы - 20 мкл, скорость потока - 1,0 мл/мин, время анализа 60 мин.

Для более четкой идентификации и изучения размера полученных пептидов после разделения на диализных мембранах проводили методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Zetasizer (Malvern Instruments, Великобритания). Все измерения проводились в 10-миллиметровой кювете, в качестве растворителя использовали дистиллированную воду. Исследования проводили на базе центра коллективного пользования «Симбиоз» с применением научного оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (г. Саратов).

2.2.5. Методика определения чувствительности к антибиотикам

штаммов сальмонелл

Для проведения опыта были отобраны следующие культуры микроорганизмов из музея кафедры микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВО Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова– *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*.

Для культивирования микроорганизмов использовали мясопептонный бульон (МПБ), ГМФ-агар, висмут-сульфит агар.

Для определения чувствительности к антибиотикам изучаемых штаммов использовали индикаторные диски для определения чувствительности микроорганизмов к лекарственным препаратам производства ООО «Нита-Фарм» (Россия) (Методические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2021).

Определение устойчивости микроорганизмов рода *Salmonella* к антибиотикам выполняли согласно методическим указаниям ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

2.2.6. Определение острой токсичности

Исследование острой токсичности изучаемого препарата базировалось на основополагающих документах OECD 401 «Acute Oral Toxicity», 1987, OECD 423. «Acute Toxic Class Method», 2001, ГОСТ 32644-2014, позволяющие классифицировать лекарственное средство и оценить его опасность согласно классификации GHS (OECD (1998)). Острые опыты проводились на самках мышей.

Выбранные методы позволяют определить конкретную величину LD50 только в том случае, если хотя бы две дозы вызвали смертность выше 0%, но ниже 100%. Для этого нами был поставлен предварительный эксперимент (Рисунок 1), который позволяет выбрать подходящую стартовую дозу для основного теста по ГОСТ 32644-2014. Препарат вводили единичным животным по пошаговому принципу в соответствии со схемой, представленной в СТП-14.621.21.0008.08-2015 (Test guideline 420 main study: classification according to the currently still applicable eu scheme to cover the transition period until full implementation of the globally harmonised classification system (GHS)).

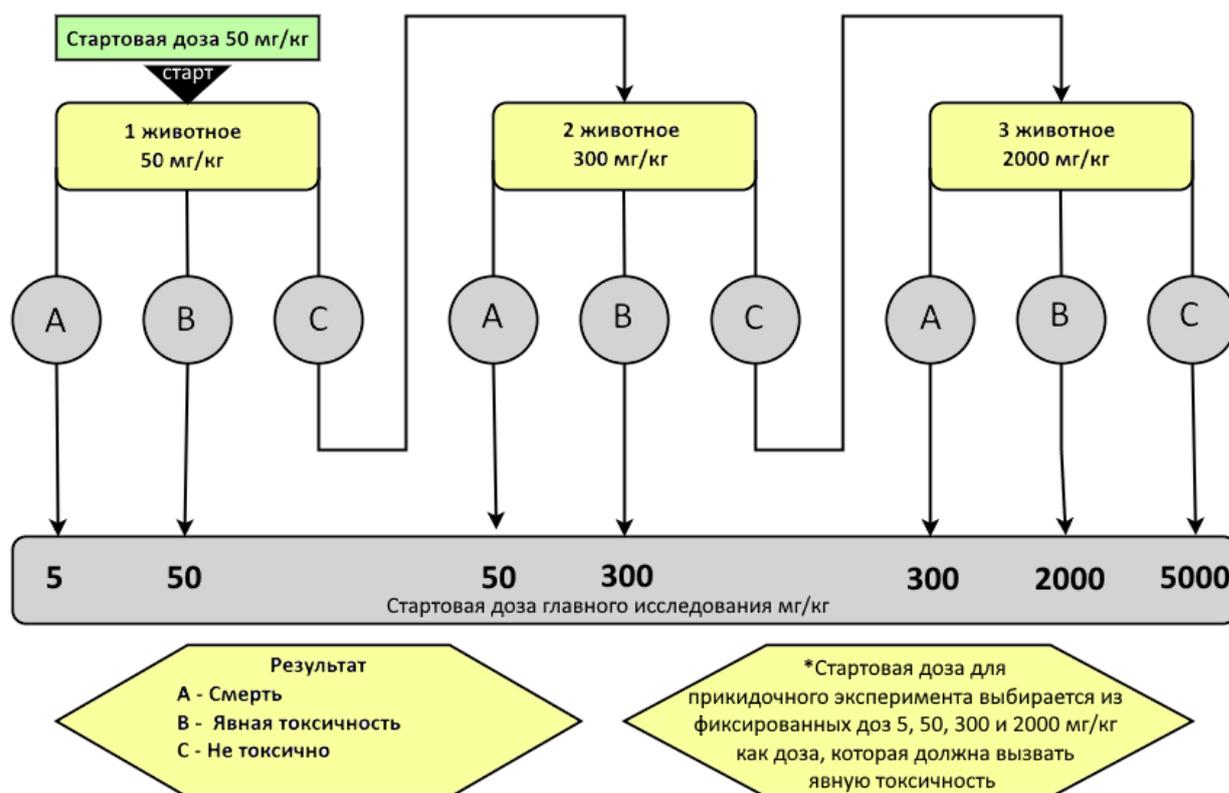


Рисунок 1 – Схема предварительного эксперимента (согласно ГОСТ 32644-2014)

Основной эксперимент по изучению общетоксического действия антимикробных композиций на основе АМП проводили на белых мышах в соответствии с ГОСТ 32644-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека (Рисунок 2). Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности». Согласно протоколу исследований, была сформирована группа белых нелинейных мышей-самок, в количестве 3 голов, живой массой 18-20 г. Препарат вводили внутрижелудочно при помощи желудочного зонда. Раствор антимикробных пептидов вводили в дозе 5000 мг/кг, выше предельной дозы, установленной в ходе предварительного эксперимента согласно СТП-14.621.21.0008.08-2015. Необходимость данного эксперимента имеет прямое отношение к охране здоровья животных, так как в дальнейших клинических испытаниях может

потребуется групповое введение тестируемого вещества. До этого исследования животные были голодными 3-4 часа, и после введения испытуемого раствора АМП корм отсутствовал 1-2 часа.



Рисунок 2 – Схема основного эксперимента (согласно ГОСТ 32644-2014)

2.2.7. Методика изучения профилактической и терапевтической эффективности антимикробной композиции пептидов

Для эксперимента отбирали цыплят после осмотра ветеринарного врача и бактериологического исследования. В эксперименте использовали цыплят-бройлеров кросса Кобб 500 в количестве 105 голов ($n=105$), всего 7 групп по 15 голов в каждой, данное количество животных было рациональным с точки зрения этических принципов и достаточным для обеспечения статистической

достоверности исследования. Для содержания птицы использовали специально оборудованные клетки, параметры микроклимата соответствовали нормативным требованиям. Кормление осуществлялось комбикормами для цыплят-бройлеров согласно возрасту и физиологической потребности. Доступ к воде был свободный. Птицу в группы подбирали по принципу пар-аналогов с учетом возраста, массы тела и физиологического состояния.

После заражения все манипуляции осуществлялись в одноразовой спецодежде и обуви (халаты, шапочки, бахилы) и средствах индивидуальной защиты (маски, перчатки). Перед входом в виварий были расположены дезковрики. Заражение всех групп цыплят проводили однократно, бульонной культурой *S. Enteritidis*, перорально в дозе 1 мл 1×10^7 КОЕ/мл. В процессе лечения в течение 5 дней проводили наблюдение за поведением и состоянием животных, оценку клинического статуса. Кровь для гематологического исследования отбирали у цыплят из подкрыльцовой вены путем прокола на 3 и 14 сутки после экспериментального заражения. Кожу по ходу вен дезинфицировали 70% раствором этилового спирта. Аспирацию крови осуществляли в вакуумные пробирки по 2 мл – в пробирки с антикоагулянтом К2 ЭДТА «ЮНИВЕТ» в модификации «ЮНИВЕТ-Пм» по ТУ 9398-033-59879815-2012. Сыворотки крови получали путем центрифугирования в течении 10 мин при 3000 об/мин. Исследование морфологического состава периферической крови включало подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов проводили в камере Горяева, определение концентрации гемоглобина проводили гемоглобинцианидным методом, лейкограмму определяли в мазках периферической крови. Окраску мазков крови проводили по Романовскому-Гимза.

Оценку эффективности профилактического и терапевтического действия антимикробных препаратов проводили на 5 сутки после курса лечения по клиническим признакам и микробиологическому исследованию.

Для бактериологического анализа использовали помёт, который получали из прямой кишки с помощью стерильных квачей. Затем

приготавливали разведения на стерильном физиологическом растворе в концентрации от 10^{-3} до 10^{-9} . Далее делали высевы из каждого разведения по 0,1 мл на чашки Петри с висмут-сульфит агаром, помещали в термостат при температуре 37 °С в течение 24-48 ч. Для идентификации сальмонелл применяли классические микробиологические методы, изучая морфологические, тинкториальные и биохимические свойства. Для изучения биохимических свойств использовали набор ЭНТЕРОтест 24 (стриппированный для идентификации энтеробактерий).

Серологическую идентификацию сальмонелл проводили с использованием набора реагентов «Сыворотки диагностические сальмонеллёзные адсорбированные О-поливалентные для реакции агглютинации, ЗАО "ЭКОлаб".

По окончании эксперимента изучали сохранность цыплят по группам, кроме этого, осуществляли анализ профилактической и терапевтической эффективности лечения.

2.2.8. Статистическая обработка экспериментальных данных

Для статистической обработки данных применялись различные методы, в том числе вычисление средней арифметической абсолютной величины и относительной величины, коэффициент достоверности, ошибка средней арифметической, уровень значимости (P). Таблицы и диаграммы строились при помощи программы «Excel» на ПК (процессор 12th Gen Intel(R) Core (TM) i3-12100F 3.30 GHz) (Ашмарин, И.П. и др., 1962).

2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.3.1. Разработка метода выделения пептидов из личинок чёрной львинки

Актуальность разработки новых антибактериальных субстанций природного происхождения, которые могут быть использованы для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, в том числе сальмонеллеза цыплят, не вызывает сомнений. Вместе с тем, основными задачами для реализации данных стратегий является поиск оптимальных методов выделения, анализа и контроля фракций пептидов. Предварительно личинки чёрной львинки пятого возраста были иммунизированы убитой взвесью *S. Enteritidis* с целью максимальной экспрессии антимикробных пептидов. Для эффективного выделения водорастворимых пептидов из биомассы личинок черной львинки *H. illucens* нами была разработана методика, состоящая из следующих этапов: замораживание, лиофилизация, гомогенизация, центрифугирование, повторное центрифугирование, фильтрация, лиофилизация, молекулярно-ситовая хроматография, лиофилизация.

Конечной стадией получения антимикробных пептидов, выделяемых из личинок чёрной львинки, было получение светлого мелкодисперсного порошка.

Алгоритм выделения пептидов из биомассы личинок чёрной львинки проводили в несколько этапов. На первом этапе осуществляли замораживание биомассы личинок. С этой целью 300 г личинок помещали в зип-пакет и подвергали замораживанию при температуре $-45-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в морозильной камере лиофильной сушки.

Лиофилизация биомассы замороженных личинок. Для выделения антимикробных пептидов использовались личинки *Hermetia illucens*. Для ускорения и более качественного высушивания замороженные личинки

высыпались на металлические поддоны, идущие в комплекте с лиофильной сушкой CoolSafe 110-10.

Гомогенизация биомассы личинок осуществляли для проведения максимально эффективной экстракции водорастворимых пептидов из биомассы с использованием в качестве экстрагента дистиллированной воды, для последующего центрифугирования и отделения побочной липидной фракции. Гомогенизацию биомассы производили при помощи лабораторной шаровой мельницы iMold (iMold, Россия). С её помощью осуществлялся сухой помол личинок насекомых. Личинки помещались в специально подготовленные цилиндры, идущие в комплекте с шаровой мельницей. Внутри засыпались керамические шарики диаметром 1,5 см в объёме, приблизительно равном объёму, занимаемому высушенными личинками. Затем цилиндр помещали на крутящиеся жернова на скорости 150 оборотов в минуту на несколько дней до полного перетирания. Перетёртые личинки собирали при помощи стерильного шпателя.

Измельченную биомассу растворяли в дистиллированной воде, после этого разливали по 50 мл пробиркам (центрифужная пробирка, Китай). Перед центрифугированием пробирки взвешивали и уравнивали на весах.

Центрифугирование проводили при 5 °C в течении 20 минут, скорость 5400 об/мин (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Германия). Надосадок собирался в специально подготовленную ёмкость и фильтровался от примесей крупных частиц и жира при помощи фильтров из фильтровальной бумаги.

Надосадок снова подвергался замораживанию внутри морозильной камеры лиофильной сушки и затем лиофилизации.

После высушивания лиофилизат собирали в стерильный пенициллиновый флакон в стерильных условиях при помощи шпателя. Содержимое флаконов растворяли в дистиллированной воде, а затем помещали в диализную мембрану. Диаметр пор составлял 3,5 кДа (MEMBRA-CEL, Франция). Затем диализную мембрану с растворённым лиофилизатом внутри

помещали в ёмкость, заполненную дистиллированной водой. Для ускорения диализа и выравнивания концентраций в растворах использовалась магнитная мешалка. Диализную мембрану с пептидами помещали в лабораторный стакан с дистиллированной водой и в стакане поддерживали непрерывное перемешивание со скоростью 500 об/мин.

При появлении опалесценции и желтоватого цвета, дистиллированную воду сливали, а вместо неё заливали аналогичный объём дистиллированной воды.

Таким образом, были удалены фракции пептидов размером до 3,5 кДа. Затем содержимое диализного мешка переливалось в диализную мембрану с размером пор 7 кДа. Таким образом, нам удалось получить раствор с фракцией пептидов размером от 3,5 до 7 кДа.

Раствор, полученный после диализа и содержащий пептиды фракций от 3,5 до 7 кДа сливали в специально подготовленные ёмкости.

Затем содержимое каждой ёмкости замораживали в широких поддонах в морозильных камерах и после этого лиофилизировали. Лиофилизат собирали в пенициллиновые флаконы и хранили в тёмном месте.

2.3.2. Анализ физико-химических свойств, выделенных АМП

Для получения высокоэффективных альтернативных природных антимикробных субстанций важно разработать и стандартизировать способы оценки качества и чистоты выделяемых белковых фракций. На данный момент не предложено доступных и достоверных способов определения и идентификации антимикробных пептидов. На наш взгляд, метод динамического рассеяния света может быть использован для этих целей, поскольку он позволяет достаточно точно определить размер частиц и присутствие микропримесей. Однако, в настоящее время для определения чистоты продукта наиболее часто используется метод хроматографии, хорошо зарекомендовавший себя во всём мире. Мы выбрали метод жидкостной хроматографии, в связи с тем, что метод газовой хроматографии заведомо

несостоятелен, так как для него нужно перевести определяемый образец в газообразное агрегатное состояние. Этого можно было бы добиться, применив высокие температуры, что в свою очередь невозможно, так как при данных условиях белок утратит свои свойства. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, применяемый в наши дни в фармацевтической практике, был наиболее оптимальным способом для определения чистоты выделенных веществ, в том числе с невысокой температурой разложения. Элюентом при анализе выделенных пептидов выступал фосфатно-солевой буфер в виде раствора, так как было необходимо создать одинаковые условия для проведения хроматографирования по водородному показателю (его значение при анализе соответствовало $pH=7,4$). Для исследования использовали колонку BioSep-SEC-s2000. Используя данные о молекулярной массе белков, можно делать предположения о характеристике белков с применением метода хроматографии исключения размера (SEC) (Hong P., et al. 2012).

Использование молекулярно-ситовой хроматографии позволяет разделять и определять количество белковой смеси, при этом не разрушая ее, а возможность оценивать качество белка в процессе промышленного производства делает этот метод особенно ценным. Следует учесть, что данный метод может быть востребован для разделения и очистки биофармацевтических субстанций для лекарственных препаратов. Следует отметить, что существует проблема идентификации белковых биофармацевтических субстанций, вследствие изменения структуры белка более высокого порядка, из-за чего происходит их частичное разрушение и затем агрегирование. Такое состояние как агрегация белков может оказывать влияние на свойства белка, такие как растворимость и активность, а также вызвать нежелательный иммунный ответ (Patten P.A., et al. 2003). Следовательно, проблема агрегации белков может стать преградой к их успешному терапевтическому применению, что делает востребованными

исследования по выявлению способов их идентификации и изучению физико-химических свойств (Philo, J. S., 2009).

Жидкостная хроматография позволяет успешно разделять белки вследствие их взаимодействия с пористыми структурами колонки и в зависимости от их размера, обусловленного их гидродинамическим радиусом. Фракции белков с более высокой массой выходят первыми, поскольку не попадают в поры при прохождении колонки, а белковые молекулы меньшего размера задерживаются порами колонки, что увеличивает время их удержания. Для эффективной дифференциации при хроматографии, важно соответствие колонки нужными характеристикам, а именно иметь достаточное количество пор и однородность. Особенностью SEC является отсутствие взаимодействия подвижной фазы и анализируемого раствора, что отличает эксклюзионную от прочих режимов хроматографии (Striegel A. et al., 2009).

Метод молекулярно-ситовой хроматографии удовлетворяет всем критериям, и позволяет анализировать белки и отделять их от примесей, которые возможны при минимальной пробоподготовке. Сочетанное использование SEC с калибровочными стандартами либо методом динамического рассеяния света может решить проблему очистки образца.

Для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии нами была подобрана оптимальная скорость потока элюента – 0,5 мл/мин, объем петли 71,2 мкл. Анализируя фракции белка, полученные без проведения предварительного этапа эксклюзионной хроматографии, был выявлен широкий спектр примесей (Рисунок 3).

Однако, использование предварительного этапа эксклюзионной хроматографии позволило получить смесь трех пептидов с молекулярной массой от 3,5 до 7 кДа с различием в хроматографическом времени удерживания менее 1 мин (Рисунок 4–6). Полученные данные были подтверждены тремя параллельными экспериментами по выделению и очистке пептидов из аналогичной биомассы личинок (Таблица 1).

Анализируя полученные нами данные, регистрировали сходные значения во времени удерживания белковых фракций 1 и 2, вместе с тем белковые фракции 2 и 3 имели меньшую разницу во времени удерживания, в этой связи полного разделения хроматографических пиков не происходило при проведении эксперимента в трех повторностях. Учитывая, вышесказанное, для оптимизации процесса нами было принято решение не разделять белковые фракции методом ВЭЖХ с различным временем удерживания из-за сходных физико-химических свойств, а далее проводить анализ белковых фракций методом динамического рассеяния света.

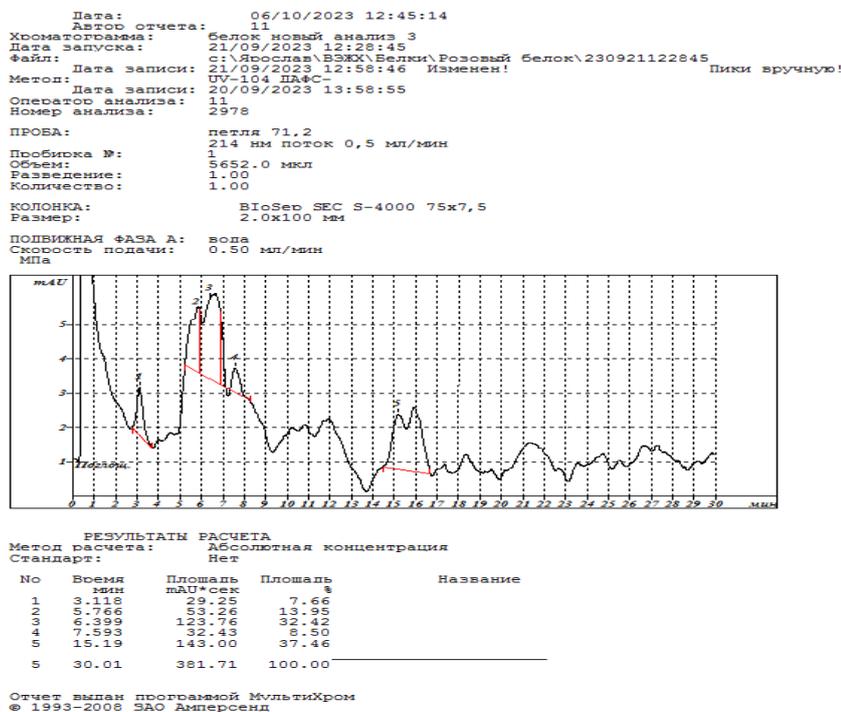
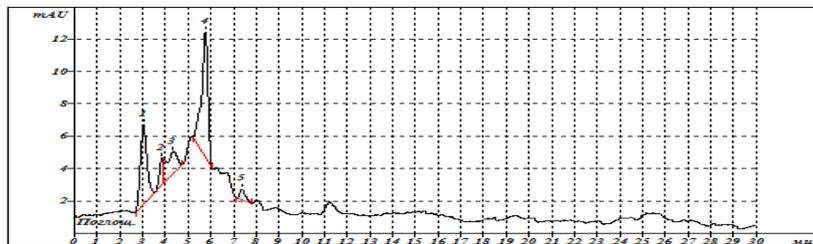


Рисунок 3 – Хроматограмма белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *H. illucens* без проведения этапа эксклюзионной хроматографии

Дата: 06/10/2023 12:43:53
 Автор отчета: 11
 Хроматограмма: Белок новый анализ 3
 Дата запуска: 20/09/2023 19:21:36
 Файл: с:\Ярослав\ВЭЖ\Белки\Розовый Белок\230920192136
 Метод: Дата записи: 20/09/2023 19:51:38 Изменен! Пики вручную!
 UV-104 ДАФС-
 Оператор анализа: 11
 Номер анализа: 2976
 ПРОБА: петля 71,2
 214 нм поток 0,5 мл/мин
 Пробирка №: 1
 Объем: 5652.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: BioSec SEC S-4000 75x7,5
 Размер: 2.0x100 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: вода
 Скорость подачи: 0.50 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

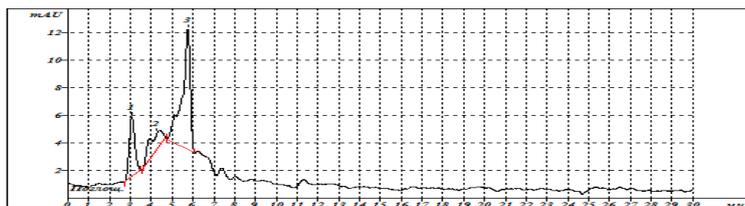
Метод расчета: Абсолютная концентрация
 Стандарт: Нет

No	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	3.025	96.40	30.00	
2	3.85	16.45	5.12	
3	4.329	48.91	15.22	
4	5.77	148.53	46.22	
5	7.358	11.04	3.44	
5	30.01	321.34	100.00	

Отчет выдан программой Мультихром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсент

Рисунок 4 – Хроматограмма белковой фракции 1, выделенной из биомассы личинок *H. illucens*

Дата: 06/10/2023 12:42:50
 Автор отчета: 11
 Хроматограмма: Белок новый анализ 2
 Дата запуска: 20/09/2023 18:49:38
 Файл: с:\Ярослав\ВЭЖ\Белки\Розовый Белок\230920184938
 Метод: Дата записи: 20/09/2023 19:18:39 Изменен! Пики вручную!
 UV-104 ДАФС-
 Оператор анализа: 11
 Номер анализа: 2974
 ПРОБА: петля 71,2
 214 нм поток 0,5 мл/мин
 Пробирка №: 1
 Объем: 5652.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: BioSec SEC S-4000 75x7,5
 Размер: 2.0x100 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: вода
 Скорость подачи: 0.50 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

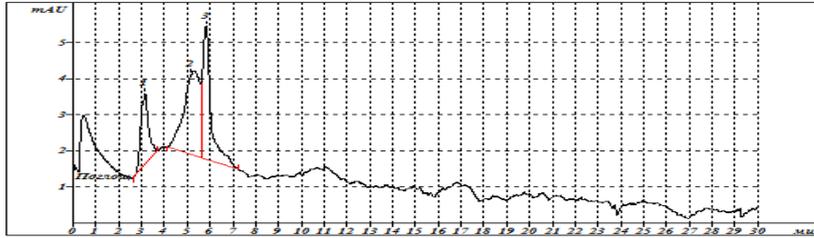
Метод расчета: Абсолютная концентрация
 Стандарт: Нет

No	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	3.056	81.58	21.90	
2	4.275	86.39	23.14	
3	5.758	234.54	62.96	
3	30.01	372.52	100.00	

Отчет выдан программой Мультихром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсент

Рисунок 5 – Хроматограмма белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *H. illucens*

Дата: 06/10/2023 12:41:45
 Автор отчета: 11
 Хроматограмма: Белок ср. анализ 1
 Дата запуска: 20/09/2023 18:12:20
 Файл: с:\Ярослав\ВЭЖ\Белки\Розовый Белок\230920181220
 Метод: Дата записи: 20/09/2023 18:42:21 Изменен! Пики вручную!
 UV-104 ДАФС-
 Оператор анализа: 11
 Номер анализа: 2972
 ПРОБА: петля 71,2
 214 нм поток 0,5 мл/мин
 Пробирка №: 1
 Объем: 5652,0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: BioSep SEC S-4000 75x7,5
 Размер: 2.0x100 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: вода
 Скорость подачи: 0.50 мл/мин
 МПА



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
 Метод расчета: Абсолютная концентрация
 Стандарт: Нет

No	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	3.153	46.94	18.65	
2	5.175	112.38	44.65	
3	5.831	92.35	36.70	
3	30.01	251.67	100.00	

Отчет выдан программой Мультихром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 6 – Хроматограмма белковой фракции 3, выделенной из биомассы личинок *H. illucens*

Таблица 1 – Сравнительная характеристика хроматограмм анализируемых белковых фракций

№ образца	Время удерживания белковой фракции №, мин			Площадь пика белковой фракции №, mAU*сек		
	1	2	3	1	2	3
1	3,02	3,85	4,33	96,4	65,36	148,53
2	3,06	4,28	5,76	81,58	56,39	234,54
3	3,16	5,18	5,83	46,94	112,38	92,35
M±m	3,08±0,08	4,44±0,77	5,31±0,96	74,97±28,72	78,04±34,03	158,47±81,04

Сопоставление данных хроматографического выхода пептидов с площадью пиков белковых фракций позволяет предположить, что разработанный нами метод позволит получать пептиды одинакового размера, что в сочетании с методом динамического рассеяния света позволит достоверно анализировать полученные пептиды на наличие примесей и определять их размер (Хлебцов Б. Н., и др., 2017) (Таблица 2).

Таблица 2 – Соотношение хроматографических выходов, %

№ образца	Хроматографический выход, %		
	1	2	3
Белковая фракция, №			
1	31,07	21,06	47,87
2	21,90	15,14	62,96
3	18,65	44,65	36,69
M±m	24±7	27±18	49±15

Z-Average (nm): 829,453
 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0
 Variance: 0

Derived Count Rate (kcps): 170402,273077...
 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0
 Variance: 0

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,615	0,0		78,82	19,3		1106	0,0	
0,4832	0,0		6,503	0,0		91,28	30,5		1281	0,0	
0,5365	0,0		7,531	0,0		105,7	25,5		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	12,7		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	3,9		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	0,6		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,0		2689	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,0		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,1		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,3		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		458,7	0,6		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	0,0		531,2	0,7		7456	0,0	
3,122	0,0		43,82	0,0		615,1	0,5		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	0,0		712,4	0,3		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	0,0		825,0	0,1				
4,849	0,0		68,05	4,9		955,4	0,0				

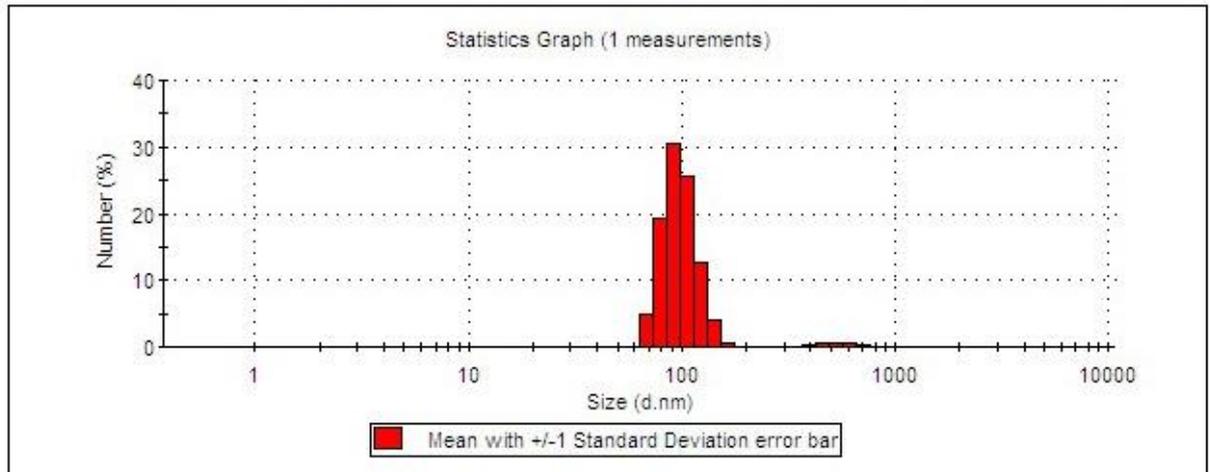


Рисунок 7 – Изучение белковой фракции 1, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС

Размер белковых фракций определяли методом динамического рассеяния света. По результатам было выявлено, что размер белковой фракции 1 составил 68 - 141 нм; фракция 2 имела размер 37 - 79 нм, 3 белковая фракция – 43 нм - 122 нм (Рисунок 7-9). В подтверждение того, что полученные вещества являются белками проводили анализ методом Лоури и подтвердили, что чистота белка составляла 93-97 %.

Z-Average (nm): 1074,773 Derived Count Rate (kcps): 355,380835549...
 Standard Deviation: 0 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0 %Std Deviation: 0
 Variance: 0 Variance: 0

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,615	0,0		78,82	0,8		1108	0,0	
0,4832	0,0		6,503	0,0		91,28	0,0		1281	0,0	
0,5385	0,0		7,531	0,0		105,7	0,0		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	0,0		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	0,0		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	0,0		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,0		2659	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,0		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,0		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,1		5580	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		458,7	0,1		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	8,9		531,2	0,0		7458	0,0	
3,122	0,0		43,82	28,6		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	35,3		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	20,7		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,06	5,8		955,4	0,0				

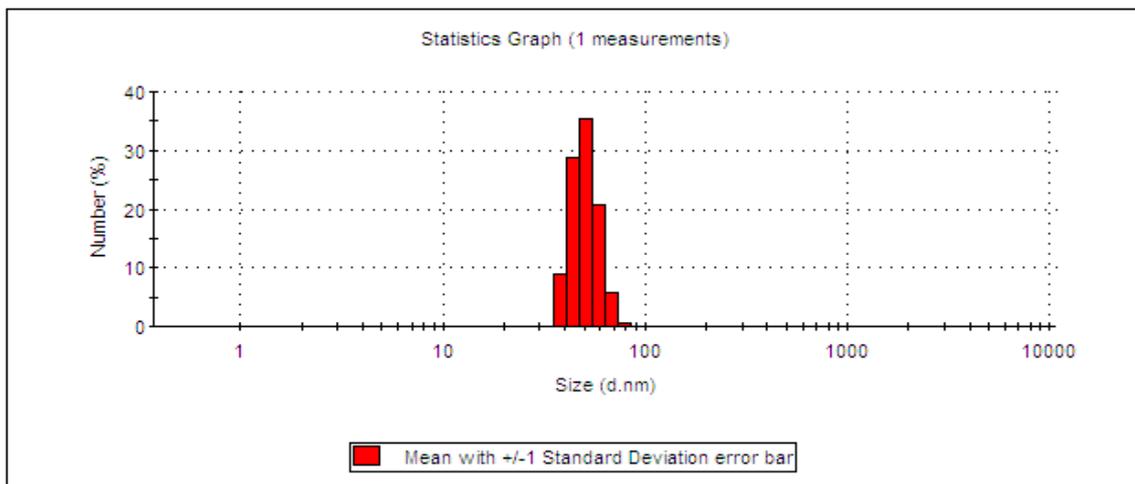


Рисунок 8 – Изучение белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС

Таким образом, нами доказана воспроизводимость разработанного нами способа получения антимикробных пептидов из личинок насекомых. Предложенный нами алгоритм получения и очистки пептидов, включающий в

себя холодную экстракцию в дистиллированной воде, стадии очистки белков, высаливание и молекулярно-ситовую хроматографию в сочетании с методом ДРС позволит достоверно идентифицировать выделенные пептиды и производить данные антимикробные субстанции в промышленных масштабах по низкой себестоимости.

Z-Average (nm): 118,0943 Derived Count Rate (kcps): 22835,9384230...
 Standard Deviation: 0 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0 %Std Deviation: 0
 Variance: 0 Variance: 0

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,615	0,0		78,82	8,0		1108	0,0	
0,4632	0,0		6,503	0,0		91,28	4,3		1281	0,0	
0,5385	0,0		7,531	0,0		105,7	2,2		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	1,1		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	0,5		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	0,2		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,1		2669	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,1		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,0		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,0		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	1,7		458,7	0,0		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	8,7		531,2	0,0		7456	0,0	
3,122	0,0		43,82	18,3		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	22,4		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	19,2		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,06	13,2		955,4	0,0				

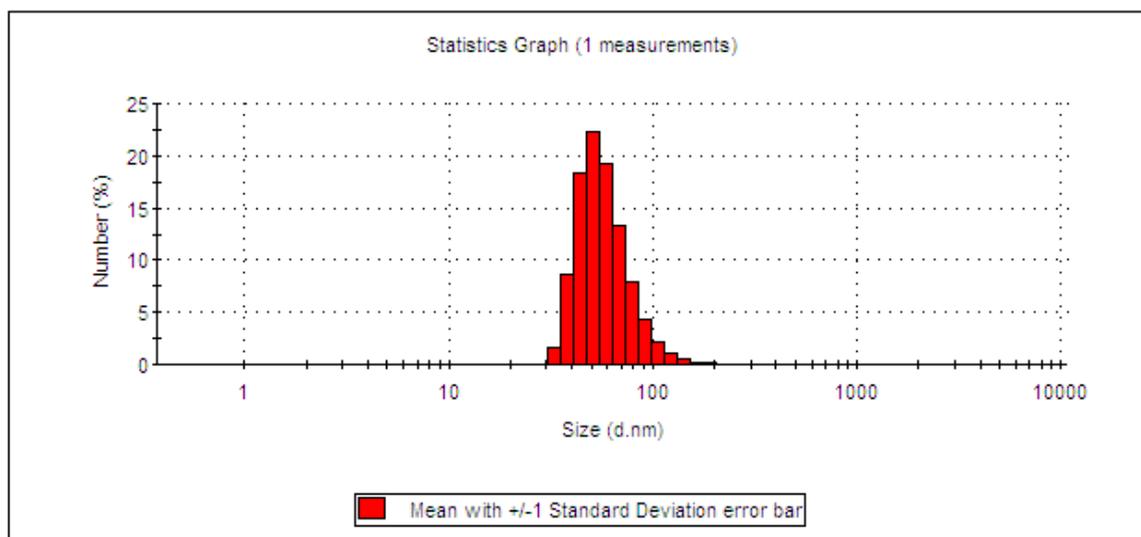


Рисунок 9 – Изучение белковой фракции 3, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС

2.3.3. Изучение чувствительности штаммов рода *Salmonella* к антибактериальным препаратам

В связи с увеличением численности антибиотикорезистентных штаммов, возрастает и необходимость поиска альтернативных противомикробных препаратов для лечения инфекционных заболеваний, одним из таких средств может стать использование лекарственных препаратов на основе антимикробных пептидов.

Для определения возможности профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят композицией антимикробных пептидов, полученных новым способом, было проведено исследование антибиотикорезистентности отобранных штаммов микроорганизмов к ряду антибиотиков (Рисунок 10-11). Для исследования были отобраны следующие штаммы микроорганизмы рода *Salmonella*: *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*.

Таблица 3 – Анализ чувствительности штаммов рода *Salmonella* к антибактериальным препаратам

Антибактериальные препараты	Диаметр зон подавления роста у штаммов <i>Salmonella</i> , мм			
	<i>S. Abony</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
1	2	3	4	5
Цефалоспорины				
Цефепим	26+/-2,3	1+/-0	0	30+/-2,4
Цефалексин	1+/-0	0	1,9+/-0,2	10+/-0,7
Цефуроксим	1+/-0,1	0	19+/-0,6	10+/-0,5
Цефаклор	10+/-0,3	6+/-0,5	7+/-0,6	8+/-0,7
Цефтазидим	8+/-0,6	8+/-0,5	8+/-0,3	7+/-0,4
Цефамандол	8+/-0,3	0	0	8+/-0,6
Аминогликазиды				
Амикацин	2+/-0,1	24+/-1,9	19+/-1	30+/-2,7

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
Стрептомицин	1+/-0,1	0	10+/-0,5	0
Неомицин	6+/-0,4	8,5+/-0,5	0	6+/-0,2
Стрептомицин 10	4+/-0,3	0	0	0
Макролиды и азалиды				
Рокситромицин	0	0	0	0
Кларитромицин	0	0	0	0
Пенициллины				
Амоксиклав	8+/-0,5	0	0	8+/-0,7
Карбенициллин 10	10+/-0,3	0	0	9+/-0,4
Карбапенемы				
Меропенем	7+/-0,4	11+/-0,4	8+/-0,3	9+/-0,3
Противогрибковые средства				
Амфотерицин	10+/-0,7	0	11+/-1,0	10+/-0,7
Флуконазол	10+/-0,5	0	11+/-0,4	9+/-0,8
Нистатин	0	0	5+/-0,3	0
Интраконазол 10	10+/-0,9	0	11+/-0,8	9+/-0,4
Фторхинолоны				
Энрофлоксацин	24,4+/-0,6	13,8+/-0,8	31,0+/-0,1	17,6+/-0,5
Антибиотики полициклической структуры				
Фузидин	0	0	0	0

Примечание. ■ Данные штаммы были резистентны к действию указанного антибиотика (МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, 2004).

В результате проведения исследований отобранных нами штаммов на чувствительность к 8 фармакологическим группам антибиотиков (цефалоспорином, аминогликозидам, макролидам и азалидам, пенициллинам, карбапенемам, фторхинолонам, противогрибковым средствам, антибиотикам



Рисунок 10 – Антибиотикочувствительность *S. Enteritidis* к энрофлоксацину



Рисунок 11 – Антибиотикочувствительность *S. Typhimurium* к энрофлоксацину (полициклической природы) была выявлена множественная антимикробная резистентность всех изученных нами штаммов (Таблица 3).

Вместе с тем, удалось выявить несколько антимикробных препаратов высокоэффективных в отношении штаммов *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*. Так, штамм *S. Abony* продемонстрировал чувствительность к цефепиму, *S. Infantis* – к амикацину, *S. Enteritidis* – к цефепиму и амикацину. Штамм *S. Typhimurium* был умеренно чувствителен к цефуроксиму и амикацину. Однако следует отметить, что все изученные нами штаммы оказались в той или иной степени чувствительны к действию энрофлоксацина.

Анализируя полученные данные для изучения эффективности применения антимикробных пептидов при сальмонеллезе цыплят в качестве опытного штамма нами был выбран *S. Enteritidis*, который продемонстрировал высокую устойчивость к большинству изученных нами антибактериальных препаратов. Кроме этого, данное решение было обосновано распространенностью инфекций, вызванных этим штаммом, и зоонозной природой данного патогена.

2.3.4. Оценка острой токсичности полученных пептидов

Для определения безопасности использования АМП в качестве профилактических или терапевтических средств определяли значение острой токсичности (LD_{50}). Для эксперимента использовались здоровые белые лабораторные мыши с массой тела 18-20 г.

Для исследования готовили раствор антимикробных пептидов с массовой долей 20% (200 мг/мл). Данная концентрация позволяет ввести животному максимально необходимую дозу действующего вещества, в максимально допустимом объеме с целью введения в желудок – 0,5 мл.

В ходе предварительного эксперимента дозы 5 мг/кг, 50 мг/кг, 300 мг/кг и 2000 мг/кг доводили до адекватных объемов тем же растворителем, что и основного раствора.

В ходе предварительного эксперимента у подопытных мышей падежа и признаков интоксикации не наблюдалось. Все животные после введения вышеуказанных доз и в течении 14 суток после введения были активными,

координация движений не нарушена, кожные покровы бледно-розового цвета, эластичные, без нарушений целостности, шерсть равномерной густоты, гладкая, блестящая, животные хорошо потребляли корм и воду, реакция на внешние раздражители сохранена, фекалии, оформленные в цилиндрические гранулы, мягковатой консистенции (Таблица 4).

Таблица 4 – Состояние физиологических параметров мышей при однократном внутрижелудочном введении раствора антимикробных пептидов с массовой долей 20% (200 мг/мл) в остром опыте

Время	Состояние слизистых	Вид и консистенцию фекальных масс	Потребление корма и воды	Двигательная активность	Внешний вид	Состояние слизистых
Доза 5 мг/кг						
1	2	3	4	5	6	7
Перед началом опыта	С	С	С	С	С	С
Через 10 минут после введения препарата	С	С	С	С	С	С
Через 30 минут	С	С	С	С	С	С
Через 1 час	С	С	С	С	С	С
Через 2 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 часа	С	С	С	С	С	С
Через 6 часов	С	С	С	С	С	С
Через 12 часов	С	С	С	С	С	С
Через 24 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 суток	С	С	С	С	С	С
Через 6 суток	С	С	С	С	С	С
Через 10 суток	С	С	С	С	С	С
Через 14 суток	С	С	С	С	С	С
50 мг/кг						
Перед началом опыта	С	С	С	С	С	С

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7
Через 10 минут после введения препарата	С	С	С	С	С	С
Через 30 минут	С	С	С	С	С	С
Через 1 час	С	С	С	С	С	С
Через 2 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 часа	С	С	С	С	С	С
Через 6 часов	С	С	С	С	С	С
Через 12 часов	С	С	С	С	С	С
Через 24 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 суток	С	С	С	С	С	С
Через 6 суток	С	С	С	С	С	С
Через 10 суток	С	С	С	С	С	С
Через 14 суток	С	С	С	С	С	С
300 мг/кг						
Перед началом опыта	С	С	С	С	С	С
Через 10 минут после введения препарата	С	С	С	С	С	С
Через 30 минут	С	С	С	С	С	С
Через 1 час	С	С	С	С	С	С
Через 2 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 часа	С	С	С	С	С	С
Через 6 часов	С	С	С	С	С	С
Через 12 часов	С	С	С	С	С	С
Через 24 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 суток	С	С	С	С	С	С
Через 6 суток	С	С	С	С	С	С

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7
Через 10 суток	С	С	С	С	С	С
Через 14 суток	С	С	С	С	С	С
2000 мг/кг						
Перед началом опыта	С	С	С	С	С	С
Через 10 минут после введения препарата	С	С	С	С	С	С
Через 30 минут	С	С	С	С	С	С
Через 1 час	С	С	С	С	С	С
Через 2 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 часа	С	С	С	С	С	С
Через 6 часов	С	С	С	С	С	С
Через 12 часов	С	С	С	С	С	С
Через 24 часа	С	С	С	С	С	С
Через 3 суток	С	С	С	С	С	С
Через 6 суток	С	С	С	С	С	С
Через 10 суток	С	С	С	С	С	С
Через 14 суток	С	С	С	С	С	С

Примечание:

Состояние слизистых: соответствует (С) – слизистые оболочки ротовой и конъюнктивальной полости бледно-розовые, влажные, блестящие, без патологических изменений. Не соответствует (Н) – слизистые оболочки ротовой и конъюнктивальной полости имеют синюшный оттенок, либо иктеричные, покрасневшие, сухие, матовые, с кровоизлияниями, имеют нарушения целостности (описывается отдельно по каждому животному).

Вид и консистенцию фекальных масс: соответствует (С) – оформленный в цилиндрические гранулы, мягкой консистенции. Не соответствует (Н) – полужидкой консистенции, с примесью крови, слизи. (описывается детально о по каждому животному).

Потребление корма и воды: соответствует (С) – кормление групповое 2 раза в сутки сбалансированным кормом. Суточное потребление корма без отклонений. Вода – в свободном доступе. Не соответствует (Н) – животное не потребляет (снижение потребления) корм и воду (описывается детально по каждому животному).

Двигательная активность: соответствует (С) – животное активно, отсутствует тремор, судороги, парезы конечностей, положение головы и тела в пространстве соответствует физиологическим параметрам, координация движений не нарушена, вокализация отсутствует. Не соответствует (Н) – животное пассивно, наличие тремора, судорог (описывается детально по каждому животному).

Внешний вид: соответствует (С) – кожный зуд, кожные сыпи и нарушения целостности кожи отсутствуют, шерстный покров равномерный, гладкий, блестящий, слизистые соответствуют

физиологической норме. *Не соответствует* (Н) – наличие кожного зуда, алопеций, изменения шерстного покрова, изменение целостности и цвета слизистых (описывается детально по каждому животному).

При проведении основного эксперимента согласно ГОСТ 32644-2014, доза 5000 мг/кг по действующему веществу, была введена вначале одному животному. В ходе наблюдения за ним гибели и признаков интоксикации не наблюдалось. Поэтому данную дозу ввели двум оставшимся мышам. В ходе наблюдения за которыми, также внешних изменений физиологического состояния выявлено не было. За состоянием животных следили 14 дней. У подопытных животных не было обнаружено нарушений функционирования ЖКТ, гиподинамии, гиперемии кожных покровов или апноэ.

Таким образом, можно заключить, что LD₅₀ более 5000 мг/кг, дальнейшие исследования считаются не целесообразными по этическим нормам, а антимикробные пептиды можно отнести к 5 классу опасности.

2.3.5. Изучение действия антимикробных пептидов при профилактике и лечении сальмонеллеза цыплят

Экспериментальное заражение цыплят проводили согласно схеме. Для изучения профилактического и терапевтического действия использовали антимикробную композицию на основе 20% раствора АМП, полученную из иммунизированных личинок *H. illucens*, в количестве 1 мл в течении 5 дней и энрофлоксацин согласно инструкции, перорально с водой для поения в дозе 0,5 мл на 1 л воды в течение 5 дней. Лечение второй, третьей, четвертой и пятой группы животных начинали при появлении первых клинических признаков заболевания.

С профилактической целью первой группе (n=15) выпаивали антимикробную композицию перорально ежедневно в течении недели, предшествующей эксперименту. С терапевтической целью второй (n=15) опытной группе данную композицию вводили орально; третьей группе (n=15) – внутривентрикулярно; четвертой группе (n=15) давали 20% антимикробную композицию перорально + энрофлоксацин согласно инструкции; пятая группа

(n=15) получала энрофлоксацин согласно инструкции. Шестая группа (n=15) была контрольной (положительный контроль). Седьмая группа – интактная (отрицательный контроль).

После заражения всех групп животных на 3-4 сутки отмечали появление клинических признаков заболевания в виде потери аппетита, угнетенного состояния, диареи с пометом светло-зеленого цвета. На третий день после начала лечения у испытуемых животных отмечали улучшение аппетита и общего состояния. Клиническое выздоровление испытуемых животных подтверждали классическими микробиологическими методами, а именно отсутствием возбудителя в пробах помёта цыплят и гематологическими исследованиями.

Температура тела испытуемых животных в первые два дня после заражения была незначительно повышена. Вместе с тем, в следующие три дня наблюдений температура тела цыплят находилась в пределах физиологической нормы (Приложение, Таблица 1-8).

При анализе гематологических показателей крови установлено достоверное повышение общего количества лейкоцитов во 2-6 группах птиц после заражения, относительно 7 интактной группы цыплят. Повышение лейкоцитов отмечалось за счет псевдоэозинофилов, что указывает на развитие инфекционного процесса, вызванного *S. Enteritidis*. Наряду с этим, в опытных группах цыплят после заражения отмечается достоверное снижение гемоглобина на фоне повышения СОЭ, при отсутствии динамики изменений общего количества эритроцитов периферической крови. Данный факт указывает на гемолитический характер анемии, на фоне интоксикации организма продуктами метаболизма сальмонелл и обезвоживание организма, связанного с диарейным синдромом.

Вместе с этим, в первой группе цыплят, которым за 7 дней до заражения выпаивали антимикробную композицию на основе 20% раствора АМП, динамика изменений общего количества лейкоцитов и лейкограммы периферической крови отсутствовала. Гематологические показатели

оставались неизменными, как на третьи, так и на 14 сутки после заражения бактериальной взвесью *S. Enteritidis*. Гематологические показатели этой группы цыплят находились на уровне и не имели достоверных отличий от показателей седьмой интактной группы цыплят.

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что в первой группе цыплятам которой использовали 20% раствор АМП перорально в течении 7 дней до заражения, регистрировали 93,3% эффективность данной профилактики. Во 2 группе из 14 заболевших животных, выздоровело 8, пало 6, таким образом было установлено, что пероральное применение 20% раствора АМП с начала появления клинических признаков заболевания гарантировало эффективность 53,3 %. При парентеральном введении (3 опытная группа) исследуемого раствора АМП из 14 заболевших животных, 10 выздоровело, 4 пало, таким образом, это эффективность использования испытуемой антимикробной композиции составила 66,7%. Пероральное использование 20% антимикробной композиции на основе АМП сочетано с энрофлоксацином (4 группа) обеспечивало эффективность лечения на уровне 93,3%; при применении энрофлоксацина *per os* согласно инструкции, отмечали 80 % эффективность. В контрольной группе цыплят, которым после заражения лечебных мероприятий не проводилось, выжило 2 головы. Гематологические показатели у данных птиц, через 2 недели после заражения находились в пределах физиологических значений. Данный факт связан с индивидуальной резистентностью организма выживших животных (Приложение, Таблица 9-16). Кроме этого, следует отметить, что у выживших животных среди опытных групп гематологические показатели достигали физиологических значений для данного вида и кросса, а также не имели достоверных отличий от интактной группы цыплят, спустя 14 суток после проведения лечебных мероприятий.

Таблица 5 – Изучение профилактического и терапевтического эффекта классических и альтернативных антибактериальных препаратов при сальмонеллезе цыплят

Физиологическое состояние \ Группы	1 опытная группа АМП орально за 7 суток, голов (n=15)	2 опытная группа АМП орально, голов (n=15)	3 опытная группа АМП инъекционно, голов (n=15)	4 опытная группа АМП+ ЭНФ, голов (n=15)	5 опытная группа ЭНФ, голов (n=15)	6 Контроль, голов (n=15)	7 Контроль (интактные), (n=15)
Заболело	1	14	14	15	15	14	15
Выздоровело	0	8	10	14	12	1	0
Пало	1	6	4	1	3	13	0
Эффективность, %	93,3	53,3	66,7	93,3	80,0	6,7	

В опытных группах цыплят, через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий, у выживших животных, гематологические показатели достигали физиологических значений и не отличались от птиц седьмой (интактной) группы. Для подтверждения эффективности лечения были произведены высевы из помета цыплят после лечения и было выявлено отсутствие *S. Enteritidis* классическими микробиологическими методами.

Таким образом, установлена эффективность на уровне 93,3 % для лечения сальмонеллеза цыплят, обусловленная сочетанным пероральным введением 20 % раствора антимикробных пептидов в количестве 1 мл в течение 5 дней и энрофлоксацина перорально с водой для поения в дозе 0,5 мл на 1 л воды в течение 5 дней. Терапевтическое действие такого лечения по эффективности можно сравнить с профилактическим влиянием при использовании анализируемой композиции АМП перорально в течение 7 дней, предшествующих заражению. Полученные нами данные демонстрируют достаточно высокую профилактическую и терапевтическую эффективность анализируемого 20 % раствора АМП (Таблица 5).

Результаты проведенных нами исследований позволяют рекомендовать использование 20% раствора АМП в комплексных лечебно-профилактических и оздоровительных мероприятиях при сальмонеллезной инфекции у цыплят. На основании экспериментальных исследований можно констатировать, что анализируемая антимикробная композиция на основе АМП в рекомендуемых дозах обладает высокой активностью против *Salmonella Enteritidis*.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Актуальным вопросом фармацевтической промышленности, как в гуманной, так и в ветеринарной медицине является поиск новых антимикробных молекул, который будет сосредоточен не только на поиске новых лекарств, но и на своевременной сочетанном использовании существующих и новых антибактериальных препаратов. Среди разнообразных природных противомикробных средств, открытых на сегодняшний день, АМП представляют особый интерес. Эти молекулы представляют собой универсальные, высокоспецифичные антимикробные композиции, которые являются многообещающими кандидатами для коммерческого клинического применения. АМП являются важными компонентами врожденной иммунной системы позвоночных и неспецифической защитной системы растений, грибов и беспозвоночных, которые эволюционировали более 2,6 миллиардов лет назад в качестве мощных противоифекционных средств против различных вирусов, бактерий, микроскопических грибов и паразитов.

Наиболее перспективным направлением на наш взгляд является получение данных антимикробных субстанций из насекомых. Насекомые являются самыми многочисленными видами живых существ, заселившими практически все среды обитания. Они представлены в большом разнообразии, заселили практически все регионы планеты, а некоторые из них обладают внушительной продолжительностью жизни, что подтверждает в том числе эффективность их иммунной системы. Например, только из тутового шелкопряда было выделено 9 антимикробных пептидов (Subrahmanyam, G., 2021; Makwana, P. et al., 2023). Эти небольшие пептиды имеют катионную структуру, богатую положительно заряженными остатками аргинина и лизина, что способствует взаимодействию между ними и цитоплазматическими мембранами микроорганизмов.

АМП могут воздействовать на различные важные метаболические процессы в плазматической мембране или во внеклеточных и

внутриклеточных участках, часто оказывают иммуномодулирующее действие, стимулируют выработку цитокинов (Nguyen, L.T. et al., 2011).

Антимикробные пептиды широко экспрессируются и быстро индуцируются на эпителиальных поверхностях, чтобы предотвратить воздействие различных инфекционных агентов, включая бактерии, вирусы, микроскопические грибы и паразиты. Спектр и механизмы воздействия антимикробных пептидов на болезнетворные микроорганизмы чрезвычайно широк. Кроме этого, АМП *in vivo* могут оказывать синергетические противомикробные эффекты (Rosen, T. et al., 2011).

Распространение антибиотикорезистентных штаммов стимулирует поиск и создание новых, альтернативных лекарственных средств (Powers Jon-Paul S., 2006). В отличие от антибиотиков, к которым многие штаммы бактерий уже выработали устойчивость, пептиды являются перспективным материалом для создания новых лекарственных средств, так как к ним выработать устойчивость может быть сложнее за счёт различных путей воздействия пептидов на микроорганизм (Chernysh, S. et al., 2015).

Некоторые антимикробные пептиды способны проявлять антимикробные свойства не только против бактерий, но в том числе и против вирусных агентов, помимо этого некоторые антимикробные пептиды оказались эффективны против антибиотикорезистентных штаммов.

Наиболее часто высокую резистентность к действию антибиотиков демонстрируют штаммы *Salmonella Enteritidis*. Кроме этого, согласно последним исследованиям роль штаммов *Salmonella Enteritidis* в этиологии сальмонеллезов на птицеводческих предприятиях составляет более 50 % (Скворцов, В.Н. и др., 2020). Заболевания, вызываемые микроорганизмами *Salmonella*, представляют опасность не только для животных, но и для человека (Suphoronski, S.A., 2015).

Учитывая вышеуказанные данные, нами была изучена антибиотикочувствительность штаммов потенциальных кандидатов для иммунизации личинок *H. illucens*. При исследовании отобранных нами

штаммов сальмонелл на чувствительность к восьми фармакологическим группам антибиотиков, была обнаружена множественная устойчивость к антибактериальным препаратам. Вместе с тем, нам удалось подобрать несколько препаратов, обладающих высокой антимикробной активностью по отношению к штаммам *S. Abony*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*. Штаммы *S. Abony* и *S. Enteritidis* были чувствительны к действию цефепима; *S. Infantis* и *S. Enteritidis* – к амикацину. Штамм *S. Typhimurium* показал умеренную чувствительность к цефуроксиму и амикацину. Вместе с тем, необходимо акцентировать внимание на том, что энрофлоксацин оказался наиболее эффективным из всех изученных нами антибактериальных препаратов и показал высокую или умеренную эффективность на все изученные нами штаммы сальмонелл. Результаты изучения антибиотикочувствительности штаммов сальмонелл к действию различных антибактериальных препаратов показал, что все штаммы являются мультирезистентными к действию антибиотиков, однако в качестве опытного штамма был выбран *S. Enteritidis*, вследствие широкой распространенности инфекций и эпизоотической важности заболеваний, вызываемых этим штаммом данного микроорганизма.

Проведённые нами исследования позволили разработать метод выделения и очистки антибактериальных пептидов с учётом проблем, связанных с высоким содержанием жира в личинках, влияющим на трудность выделения и очистки водорастворимых пептидов. Процесс получения водорастворимых пептидов из личинок насекомых включал несколько стадий: замораживание, лиофилизация, гомогенизация, центрифугирование, фильтрация, лиофилизация, эксклюзионная хроматография, лиофилизация.

Следует отметить, что использование эксклюзионной хроматографии перед разделением смеси пептидов методом ВЭЖХ позволило получить смесь трех пептидов с близкими значениями в хроматографическом времени удерживания с разницей менее 1 минуты. Таким образом, разработанный нами метод получения пептидов исключал этап ВЭЖХ, поскольку анализируемые

пептиды обладали сходными физико-химическими свойствами. Для изучения размеров полученных пептидов нами был апробирован метод динамического рассеяния света, позволяющий достаточно достоверно определять размер анализируемых молекул и наличие примесей.

В настоящем исследовании нами были изучены пептиды массой 3,5-7 кДа. Размер белковых фракций для фракции 1 составил 68 - 141 нм; фракции 2 – 37 - 79 нм, для 3 фракции – 43 нм - 122 нм.

Полученные нами экспериментальные данные позволяют сделать вывод о воспроизводимости предложенного нами метода выделения АМП из личинок насекомых. Разработанный нами алгоритм, состоящий из холодной экстракции, стадий высаливания и очистки белков, эксклюзионной хроматографии в совокупности с методом динамического рассеяния света даёт возможность получать и достоверно определять эффективные противомикробные субстанции.

Для определения безопасности использования полученных нами антимикробных пептидов проводили исследование на острую токсичность. Было выявлено, что анализируемые нами АМП относятся к 5 классу опасности.

Экспериментальные исследования о возможности применения антимикробных пептидов при лечении сальмонеллеза цыплят проводили на цыплятах-бройлерах кросса Кобб 500 при заражении убитой бактериальной взвесью *S. Enteritidis*.

Согласно результатам проведенных исследований, эффективность профилактики при оральном применении 20% раствор АМП в течении 7 дней, предшествующих заражению, составила 93,3%. При изучении терапевтической эффективности лечение начинали при появлении первых клинических признаков заболевания. Во второй группе цыплят при пероральном применении АМП регистрировали эффективность на уровне 53,3%. При парентеральном введении эффективность была незначительно выше и составила 66,7%. Наибольший терапевтический эффект (93,3%) отмечали при сочетанном пероральном использовании АМП и

энрофлоксацина. Применение только энрофлоксацина per os согласно инструкции, обеспечивало 80 % эффективность.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований апробирована методика иммунизации личинок *H. illucens*, разработан новый метод выделения антимикробных пептидов из биомассы иммунизированных личинок, представляющий собой алгоритм последовательных этапов, включающих в себя выделение, очистку и идентификацию пептидов. Изучена эффективность использования антимикробных композиций пептидов для профилактики и лечения сальмонеллеза цыплят. Доказано, что 20% растворы АМП обладают высокой противомикробной активностью к штаммам сальмонелл, обладающим множественной устойчивостью к действию классических антимикробных препаратов.

Следовательно, они могут быть использованы для создания высокоэффективных препаратов для профилактики и лечения сальмонеллезом цыплят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что при профилактике сальмонеллеза цыплят эффективность применения композиции антимикробных пептидов составила 93,3%.

2. Терапевтическая эффективность лечения сальмонеллеза цыплят при внутрибрюшинном введении АМП составила 66,7 %; при лечении энрофлоксацином 80%, при сочетанной терапии энрофлоксацином и АМП – 93,3%.

3. Разработан новый метод получения водорастворимых пептидов из личинок *H. illucens*, который в сочетании с холодной экстракцией и стадиями высаливания и очистки белков с последующей молекулярно-ситовой хроматографией позволяет в дополнении с методом динамического рассеяния света достоверно идентифицировать получаемые пептиды.

4. Апробирован метод динамического рассеяния света для определения размера пептидов. Было установлено, что размер 1 фракции составил 68 - 141 нм; 2 фракции – 37 - 79 нм, 3 фракции – 43 нм - 122 нм.

5. Выделенные нами антимикробные пептиды относятся к 5 классу опасности (вещества малоопасные).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Полученные нами антимикробные пептиды показали высокую профилактическую и терапевтическую эффективность при лечении сальмонеллеза цыплят, вызванного антибиотикорезистентными штаммами, и могут быть рекомендованы для разработки противомикробных средств нового поколения. Для профилактики сальмонеллеза цыплят рекомендовано пероральное использование 20% раствора АМП в течение 7 суток. С терапевтической целью предложено сочетанное использование 20 % раствора АМП перорально в количестве 1 мл в течении 5 дней и энрофлоксацина согласно инструкции, перорально с водой для поения в дозе 0,5 мл на 1 л воды в течение 5 дней.

2. Для получения антимикробной композиции рекомендуется использовать личинки насекомого *Hermetia illucens*. Для увеличения экспрессии антимикробных пептидов в гемолимфу насекомых, предварительно следует проводить иммунизацию личинок *H. illucens* пятого возраста в последний левый сегмент брюшной полости, подготовленной взвесью инактивированной культуры *S. Enteritidis* с концентрацией микроорганизмов 10^8 КОЕ/мл в количестве 5 мкл.

3. Метод, разработанный нами, предлагается использовать для выделения антимикробных композиций пептидов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В результате проведенных исследований была подтверждена перспектива использования насекомых в качестве сырья для получения АМП. Проведенное нами исследование показывает потенциал использования иммунизированных личинок насекомых, как источника получения антимикробных пептидов. Это особенно актуально для проведения антимикробной терапии при лечении сальмонеллезной инфекции у цыплят, вызванной антибиотикорезистентными штаммами. Антимикробные композиции пептидов, полученные нами, показали высокую эффективность при профилактике и лечении сальмонеллеза цыплят. Перспектива разработки темы данного исследования заключается в поиске и создании оптимальных лекарственных форм АМП и совершенствовании мер профилактики и лечения сальмонеллеза у других видов сельскохозяйственных животных, в особенности молодняка.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АМП – Антимикробные пептиды

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

ГМФ агар – Питательный агар сухой на основе гидролизата говяжьего мяса ферментативного

МПА – Мясопептонный агар

МПБ – Мясопептонный бульон

ДРС – Динамическое рассеяние света

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – Рибонуклеиновая кислота

УФ – Ультрафиолетовое излучение

ФСБ – Фосфатно-солевой буфер

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

СОЭ – Скорость оседания эритроцитов

КОЕ – Колониеобразующая единица

SEC – Эксклюзионная хроматография

LD₅₀ – Полулетальная доза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / Ашмарин, И.П., Воробьев, А.А. – Ленинград: Медгиз. Ленингр. отд-ние, 1962. – 180 с.
2. Бузмакова, У.А. Химическая классификация и методы определения антибиотиков / Бузмакова У.А., Кудряшова О.С. // Вестник Пермского университета. Серия: Химия – 2018. – Т. 8 (1).
3. ГОСТ 32644-2014 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность. – М: Стандартиформ, 2015. – 15 с. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293767/4293767037.pdf>
4. Жаркова, М.С. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения (обзорная статья) / М.С. Жаркова, Д.С. Орлов, В.Н. Кокряков, О.В. Шамова // Biological Communications. – 2014. – Т. 3 (1). – С. 98 – 114.
5. Землянская, Н.И. Особенности эпизоотологии сальмонеллеза крупного рогатого скота в Хабаровском крае / Н.И. Землянская. – Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 12. – С. 189 – 192.
6. Козак, С.С. Заболеваемость сельскохозяйственных животных и птицы сальмонеллезом / С.С. Козак, Е.С. Баранович, Ю.А. Козак // Тимирязевский биологический журнал. – 2023. – Т. 3. – С. 71 – 77.
7. Костина, Д. А., Действие биологически активных компонентов гемолимфы личинок *Galleria mellonella* на активность щелочной фосфатазы *E. coli* phosphatase of *E. coli* / Д.А. Костина, Н.А. Клёнова, Е.Г. Литвинова // Вестник Самарского государственного университета. – 2013. – Т. 6. (107) – С. 182 – 187.
8. Крылова, Л.С. Индикация пептидов из биомассы личинок насекомых и изучение их антимикробной активности / Л.С. Крылова, Е.К. Ремизов, К.Ю. Смиророва, О.С. Ларионова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2019. – Т. 4 (44). – С. 3 – 6.

9. Куличенко, А.Н. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп патогенности, при работе методом ПЦР: методические указания / А.Н. Куличенко, И.А. Касьян, С.Б. Гаранина [и др.]. – Москва: Изд-ый отдел Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001. – 8 стр.
10. Лощинин, М.Н. Полирезистентность сероваров сальмонелл, выделенных от птицы и из продуктов птицеводства / М.Н. Лощинин, Н.А. Соколова, А.М. Абдуллаева // Health, Food & Biotechnology. – 2020 – Т. 2(2). – Стр. 22 – 33.
11. Мезенцев, С.В. Сальмонеллез – отечественный или импортный / С.В. Мезенцев // Ветеринария. – 2015. – №6. – С. 30 – 32.
12. Методические рекомендации "Методика исследования острой токсичности при пероральном введении, процедура фиксированной дозы (FIXED DOSE PROCEDURE, FDP)". СТП-14.621.21.0008.08-2015.
13. Методические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021). Новая версия 2021-01.
14. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. – Введ. 2004-03-04. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
15. Мусин, Х.Г. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам / Х.Г. Мусин // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 295– 308.
16. ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар. Методические указания. – Введ. - Министерство здравоохранения Российской Федерации.
17. Пат. 2552157 Российская Федерация, МПК С12Р 21/00 (2006.01), С07К 2/00 (2006.01), С07К 1/20 (2006.01), А61К 38/00 (2006.01), А61Р 31/00 (2006.01) Способ получения комплекса антимикробных пептидов насекомого / А.Ю. Яковлев, С.И. Черныш, Н.А. Гордя; ФГБОУ ВПО "Санкт–

Петербургский государственный университет". – № 2013157808/10; заявл. 26.12.2013; опубл. 10.06.15, Бюл. № 16.

18. Пат. 2714128 Российская Федерация. МПК 61К 35/64. Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения / Крылова Л.С., Древко Б.И., Фауст Е.А., Ремизов Е.К., Смирнова К.Ю., Древко Я.Б., Бородина М.А., Осина Т.С., Ларионова О.С.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. – № 2018142602; заявл. 04.12.2018; опубл. 12.02.2020; бюл. 20.

19. Патент № 2714128 С1 Российская Федерация, МПК А61К 35/64, С07К 1/16, С07К 1/36. Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения: № 2018142602: заявл. 04.12.2018: опубл. 12.02.2020 / Л. С. Крылова, Б. И. Древко, Е. А. Фауст [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова".

20. Пименова, В.В. Основные направления оздоровительных мероприятий при сальмонеллезе птиц: принципы и недостатки антибиотикообработок / В.В. Пименова, А.И. Лаишевцев, Н.В. Пименов // Russian Journal of Agricultural and Socio– Economic Sciences. – 2017. – Т. 71. – № 11. – С. 496– 510.

21. Полянский, М.А. Основные концепции синтеза пептидов как нового поколения биологически активных препаратов / М.А. Полянский, А.И. Гинак. – Известия Санкт – Петербургского государственного технологического института (технического университета) – 2021. – Т. 58(84) – С. 62 – 65.

22. Пурьгин, П.П. Выделение антибактериальных компонентов из гемолимфы личинок *Galleria mellonella* // П.П. Пурьгин, О.С. Срибная, Н.А.

Кленова [и др.] // Вестник Самарского государственного университета. Естественная серия. – 2007. – №. 9– 1. – С. 270 – 286.

23. Садыкова, Э.О. Пищевая и биологическая ценность биомассы личинок *hermetia illucens* / Э.О. Садыкова, А. А. Шумакова, С. И. Шестакова, Н. В. Тышко // Вопросы питания. – 2021. – Т. 90 (2). – С. 73–82.

24. Санитарные правила. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.

25. Скворцов, В.Н. Терапия экспериментального сальмонеллёза цыплят антимикробными препаратами группы фторхинолонов / В.Н. Скворцов, В.В. Невзорова, Д.В. Юрин, А.Д. Мазур // Международный вестник ветеринарии. – 2020. – Т. 2. – С. 104 – 107.

26. Смирнова, К.Ю. Выделение антимикробных пептидов из личинок *hermetia illucens* и перспектива их использования / К.Ю. Смирнова, Л.С. Крылова, Е.К. Ремизов, С.В. Горшунова // Международный вестник ветеринарии. – 2020. – Т. 2. – С. 58 –62.

27. Сычева М.В. Антимикробные пептиды тромбоцитов разного происхождения как эффекторы врожденного иммунитета: характеристика и активность / Сычева М.В., Жерар И.В., Карташова О.Л. //Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2019. – № 3. – С. 20.

28. Сычева, М.В. Биологические эффекты антимикробных веществ животного и бактериального происхождения: дис. д-р биол. наук: 06.02.02 : защищена 22.04.16 / Сычева Мария Викторовна. – Башкирский ГАУ. – Уфа, 2016. – С. 274.

29. Хаитов, Р.М. Иммунология: учеб. пособие / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина. – 2002. – 536 с. – ISBN 5– 225– 04543– X. – Текст: непосредственный.

30. Хлебцов, Б.Н. Применение спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света в исследованиях систем золотых наночастиц + ДНК / Б.Н. Хлебцов, Т.Е. Пылаев, В.А. Ханадеев, Н.Г. Хлебцов // Известия

Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2017. – Т. 17. – №. 3. – С. 136–149.

31. Ageitos, L. Frog-derived synthetic peptides display anti-infective activity against Gram-negative pathogens / L. Ageitos, A. Boaro, A. Cesaro [et all.] // Trends Biotechnol. – 2025. – Vol. 43(7). – P. 1642–1667.

32. Altekruze, S.A. Salmonella Enteritidis in Broiler Chickens, United States, 2000–2005/ S.A. Altekruze, N. Bauer, A. Chanlongbutra, R. DeSagun, A. Naugle, W. Schlosser, R. Umholtz, P. White // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 12(12). – P. 1848–1852.

33. Antunes, P. Salmonellosis: the role of poultry meat / P. Antunes, J. Mourão, J. Campos, L.J.C.M. Peixe // Clinical Microbiology and Infection. – 2016. – Vol. 22. – No. 2. – P. 110–121.

34. Arias, C.A. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections / C.A. Arias, B.E. Murray // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2008. – Vol. 6. – No. 5. – P. 637–655.

35. Arora, S. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques / S. Arora, C. Baptista, C.S. Lim // International Journal of Integrative Biology. – 2010. – Vol. 9. – No. 1. – P. 43–48.

36. Arora, S. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus* / S. Arora, C. Baptista, C.S. Lim // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2011. – Vol. 10. – Article No. 6. – 8 p.

37. Ashby, M. Cationic antimicrobial peptides as potential new therapeutic agents in neonates and children: A review / M. Ashby, A. Petkova, K. Hilpert // Current Opinion in Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 27 (3). – P. 258–267.

38. Bahar, A. A. Antimicrobial Peptides / Ali A. Bahar, V.D. Ren // PubMed. – 2013. – Vol. 6(12). – P. 1543–1575.

39. Bao, H. Effects of pig antibacterial peptides on growth performance and intestine mucosal immune of broiler chickens/ H. Bao, R. She, T. Liu, Y. Zhang,

K.S. Peng, D. Luo, Z. Yue, Y. Ding, W. Liu., L. Zhai //Poultry Science. – 2009. – Vol. 88(2). – P.291–297.

40. Barber, L.Z. Vaccination for control of Salmonella in poultry / L.Z. Barbe., A.K. Turner., P.A. Barrow // Vaccine. – 1999. – Vol. 17(20-21). – P. 2538-2545.

41. Barnes, K.M. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species / K.M. Barnes, D.E. Gennard, R.A. Dixon // Bulletin of Entomological Research. – 2010. – Vol. 100. – No. 6. – P. 635– 640.

42. Barnuțiu, L.I. Antimicrobial compounds of royal jelly / L.I. Bărnățiu, L.Al. Marghitas, D.S. Dezmirean, O. Bobis, C.M. Mihai, C. Pavel // Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj– Napoca Animal Science and Biotechnologies. – 2011. – Vol. 68. – No. 1–2. – P. 85–90.

43. Beachey, E.H. Bacterial adherence: adhesin receptor interaction mediating the attachment of bacteria to mucosal surface / E.H. Beachey // The Journal of Infectious Diseases. – 1981. – Vol. 143. – No. 3. – P. 325– 345.

44. Bencivengo, A.M. The efficacy of the antibacterial peptide, pyrrhocoricin, is finely regulated by its amino acid residues and active domains / A.M. Bencivengo, M. Cudic, R. Hoffmann, Jr. Laszlo Otvos // Letters in Peptide Science. – 2002. – Vol. 8. – P. 201–209.

45. Bessa, L. Why for feed and not for human consumption? The black soldier fly larvae / L. Bessa, E. Pieterse, J. Marais, L. Hoffman // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2020. – Vol. 19. (5) . – P. 2747–2763.

46. Bexfield, A. Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / A. Bexfield, Y. Nigam, S. Thomas, N. A. Ratcliffe // *Microbes Infect.* – 2004. – Vol. 6(14). – P. 1297–1304.

47. Björn, C. Efficacy and safety profile of the novel antimicrobial peptide PXL150 in a mouse model of infected burn wounds / C. Björn, L. Noppa, Näslund Salomonsson [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2015. – Vol. 45. – P. 519–524.
48. Bloch–Shilderman, E. An ionophore neurotoxin, induces PC12 cell death: activation of stress kinases and production of reactive oxygen species / E. Pardaxin, H. Jiang, P. Lazarovici // *J. Nat. Toxins.* – 2002. – Vol. 11 (2). – P. 71 – 85.
49. Boman, H.G. Insect immunity I. Characteristics of an i. Barber, A.K. Turner, P.A. Barrow // *Vaccine.* – 1999. – Vol. 17. – P. 20– 21.
50. Brogden, N. K. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? / N. K Brogden, K. A. Brogden // *International Journal of Antimicrobial Agents.* – 2011. – Vol. 38. – P. 217–225.
51. Carmona-Ribeiro, A. M. Novel Formulations for Antimicrobial Peptides / A. M. Carmona-Ribeiro, L. D. Melo Carrasco // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2014. – Vol.15 – P. 23-26.
52. CDC, 2016e. Eight Multistate Outbreaks of Human Salmonella Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks (Final Update). <https://www.cdc.gov/Salmonella/live-poultry-05-16/index.html>.
53. CDC, 2017. Multistate Outbreaks of Human Salmonella Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks, 2017 (final update). <https://www.cdc.gov/Salmonella/live-poultry-06-17/index.html>.
54. CDC, 2018g. Multistate Outbreak of Salmonella Typhimurium Linked to Chicken Salad (Final Update). <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-02-18/index.html>. (Accessed 23 March 2021).
55. CDC, 2020b. Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR). <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>. (Accessed 9 August 2020)

56. CDC, 2021b. Salmonella Outbreak Linked to Raw Frozen Breaded Stuffed Chicken Products. <https://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-06-21/index.html>. (Accessed 2 November 2021).
57. Chelsea L. Salmonella in Dairy Cattle. 2017 // URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7135009>
58. Chen, F. The development of dentotropic micelles with biodegradable tooth-binding moieties / F. Chen, Z Jia, K.C. Rice [et all.] // *Pharm Res.* – 2013. – Vol. 30(11). – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-013-1105-5>
59. Chen, J. Melittin, the major pain-producing substance of bee venom / J. Chen, S.M. Guan, W. Sun, H. Fu // *Neurosci. Bull.* – 2016. – Vol. 32. – P. 265–272.
60. Cheng, A.C. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture/ A.C. Cheng, H.L. Lin, Y.L. Shiu, Y.C. Tyan, C.H. Liu // *Fish Shellf. Immunol.* – 2017. – Vol. 67. – P.270–279.
61. Chernysh, S. Antiviral and antitumor peptides from insects / S. Chernysh, S. I. Kim, G. Bekker [et all.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 12628–12632.
62. Chernysh, S. Insect Antimicrobial Peptide Complexes Prevent Resistance Development in Bacteria / S. Chernysh, N. Gordya, T. Suborova // *PLOS ONE.* – 2015. – Vol. 10 (7). – P. 1– 15.
63. Clemente, L. Occurrence of extended-spectrum betalactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal / L. Clemente, V. Manageiro, E. Ferreira [et all.] // *International Journal of Food Microbiology.* – 2013. – Vol.167(2). – P.221– 228 Available from: Accessed: Feb. 15, 2015.
64. Cote, C.K. Combinations of early generation antibiotics and antimicrobial peptides are effective against a broad spectrum of bacterial biothreat

agents/ C.K. Cote, I. I. Blanco, M. Hunter, J. L. Shoe, C. P. Klimk, R. G. Panchal // *Microb. Pathog.* – 2020. – Vol. 142. – P.104050.

65. Davies, R. H. Persistence of *Salmonella enteritidis* in poultry units and poultry food / C. Wray, R. H. Davies // *Br. Poult. Sci.* – 1996. – Vol. 37. – P. 589–596

66. Davis, R.W. Antimicrobial peptide interactions with silica bead supported bilayers and *E. coli*: buforin II, magainin II, and arenicin / R.W. Davis // *J. Pept. Sci.* – 2009. – Vol. 15 (8). – P. 511 - 522.

67. De Jong, A. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008– 2011) / A. De Jong, A. Smet, C. Lidwig [et al.] // *Veterinary Microbiology.* – 2015. – Vol. 171(3– 4). – P.298– 306.

68. Diamond, G. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense / G. Diamond // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2377 - 2392.

69. Du, M. Antimicrobial Effect of *Zophobas morio* Hemolymph against Bovine Mastitis Pathogens / M. Du, X. Liu, J. Xu [et all.] // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8(10). // URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/10/1488>

70. Dunning, D.C. Courtship in two species of periodical cicadas, *Magicicada septendecim* and *Magicicada cassini* / D.C. Dunning, J.A. Byers, C.D. Zange // *Animal Behaviour.* – 1979 – Vol. 27 (4). – P. 1073– 1090.

71. Dutta, P. Beneficial role of insect– derived bioactive components against inflammation and its associated complications (colitis and arthritis) and cancer / P. Dutta, R. K. Sahu, T. Dey, [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2019. – 313:108824.

72. El–Bassiony, G. M. In vitro antimicrobial activity of maggot excretions/secretions of *Sarcophaga (Liopygia) argyrostoma* (Robineau– Desvoidy) / G. M. El–Bassiony, J. G. Stoffolano // *Afr. J. Microbiol. Res.* – 2016. – Vol. 10 (27). – P. 1036–1043.

73. Eng, S.K. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science* / S.K. Eng, P. Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib [et al.] // *Freitas Neto OC de.* – 2015. – Vol. 8. – P. 284– 293.
74. European Food Safety Authority (EFSA). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus* // *EFSA Journal.* – 2007. – T. 5. – №. 2. – C. 97.
75. Evangelopoulou, G. Animal salmonellosis: A brief review of "Host Adaptation and Host Specificity" of *Salmonella* spp./ G. Evangelopoulou, S. Kritas, A. Govaris, A.R. Burriel // *Veterinary World.* – 2013. – Vol. 6(10). – P.703–708.
76. Fagerberg, D. J. Effect of Low-Level Feeding Chlortetracycline on Subsequent Therapy of Chicks Infected with *Salmonella typhimurium* / C.L. Quarles, D.J. Fagerberg, G.A. Greathouse. // *Poultry Science.* – 1977. – Vol. 56(5). – P. 1674–1675.
77. Faye, I. Insect immunity. 11. Simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia Cynthia* / I. Faye, A. Pye, T. Rasmuson [et al.] // *Infect Immun.* – 1975. – Vol.12. – P. 1426–1438.
78. Filho, R.A.C.P. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* isolated from ill poultry in Brazil / R.A.C. Filho, J.C. Ferreira, A.I. Kanashiro, A. L.C. // *Letters in Peptide Ciencia Rural.* – 2016. – Vol. 46(3). – P. 513– 518.
79. Filho, R.A.C.P. Efficacy of several vaccination programmes in commercial layer and broiler breeder hens against experimental challenge with *Salmonella enterica* serovar enteritidis // R.A.C.P. Filho, J. B. de Paiva, Y. M. S. Arguello [et al.] // *Avian Pathol.* – 2009. – Vol. 38. – P. 367–375.
80. Fjell, C.D. Designing antimicrobial peptides: Form follows function / C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E. Hancock, G. Nat. Schneider // *Rev. Drug Discov.* – 2012. – Vol. 11. – P. 37–51.

81. Fontana, R. A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*) / R. Fontana; M.A. Mendes, B.M. de Souza [et al.] // *Peptides*. – 2004. – Vol. 5. – P. 919 – 928.
82. Freitas Neto, O. de. Berchieri Junior A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review / O. de Freitas Neto, P. R.A.C. Filho, P. Barrow, Braz. // *J. Poult. Sci.* – 2010. – Vol. 12(1). – P.11.
83. Ganz, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity / T. Ganz // *Integr Comp Biol.* – 2003. – Vol. 43(2). – P. 300– 304.
84. Gao, Y.M. Mode of action of the antimicrobial peptide Mel4 is independent of *Staphylococcus aureus* cell membrane permeability / Y. M. Gao, D. Dutta, M.D.P. Willcox // *PLoS ONE*. – 2019. – Vol. 14(7). – e0215703.
85. Gast, R.K. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry/ R.K. Gast//*Avian Dis.* – 2007. – Vol. 51(4). – P.817–828.
86. Giannella, R.A. (1996) Chapter 21 *Salmonella*. In: Baron, S., Ed., *Medical Microbiology*, 4th Edition, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, 1-7.
87. Giuseppantonio, M. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: effect of copper and acidic pH / Giuseppantonio M., Raffaele P., Franca L. B. [et all.] // *Peptides*. – 2010. – Vol. 31 (11).
88. Grammato, E. Animal salmonellosis: A brief review of “host adaptation and host specificity” of *Salmonella* spp. / E. Grammato, K. K. Spyridon, G. Alexander, R. B. Angeliki // *Veterinary World*. – 2013. – Vol. 6(10). P. 703– 708.
89. Guangshun, W. Antimicrobial peptides in 2014 / W. Guangshun, M. Biswajit, L. Kyle [et al.] // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2015. – Vol. 8 (1).
90. Guidance document on acute oral toxicity testing. 2001 // URL: [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2001\)7/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2001)7/en/pdf) (дата обращения: 19.06.2025).

91. Haine, E.R. Antimicrobial defense and persistent infection in insects / E.R. Haine, Y. Moret, M.T. Siva–Jothy, J. Rolff // *Science*. – 2008. – Vol. 322. – P. 1257–1259.
92. Hancock, R.W.E. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides / R.W.E. Hancock, A. Rozek // *FEMS Microbiol Lett*. – 2002. – Vol. 206 (2). – P. 143–149.
93. Hazenson, L.A. Epidemiological data on salmonellosis, caused by *Salmonella Enteritidis*, in some areas of the Russian Federation / L.A. Hazenson, J.V. Poplavskaja, E.I. Karyagina [et al.] // *Zh. Microbiology*. – 1996. – Vol. 4. – P. 53–57.
94. Hillyer, J.F. Insect immunology and hematopoiesis / J.F. Hillyer // *Dev. Comp. Immunol*. – 2016. – Vol. 58. – P. 102–118.
95. Holschbach, C. L. *Salmonella* in Dairy Cattle // C.L. Holschbach, F.P. Simon // *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. – 2017. – Vol. 34(1). – P. 133–154.
96. Hong, P. Size–Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates / P. Hong, E. Bouvier, S. Koza // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2012. – Vol. 35 (20). – P. 2923–2950.
97. Hossain, M.A. Occurrences, treatment and antibiotic-resistant pattern of colibacillosis and salmonellosis in broiler / M.A. Hossain, M. I.L. Khan, Md. Ruhul Amin, Mollah // *Journal of Science Technology and Environment Informatics*. – 2015. – Vol. 04(2). – P. 67–73.
98. Huberman, L. Antibacterial properties of whole-body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots / L. Huberman, N. Gollop, K. Y. Mumcuoglu [et al.] *Wound Care*. – 2007. – Vol. 16(3). – P. 123–127.
99. Hultmark, D. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* / D. Hultmark, H. Steiner, T. Rasmuson, H.G. Boman // *Eur J Biochem*. – 1980. – Vol. 106. – P. 7–16.

100. Humphrey, T. Pathogens on meat and infection in animals – Establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples/ T. Humphrey, F. Jorgensen//Meat Science. – 2006. – Vol. 74. – P.89–97.
101. Hur, J. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review / J. Hur, C. Jawale, J.H. Lee // Food Res. Int. – 2012. – Vol. 45. – P. 819–830.
102. Imler, J.L. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation / J.L. Imler, P. Bulet // Chem Immunol Allergy. – 2005. – Vol. 86. – P. 1–21.
103. Insect Immunity I. Characteristics of an Inducible Cell-Free Antibacterial Reaction in Hemolymph of *Samia cynthia* Pupae / H.G. Boman, I. Nilsson– Faye, K. Paul, T. Jr. Rasmuson // Infect Immun. – 1974. – Vol. 10. – P. 136–145.
104. Ishikawa, M. Purification and characterization of a dipterin homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) / M. Ishikawa, T. Kubo, S. Natori // Biochem. J. – 1992. – Vol. 287. – P. 573–578.
105. Jacopin, E. Factors favouring the evolution of multidrug resistance in bacteria / E. Jacopin, S. Lehtinen, F. Débarre, F. Blanquart // J. R. Soc. Interface. – 2020 17: 20200105.
106. Jaklic, D. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria / D. Jaklic, A. Lapanje, K. Zupancic [et all.] // J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 57 (5). – P. 617– 625.
107. Jamasbi, E. Effect of dimerized melittin on gastric cancer cells and antibacterial activity / E. Jamasbi, S.S. Lucky, W. Li [et al.] // Amino Acids. – 2018. – Vol. 50(8). – P. 1101– 1110.
108. Jenkins, N. J. Changes in circulating insulin– like growth factor– I, insulin– like growth factor binding proteins, and leptin in weaned pigs infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / N. J. Jenkins, J.L. Turner, S. S. Dritz [et all.] // Domest Anim Endocrinol. – 2004. – Vol. 26(1). – P. 49– 60.

109. Jia, F. The in vitro, in vivo antifungal activity and the action mode of Jelleine– I against *Candida* species / F. Jia, J. Wang, J. Peng [et al.] // *Amino Acids*. – 2018. – Vol. 50(2). – P. 229– 239.
110. Jia, S. Challenges in Vaccinating Layer Hens against *Salmonella* Typhimurium / S. Jia, A.R. McWhorter, D. M. Andrews [et all.] // *Vaccines* (Basel). – 2020. – Vol. 8(4). – P. 1– 12.
111. Józefiak, D. Insects – a natural nutrient source for poultry– a review / D. Józefiak, A. Jozefiak, B. Kierończyk, M. Rawski // *Annals of Animal Science*. – 2016. – Vol. 2(2). – P. 297–313.
112. Kado, C. L. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids / C. L. Kado, S.T. Liu // *J Bacteriol*. – 1981. – Vol. 145(3). – P. 1365– 1373.
113. Keppi, E. Mode of action of dipteracin A, a bactericidal peptide induced in the hemolymph of *Phormia terranovae* larvae. / A.P. Pugsley, J. Lambert, C. Wicker, J.L. Dimarcq, J.A. Hoffmann, D. Hoffmann // *Insect Biochem. Physiol.* – 1989. – Vol. 10. – P. 229–239.
114. Khanum, R. J. Antimicrobial peptides as potential anti– biofilm agents against multidrug–resistant bacteria / R. J. Khanum, P.Y. Chung // *Microbiol. Immunol. Infect.* – 2017. – Vol. 50. – P. 405 – 410.
115. Kroeckel, S. When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre– pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute – Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*) / S. Kroeckel, A.G.E. Harjes, I. Roth, H. Katz // *Aquaculture*. – 2012. – Vol. 364(365). – P. 364– 365.
116. Kruse, T. Using antimicrobial host defense peptides as anti– infective and immunomodulatory agents / T. Kruse, H.H. Kristensen // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2008. – Vol. 6(6). – P. 887 – 895.
117. Lahuerta, A. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics – the EFSA– ECDC summary report 2009 / A. Lahuerta, T. Westrell, J. Takkinen [et all.] // *Euro Surveill.* – 2011. – Vol.16(13). – P. 1 – 4.

118. Lalander, C.H. High waste-to-biomass conversion and efficient *Salmonella spp.* reduction using black soldier fly for waste recycling/ C.H. Lalander, J. Fidjeland, S. Diener, S. Eriksson, B. Vinneras //Agronomy for Sustainable Development. – 2014. – Vol. 35(1). – P.1–11.

119. Lee, J.H. Uncovering Antimicrobial Peptide from *Zophobas atratus* Using Transcriptome Analysis / J.H. Lee, H. Chung, Y.P. Shin [et al.] // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. – 2021. – Vol. 27. – P. 1827–1835.

120. Lee, K.S. Antimicrobial Activity of an Extract of *Hermetia illucens* Larvae Immunized with *Lactobacillus casei* against *Salmonella* Species / K.S. Lee, E.Y. Yun, T.W. Goo // Insects. – 2020 – Vol. 11(10). // URL: <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/10/704>

121. Lei, J. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications / J. Lei, L. Sun, S. Huang [et all.] // Am J Transl Res. – 2019. – Vol.11(7). – P. 3919– 3931.

122. Leon, R. Exploring small cationic peptides of different origin as potential antimicrobial agents in aquaculture/ R. Leon, M. Ruiz, Y. Valero, C. Cardenas, F. Guzman, M. Vilan //Fish Shellf. Immunol. – 2020. – Vol. 98. – P.720–727.

123. Li, H. *Salmonella* Species in Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Edited by M. P. Doyle and R. L. Buchanan. / Li., H. Wang, J. D’Aoust, J. Maurer // ASM Press, 2013, Washington, DC, P. 225–261.

124. Liebana, E. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended– spectrum β –lactamases or AmpC β – lactamases in food and food–producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options / E. Liebana, A. Carattoli, T.M. Coque [et all.] // Clin Infect Dis. – 2013. – Vol. 56(7).

125. Lloyd–Williams P. et al. (1997) Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Boca Raton: CRC Press. 278.

126. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N J ROSEBROUGH, A L FARR, R J RANDALL // *J Biol Chem.* – 1951. – Vol. 193(1). – pp. 265– 275.
127. Lu, H– L. Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi / H– L. Lu, R. J. St Leger // *Adv Genet.* – 2016. – Vol. 94. – P. 251– 285.
128. Mahlapuu, M. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents / M. Mahlapuu, J. Hakansson, L. Ringstad, C. Bjorn // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2016. – Vol. 6. // URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2016.00194/full>
129. Makwana, P. Diversity of Antimicrobial Peptides in Silkworm / P. MMakwana, K. Rahul, K. Ito, B. Subhadra // *Life (Basel).* – 2023. – Vol. 13(5). // URL: <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/5/1161>
130. Manniello, M.D. Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance / M.D. Manniello, A. Moretta, R. Salvia [et all.] // *Cell Mol Life Sci.* – 2021. – Vol. 78(9). – P. 4259– 4282.
131. Martelli, M. Ffluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival after chemoimmunotherapy for primary mediastinal large B– cell lymphoma: results of the International Extranodal Lymphoma Study Group IELSG– 26 Study / M. Martelli, L. Ceriani, V. Zucca [et all.] // *J Clin Oncol.* – 2014. – Vol.32(17). – P. 1769 – 1777.
132. Martens, E. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States / E. Martens // *J Antibiot (Tokyo).* – 2017. – Vol. 70(5). – P. 520– 526.
133. Martin, S.F. Adaptation in the innate immune system and heterologous innate immunity. / S.F. Martin // *Cell Mol Life Sci.* – 2014. – №71(21). – P. 4115– 4130.
134. Masiero, F.S. First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* / F.S. Masiero, M.F.K.

Aquino, M.P. Nassu [et all.] // *Neotrop Entomol.* – 2016. – Vol.15, №1. – P. 125–129. URL: <https://www.researchgate.net/>

135. Mazengia, E. Prevalence, concentrations, and antibiotic sensitivities of *Salmonella* serovars in poultry from retail establishments in Seattle, Washington / E. Mazengia, M. Samadpour, H.W. Hill [et al.] // *J Food Prot.* – 2014. – Vol.77(6). – P. 885– 893.

136. McEwen, S.A., Fedorka–Cray, P.J., 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34, 93–106

137. Mead, P.S. Food–related illness and death in the United States / P.S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 1999. – Vol. 5(5). – P. 607– 625.

138. Miyoshi, N. Activity of tick antimicrobial peptide from *Ixodes persulcatus* (persulcatusin) against cell membranes of drug– resistant *Staphylococcus aureus* / N. Miyoshi, E. Isogai, K. Hiramatsu, T. Sasaki // *J Antibiot (Tokyo).* – 2017. – Vol. 70(2). – P. 142– 146.

139. Molino, M.G. Spread of Antimicrobial Resistance by *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis between Close Domestic and Wild Environments / M.G. Molino, A. Garcia, S.G. Zurita [et al.] // *Antibiotics.* – 2020. – Vol. 9. – P. 750.

140. Mookherjee, N. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential / N. Mookherjee, M.A. Anderson, H.P. Haagsman, D.J. Davidson // *Nat Rev Drug Discov.* – 2020. – Vol. 19(5). – URL: <https://www.nature.com/nrd/> (дата обращения: 03.02.2015).

141. Moretta, A. A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) / A. Moretta, K. Salvia, C. Scieuzo [et all.] // *Sci Rep.* – 2020. – Vol.10(1). – C. 567 – 574.

142. Mylonakis, E. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides / E. Mylonakis, L. Podsiadlowski, M. Muhammed, A. Vilcinskas // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2016. – URL: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/>

143. Neto, J.D.F. Sources of Human Non-Typhoid Salmonellosis: A Review / J.D.F. Neto, R.A.C.P. Filho, P. Barrow, A.P. Junior // *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. – 2010. – Vol. 12(1). – P. 1–11.

144. Nguyen, L.T. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action / L.T. Nguyen, E.F. Haney, H.J. Vogel // *Trends Biotechnol.* – 2011 – Vol. 29(9). – P. 464– 72.

145. Niyonsaba, F. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway / F. Niyonsaba, K. Iwabuchi, H. Matsuda [et al.] // *Int Immunol.* – 2002. – Vol.14 (4). – P. 421. – 426.

146. OECD 401 «Acute Oral Toxicity», — 1987. URL: <http://creativeconomy.ru/library/prd93.php> (https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/acutetox_docs/udpproc/udpfin01/append/appi.pdf).

147. OECD 423. «Acute Toxic Class Method», — 2001. URL: https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2002/02/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_g1gh294f/9789264071001-en.pdf

148. OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].

149. Ojha, S. Approaches for reducing Salmonella in pork production / S. Ojha, M. Kostrzynska // *J Food Prot.* – 2007. – Vol. 70(11). – P. 2676– 2694.

150. Ongey, E.L. Bioinspired Designs, Molecular Premise and Tools for Evaluating the Ecological Importance of Antimicrobial Peptides / E.L. Ongey, S. Pflugmacher, P. Neubauer // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2018. – Vol. 11(3). // URL: <https://www.mdpi.com/1424-8247/11/3/68>

151. Pan, J. Progress in the application of Salmonella vaccines in poultry: A mini review / J. Pan, R.R. Wei, P.P. Xu [et al.] // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2024. – Vol. 278. // URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242724001417>
152. Pandey, M.M. Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study / M.M. Pandey, S. Khatoon, S. Rastogi, A.K.S. Rawat // *J Integr Med.* – 2016. – Vol. 14(6). – P. 447–455.
153. Pang, J.C. Pulsed–field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan / J.C. Pang, T.H. Chiu, C.S. Chiou [et all.] // *J Appl Microbiol.* – 2005. – Vol. 99 (6). – P. 1472– 1483.
154. Parveen, S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry / S. Parveen, M. Taabodi, J.G. Schwarz [et all.] // *J Food Prot.* – 2007. – Vol. 70(11). – P. 2466– 2472.
155. Patent No.: FR 2695392 Antibacterial peptides from the hemolymph of the dragonfly *Aeschna cyanea* and their purification and use.
156. Patent No.: FR2695392A1 Peptides having in particular antibacterial properties, their process of obtaining, and their biological applications. 1992-09-04 1994-03-11 Centre Nat Rech Scient
157. Patent No.: US 6337093 Immunomodulatory and antimicrobial materials, their preparation and use.
158. Patent No.: US 6337093 Immunomodulatory and antimicrobial materials, their preparation and use
159. Patent No.: US 6476189 Antibacterial peptides and antibacterial agents containing such peptides as an effective ingredient.
160. Patent No.: US 6476189 Antibacterial peptides and antibacterial agents containing such peptides as an effective ingredient

161. Patocka, J. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides / J. Patocka, E. Nepovimova, B. Klimova [et al.] // *Curr Med Chem.* – 2019. – Vol. 26(32). – P. 5924– 5946.
162. Patrick, M.E. Salmonella Enteritidis Infections, United States, 1985–1999 / M.E. Patrick, P.M. Adcock, T. Gomez [et all.] // *Emerging Infectious Diseases.* – 2004. – Vol.10(1). – P. 1– 7.
163. Patten, P. A. The immunogenicity of biopharmaceuticals. Lessons learned and consequences for protein drug development / P. A. Patten, H. Schellekens // *Dev Biol (Basel).* – 2003. – Vol. 112. – P. 81– 97.
164. Payne, D.J. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery / D.J. Payne, N. Gwynn, D.J. Holmes, D.L. Pompliano // *Nat Rev Drug Discov.* – 2007. – Vol. 6(1). – P. 29– 40.
165. Peschel, A. The co–evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance / A. Peschel // *Nat Rev Microbiol.* – 2006. – Vol. 4(7). – P. 529– 536.
166. Pestsov, G. V. Development of methods of breeding work with insects of the species *hermetia illucens* / G. V. Pestsov, V. P. Olga, V. T. Anastasia, A.B. Sergey // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture.* – 2023. – Vol. 15(2). – P. 74– 91.
167. Philo, J.S. A critical review of methods for size characterization of non–particulate protein aggregates / J.S. Philo // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2009. – Vol. 10(4). – P. 359– 372.
168. Podolsky, S.H. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018) / S.H. Podolsky, // *Palgrave Communications.* – 2018. – Vol. 4(1). // URL: https://www.researchgate.net/publication/328463715_The_evolutionary_response_to_antibiotic_resistance_1945-2018
169. Powers, J.–P. S. The antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of *Escherichia coli* following treatment / J.–P. S. Powers, M.M. Martin, D.L. Goosney, R.E.W. Hancock // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50(4). – P. 1522–1524.

170. Punchihewage–Don, A.J. The outbreaks and prevalence of antimicrobial resistant *Salmonella* in poultry in the United States: An overview /A.J. Punchihewage–Don, J. Hawkins, A.M. Adnan [et al.] // *Heliyon*. – 2022. – Vol. 12(8). // URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022028596>
171. Rana, N. Cell–mediated and humoral immune responses to a virulent plasmid–cured mutant strain of *Salmonella enterica* serotype *gallinarum* in broiler chickens / N. Rana // *Vet Microbiol*. – 2006. – Vol. 115(1– 3). – P. 156– 62.
172. Reichhart, J.M. Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipteracin promoter / J.M. Reichhart, M. Meister, J.L. Dimarcq [et all.] // *EMBO J*. – 1992. – Vol.11(4). – P. 1469– 1477.
173. Reu, K. de. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis* / K. de Reu, K. Grijspeerdt, W. Messens, [et al.] // *Int. J. Food Microbiol*. – 2006. – Vol. 112(3). – P. 253–260.
174. Robertson, M. The humoral antibacterial response of *Drosophila* adults / M. Robertson, J.H. Postlethwait // *Dev Comp Immunol*. – 1986. – Vol. 10(2). – P. 167– 179.
175. Rosen, T. Antibiotic resistance: an editorial review with recommendations/ T. Rosen // *J. Drugs Dermatol*. – 2011. – Vol.10. – P. 724-733.
176. Rozkošný R. A Biosystematic Study of the European Stratiomyidae (Diptera): Clitellariinae, Hermediinae, Pachygasterinae and Bibliography (Vol. 2). London: Springer Science & Business Media, 1983. P. 431.
177. Scocchi, M. Non–Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria / M. Scocchi, M. Mardirossian, G. Runti, M. Benincasa // *Curr Top Med Chem*. – 2016. – Vol. 16(1). – P. 76– 88.
178. Senevirathne, A., *Salmonella enteritidis* bacterial ghosts confers complete protection against chicken salmonellosis / A. Senevirathne, C. Hewawaduge, J.H. Lee // *Poultry Science*. 2021. – Vol. 100. – P. 7, 101205.

179. Serrano, I. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation / I. Serrano, C. Verdial, L. Tavares, M. Oliveira // *Antibiotics*. – 2023. – Vol. 12. (3). – P. 1–25.

180. Shahrour, H. AMPs as Anti-biofilm Agents for Human Therapy and Prophylaxis/ H. Shahrour, R. Ferrer-Espada, I. Dandache, S. Barcena-Varela, S. Sanchez-Gomez, A. Chokr, G. Martinez-de-Tejada // *Adv Exp Med Biol*. – 2019. – Vol. 1117. – P.257–279.

181. Shelomi, M. The unique antimicrobial peptide repertoire of stick insects / M. Shelomi, C. Jacobs, A. Vilcinskas, H. Vogel // *Dev Comp Immunol*. – 2020. – Vol. 103. // URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0145305X19303477?via%3Dihub>

182. Shen, W. From Antimicrobial Peptides to Antimicrobial Poly (α -amino acid)s / W. Shen, P. He, C Xiao, X Chen // *Adv Healthc Mater*. – 2018. – Vol. 7(20). // URL: https://www.researchgate.net/publication/325873044_From_Antimicrobial_Peptides_to_Antimicrobial_Poly-alpha-amino_acids

183. Singh, B.R. Salmonella Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective / R. Singh. Bhoj // *The Open Vaccine Journal*. – 2009. – Vol. 2(1). – P. P. 100– 112.

184. Sirtori, L.R. Mode of action of antimicrobial peptide P45 on *Listeria monocytogenes* / L.R. Sirtori, A.D.S.D. Motta, A. Brandelli // *J Basic Microbiol*. – 2008 – Vol. 48(5). – C. 393– 400.

185. Socarras, K.M. Antimicrobial Activity of Bee Venom and Melittin against *Borrelia burgdorferi* / K.M. Socarras, P.A.S. Theophilus, J.P. Torres 3 [et all.] // *Antibiotics (Basel)*. – 2017. – Vol.6 (4). // URL: <https://www.mdpi.com/2079-6382/6/4/31>

186. Soliani, L. Salmonella Infection in Pigs: Disease, Prevalence, and a Link between Swine and Human Health / L. Soliani, G. Rugna, A. Prosperi [et all.] // *Pathogens*. – 2023. – Vol. 12(10). – P. 1 – 4.

187. Stamer A., Wesselss S., Neidigk R., Hoerstgen– Schwark G. Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae–meal as an example for a new feed ingredients' class in aquaculture diets // Rahmann G., Aksoy U. (Eds.). Proceedings of the 4th ISO FAR Scientific Conference. 'Building Organic Bridges', at the Organic World Congress 2014, 13–15 Oct. Istanbul, Turkey, 2014. – P. 1043–1046.

188. Steiner, H. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity / H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom [et all.] // Nature. – 1981. – Vol.292. – P. 246 – 248.

189. Striegel A., Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D. Modern size–exclusion liquid chromatography: Practice of gel permeation and gel filtration chromatography. 2nd ed. New York, Wiley, 2009. 512 p.

190. Subrahmanyam, G. Methods in Microbiology: учебное пособие / G. Subrahmanyam, V. Gurtler. – Academic Press, 2021. – 216 P. – IISBN: 9780128211458.

191. Sun, J. Pancreatic β –Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota / J. Sun, L. Furio, R. Mecheri [et al.] // Immunity. – 2015. – Vol. 43(2). – P. 304– 317.

192. Sun, Q. Swine intestine antimicrobial peptides inhibit infectious bronchitis virus infectivity in chick embryos/ Q. Sun, K. Wang, R. She, W. Ma, F. Peng, H. Jin //Poult Sc. – 2019. – Vol. 89(3). – P.464–469.

193. Suphoronski, S.A. Occurrence of *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* in free– living and captive wild birds from 2010– 2013 in Guarapuava, Paran, Brazil / S.A. Suphoronski, C.W. Nadia, M.C. Seki [et al.] // African Journal of Microbiology Research. – 2015. – Vol. 9(29). – P. 1778 – 1782.

194. Tarabees, R. Isolation and characterization of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* from chicken meat in Egypt / R. Tarabees, M.S.A. Elsayed, R. Shawish [et all.] // J Infect Dev Ctries. – 2017. – Vol. 11(4). – P. 314– 319.

195. Thapa, R.K. Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects / R.K. Thapa, D.B. Diep, H.H. Tønnesen // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 103. – P. 52– 67.
196. Thomas, S. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides / S. Thomas, S. Karnik, R.S. Barai [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – URL: <https://academic.oup.com/nar>
197. Thomas, S. The antimicrobial activity of maggot secretions: results of a preliminary study / S. Thomas, A. M. Andrews, N. P. Hay, S. Bourgoise // *J Tissue Viability.* – 1999. – Vol. 9(4). – P. 127– 132.
198. Tollefson, L. Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact / L. Tollefson, M.A. Miller // *J AOAC Int.* – 2000. – Vol. 83(2). – P. 245– 254.
199. Tommasi, R. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery / R. Tommasi, D.G. Brown, G.K. Walkup [et al.] // *Nat Rev Drug Discov.* – 2015. – Vol.14(8). – P. 529– 542.
200. Tonk, M. Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer / M. Tonk, A. Vilcinskas, M. Mahnamaeian // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2016 – Vol. 100(17). – P. 7397– 7405.
201. Tzou, P. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild– type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants / P. Tzou, J.M. Reichhart, B. Lemaitre // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99(4). – P. 2152–2157.
202. Ursic– Bedoya, R. Prolixicin: a novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi* / R. Ursic– Bedoya, J. Buchhop, J.B. Joy [et all.] // *Insect Mol Biol.* – 2011. – Vol.20(6). – P. 775– 786.
203. Vilcinskas, A. Anti–infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella* / A. Vilcinskas // *Curr Pharm Des.* – 2011. – 17(13). – P. 1240– 1245.

204. Vilcinskas, A. Evolutionary plasticity of insect immunity. / A. Vilcinskas // *J Insect Physiol.* – 2013. – Vol. 59(2). – P. 123– 129.
205. Vonkavaara, M. *Francisella* is sensitive to insect antimicrobial peptides / M. Vonkavaara, S.T.I. Pavel, K. Hölzl [et all.] // *J Innate Immun.* – 2013. – Vol.5(1). – P. 50– 59.
206. Wang, X.M. Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs / X.M. Wang, H.X. Jiang, X.P. Liao [et all.] // *EMS Microbiol Lett.* – 2010. – Vol.1. – P. 15– 21.
207. WHO: [сайт]. – 2020. – URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) (дата обращения: 02.03.2024). – Текст: электронный.
208. Wibisono, F.M. Wibisono, F.M. A Review of Salmonellosis on Poultry Farms: Public Health Importance / F.M. Wibisono, F.J, Wibisono, H. Plumeriastuti, M.H. Effendi // *Systematic Reviews in Pharmacy.* – 2020. – Vol. 11(9). – P. 481– 486.
209. Wize mann H. Purification of *E. coli*- expressed HIS- tagged hepatitis B core antigen by Ni²⁺- chelate affinity chromatography/ H. Wize mann // *Journal of Virological Methods.* – 1999. – Vol. 77(2). – P. 189– 197.
210. Wong, D.M.A L.F. Epidemiology and control measures for Salmonella in pigs and pork / D.M.A L.F. Wong, T. Hald, M. Swanenburg, P. J. V. d. Wolf // *Livestock Production Science.* – 2002. – 76(3). – P. 215– 222.
211. Wright, G.D. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? / G.D. Wright // *BMC Biol.* – 2010. – Vol. Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8(1). – URL: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/123>.
212. Wu, X. Characterization of antimicrobial activity against *Listeria* and cytotoxicity of native melittin and its mutant variants / X. Wu, A.K. Singh, X. Wu [et all.] // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2016. – Vol.1(143). – P. 194– 205.

213. Xu, B.C. Overall assessment of antimicrobial peptides in piglets: a set of meta– analyses / B.C. Xu, J. Fu, L.Y. Zhu [et al.] // *Animal*. – 2020. – Vol. 14. – No. 12. – P. 2463– 2471.

214. Yan, H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China / H. Yan, L. Li, M. J. Alam [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2010. – Vol.143. – P. 230 – 234.

215. Yang, X. Fabricating antimicrobial peptide–immobilized starch sponges for hemorrhage control and antibacterial treatment / X. Yang, W. Liu, G. Xi [et al.] // *Carbohydr Polym*. – 2019. – Vol. 222. – URL: <https://www.sciencedirect.com/journal/carbohydrate– polymers>

216. Zhang, C. Molecular cloning, expression and antibacterial activity of goose– type lysozyme gene in *Micropterus salmoides* / C. Zhang, J. Zhang, M. Liu, M. Huang // *Fish Shellfish Immunol*. – 2018. – Vol. 82. – P. 9–16.

217. Zhao, X. Lamp: A database linking antimicrobial peptides. / X. Zhao, H. Wu, H. Lu, G. Li, Q. Huang // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(6). e66557.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Акт о внедрении ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

УТВЕРЖДАЮ

И.о. первого проректора -
проректора по научной работе ицифровой трансформации
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Богданов И.И.

2025 г.



АКТ

О внедрении результатов научно-исследовательской работы по теме диссертации в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы по теме диссертации Тычинина Николая Дмитриевича, выполненной на базе кафедры «Микробиология и биотехнология» ФГБОУ ВО Вавиловский университет, внедрены в учебный процесс и используются при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по курсам «Ветеринарная микробиология и микология» и «Эпизоотология и инфекционные болезни», специальность 36.05.01 «Ветеринария». Протокол заседания кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарная экспертизы № 2 от 18.09.2025 г.

Декан ФВМиБ
/Марьин Е.М.
«19» сентября 2025 г.Заведующий кафедрой
Богданов И.И.
«19» сентября 2025 г.

Акт о внедрении ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Новосибирский
государственный аграрный университет»
(ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ)

e-mail: rector@edubiotech.ru

Россия, 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160
Тел.: (383) 267-38-11 факс: (383) 264-26-00



MINISTRY OF SCIENCE AND HIGHER
EDUCATION OF THE RUSSIAN FEDERATION

Federal State State-Funded Educational
Institution of Higher Education "Novosibirsk
State Agricultural University"
FSSFEI HE Novosibirsk SAU

<http://www.edubiotech.ru>

Dobrolubov Str. 160, 630039 Novosibirsk, Russia
Phone: +7 383 267-38-11 Fax: +7 383 264-26-00



Ректор
ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ

2025 г.

Рудой Е.В.

АКТ

О внедрении результатов научно-исследовательской работы по теме диссертации в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы по теме диссертации Тычинина Николая Дмитриевича выполненной на базе кафедры "Микробиология и биотехнология" ФГБОУ ВО Вавиловский университет внедрены в учебный процесс и используются при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по курсам «Ветеринарная микробиология и микология» и «Эпизоотология и инфекционные болезни». Специальность 36.05.01 «Ветеринария». Протокол заседания кафедры «Инфекционные и инвазионные болезни» №5 от 25.09.2025 г.

Директор ИВМиБ
[Signature] /Новик Я.В./
«4» сентября 2025г.

Заведующий кафедрой
[Signature] /Димова А.С./
«26» сентября 2025г.

Таблица 1 – Динамика температуры тела цыплят 1 опытной группы (n=15)

№ животного	Температура тела (°C) в ходе эксперимента (сутки)					Норма
	0-1	2	3	4	5	
1	40,9	40,9	41,7	41	41,3	40-42
2	41,6	40,7	41,4	41,1	40,7	40-42
3	41,2	40,9	42	42	40,5	40-42
4	40,9	40,8	41,2	41,8	40,9	40-42
5	41	41	41,3	41,9	41,8	40-42
6	41,4	41,5	40,8	41,1	41,1	40-42
7	41,5	41,2	41,1	41,7	41,6	40-42
8	41,4	41,6	41,1	42	41,7	40-42
9	41,1	41,5	41,8	41,3	41,5	40-42
10	41	41,2	40,8			40-42
11	41,6	41,6	41,1	40,5	41,8	40-42
12	41,8	41,3	40,5	41,2	41,2	40-42
13	41,4	41,3	40,7	42	40,8	40-42
14	41,6	41,1	40,8	41,6	40,7	40-42
15	41,5	40,8	40,9	41,7	41,5	40-42
M±m	41,3±0,1	41,2±0,2	41,1±0,2	41,5±0,2	41,2±0,2	

Таблица 2 – Динамика температуры тела цыплят 2 опытной группы (n=15)

№ животного	Температура тела (°C) в ходе эксперимента (сутки)					Норма
	0-1	2	3	4	5	
1	41,6	42,8	41,5	41,2	40,9	40-42
2	42,7	41,8	41,8	41,7	41,5	40-42
3	43	41,9				40-42
4	43	42,9	41,7	41,9	41,6	40-42
5	42,1	42,4				40-42
6	43	43	41,3	41,3	42	40-42
7	42	42,9	40,9	40,8	41,4	40-42
8	42,8	42,9	41,1	42	40,9	40-42
9	42,2	41,6				40-42
10	42,1	42,1	40,6	40,5	40,8	40-42
11	42,5	41,7	41,2	41,5	41,1	40-42
12	42,7	42,3				40-42
13	41,7	41,7	41,4	41,3	40,5	40-42
14	41,8	43				40-42
15	42,1					40-42
M±m	42,4±0,2	42,4±0,3	41,3±0,2	41,4±0,2	41,2±0,2	

Таблица 3 – Динамика температуры тела цыплят 3 опытной группы (n=15)

№ животного	Температура тела (°С) в ходе эксперимента (сутки)					Норма
	0-1	2	3	4	5	
1	42,5					40-42
2	43	41,7	40,5	42	41,2	40-42
3	42,9	41,7	41,9	41,6	40,7	40-42
4	41,5	41,9				40-42
5	41,6	42,3				40-42
6	42,7	41,9	41,5	41,5	41,1	40-42
7	41,9	41,6	40,8	41	41,7	40-42
8	41,8	42,4	41,2	40,5	40,6	40-42
9	42,5	41,9	41,8	41,4	41,8	40-42
10	42,9	42,8	41,3	41,4	41,5	40-42
11	42,3					40-42
12	43	42,8	41,5	41,5	41	40-42
13	42,5	42,2	41,3	41	41,2	40-42
14	41,9	42,3	41,8	40,6	41,2	40-42
15	42,7	41,6	41,2	41,6	40,8	40-42
M±m	42,4±0,3	42,1±0,2	41,3±0,2	41,3±0,2	41,2±0,2	

Таблица 4 – Динамика температуры тела цыплят 4 опытной группы (n=15)

№ животного	Температура тела (°C) в ходе эксперимента (сутки)					
	0-1	2	3	4	5	Норма
1	42,1	41,7	40,5	40,9	40,8	40-42
2	43	42,4	40,8	40,6	40,6	40-42
3	42,6					40-42
4	42,5	41,6	41,4	41,2	40,9	40-42
5	43	43	41,5	41,1	40,7	40-42
6	41,7	41,9	40,7	40,7	41,4	40-42
7	41,7	41,8	41,1	40,6	41,1	40-42
8	42,4	42,6	41,6	40,8	40,5	40-42
9	42,7	42,4	41	41,5	41,3	40-42
10	42,5	42,6	40,7	41,8	41,8	40-42
11	41,7	41,8	40,6	40,8	40,5	40-42
12	41,8	42,6	40,5	41,8	41,7	40-42
13	42,2	41,5	41,7	40,9	41,1	40-42
14	42,4	42,1	41,1	41,3	40,8	40-42
15	42,9	43	41,8	40,6	41,8	40-42
M±m	42,3±0,2	42,2±0,3	41,1±0,2	41±0,2	41,1±0,2	

Таблица 5 – Динамика температуры тела цыплят 5 опытной группы (n=15)

№ животного	Температура тела (°C) в ходе эксперимента (сутки)					
	0-1	2	3	4	5	Норма
1	42,9	42,5	41	40,5	41,5	40-42
2	42,6	42,7	41,3	41,5	40,9	40-42
3	42,3	42,6	41,4	41,2	41,7	40-42
4	42	41,6	41,5	40,9	40,8	40-42
5	42,9	42,8	41,8	41,5	41,8	40-42
6	42,2	41,6	41,9	41,4	41	40-42
7	42,4	41,7	41,4	41,1	41,3	40-42
8	42,3	42,9	40,6	41,1	41,4	40-42
9	41,9	42,9	40,5	41,6	40,7	40-42
10	42,2	42,5	41,2	40,7	41,5	40-42
11	41,8	42,8				40-42
12	42,4	41,8				40-42
13	41,8	41,9	41,6	41,1	42	40-42
14	42,9	41,9				40-42
15	42,9	42,7	41,1	41,6	40,7	40-42
M±m	42,4±0,2	42,3±0,3	41,3±0,2	41,2±0,2	41,3±0,2	

Таблица 6 – Динамика температуры тела цыплят 6 (контрольной) группы (n=15)

№ животного	Температура тела (°C) в ходе эксперимента (сутки)					
	0-1	2	3	4	5	Норма
1	42,4	40,9	41,5	40,7	40,9	40-42
2	43	41,6				40-42
3	42,3					40-42
4	42,4					40-42
5	42,5					40-42
6	42,9	42,7				40-42
7	41,5	41,6				40-42
8	43	42,7				40-42
9	41,8					40-42
10	41,9					40-42
11	42,8	42,3				40-42
12	43					40-42
13	41,9	42,8				40-42
14	42,1					40-42
15	43					40-42
M±m	42,4±0,3	42,1±0,5	41,5	40,7	40,9	

Таблица 7 – Динамика температуры тела цыплят 7 (интактной) группы (n=15)

№ животного	Температура тела (°C) в ходе эксперимента (сутки)					
	0-1	2	3	4	5	Норма
1	41,6	40,8	41,3	41,1	41,1	40-42
2	41,4	41,3	41,1	41,1	41,4	40-42
3	41,7	41,4	42,3	41,5	42,9	40-42
4	41,8	41,7	41,2	41,5	41,1	40-42
5	41,3	41,8	41,1	41,6	41,1	40-42
6	41,4	41	42	41,1	41,1	40-42
7	40,9	41,2	41,2	41,4	41,2	40-42
8	40,9	41	42,6	42,8	41,2	40-42
9	41,2	41,4	41	41,8	39,6	40-42
10	41,6	41,8	41,2	41	41,2	40-42
11	41,5	41,2	41,8	41,1	41,6	40-42
12	40,9	41,3	41,1	41	41,1	40-42
13	41,2	41,3	41,2	42,1	41,2	40-42
14	41	40,9	41,3	41	41,2	40-42
15	41,2	41,6	41,1	41	41,1	40-42
M±m	41,3±0,2	41,3±0,2	41,1±0,2	41,50±0,2	41,2±0,2	

Таблица 8 – Динамика температуры тела цыплят - бройлеров

№ группы	Температура тела (°C) в ходе эксперимента (сутки)					Норма
	0-1	2	3	4	5	
1 опытная	41,3±0,1	41,2±0,2	41,1±0,2	41,5±0,2	41,2±0,2 ^(**)	40-42
2 опытная	42,4±0,2*	42,4±0,3*	41,3±0,2 ^(**)	41,4±0,2 ^(**)	41,2±0,2 ^(**)	
3 опытная	42,4±0,3*	42,1±0,2*	41,3±0,2 ^(**)	41,3±0,2 ^(**)	41,2±0,2 ^(**)	
4 опытная	42,3±0,2*	42,2±0,3*	41,1±0,2 ^(**)	41±0,2 ^(**)	41,1±0,2 ^(**)	
5 опытная	42,4±0,2*	42,3±0,3*	41,3±0,2 ^(**)	41,2±0,2 ^(**)	41,3±0,2 ^(**)	
6 контрольная	42,4±0,3*	42,1±0,5*	41,5	40,7	40,9	
7 контрольная	41,3±0,2	41,3±0,2	41,1±0,2	41,50±0,2	41,2±0,2	

Примечание: * различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при $t = 2,10$); ^(**) - различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой до введения препарата, относительно опытной группы через 14 суток после введения препарата ($P \leq 0,05$ при $t = 2,10$)

Таблица 9 – Динамика изменений гематологических показателей крови цыплят-бройлеров (n=15, P<0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ группы							Норма
			1	2	3	4	5	6	7	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
До введения препарата										
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	28,5±2,2	42,2±3,9*	40,9±4,2*	40,8±3,3*	39,5±3,6*	40,3±4*	30,2±2,1	20-30
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	2,6±0,2	1,9±0,1*	2±0,2*	2±0,1*	2±0,2*	1,9±0,2*	2,4±0,2	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	83±7,2	68,3±6,1*	76,6±6,2	78,8±8,6	77,6±6,5	77,7±7,3	86,3±6,6	80-100
4.	СОЭ	мм/час	5,5±0,9	11,4±1,2*	11,4±1,2*	11,3±1,1*	12±1,1*	12,5±0,9*	5,4±0,8	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	26,8±2,5	34,2±2,4*	33,5±1,6*	35,9±1,9*	33,5±1,7*	34,9±2,2*	26,3±2,6	18-30
6.	Эозинофилы	%	5,3±0,8	5,2±0,7	5±0,7	4,3±0,6	4,9±0,5	5,2±0,7	5,1±0,8	1-8
7.	Моноциты	%	3,9±0,4	3,5±0,4	4,3±0,4	4,3±0,5	3,9±0,4	4,1±0,4	3,6±0,5	1-6
8.	Базофилы	%	0,4±0,26	0,47±0,26	0,4±0,26	0,6±0,26	0,53±0,26	0,6±0,26	0,5±0,3	0-1
9.	Лимфоциты	%	63,6±2,9	56,6±2,5*	56,8±1,7*	54,9±2,3*	57,2±2,1	55,1±2,1*	64,5±3	52-67
Через 14 суток после введения препарата										
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	29,4±2,5	26,6±2,9(**)	26,4±3,1(**)	27,1±2,6(**)	27,4±2,4(**)	26,5	29,2±2,9	20-30

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2.	Эритроциты	$10^{12}/л$	$2,5 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,3^{(*)}$	$2,5 \pm 0,2^{(**)}$	$2,3 \pm 0,2^{(**)}$	$2,7 \pm 0,2^{(**)}$	1,9	$2,5 \pm 0,3$	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	$88,2 \pm 3$	$83,8 \pm 4$	$89 \pm 2,2$	$85,4 \pm 4,3$	$85 \pm 3,2$	93,2	$86,1 \pm 6,9$	80-100
4.	СОЭ	мм/час	$4,9 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,5^{(*)}$	$4,8 \pm 0,4^{(**)}$	$4,8 \pm 0,4^{(**)}$	$4,7 \pm 0,3^{(**)}$	4	$5,3 \pm 0,8$	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	$26,1 \pm 1,2$	$25,4 \pm 1,2^{(**)}$	$25,6 \pm 1,3^{(**)}$	$26,2 \pm 1,1^{(**)}$	$26 \pm 1,5^{(**)}$	23	$26,7 \pm 2$	18-30
6.	Эозинофилы	%	$5,1 \pm 0,7$	$5,8 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,6$	$4,9 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,7$	6	$5,2 \pm 1,1$	1-8
7.	Моноциты	%	$3,9 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,3$	5	$3,3 \pm 0,6$	1-6
8.	Базофилы	%	$0,64 \pm 0,25$	$0,67 \pm 0,25$	$0,45 \pm 0,26$	$0,5 \pm 0,26$	$0,75 \pm 0,23$	0	$0,6 \pm 0,3$	0-1
9.	Лимфоциты	%	$64,3 \pm 1,7$	$64,4 \pm 1,4^{(**)}$	$65,8 \pm 1,3^{(**)}$	$64,4 \pm 1,4^{(**)}$	$64,1 \pm 1,4^{(**)}$	66	$64,2 \pm 2,7$	52-67

Примечание: * различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при $t = 2,10$); ^(**) - различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой до введения препарата, относительно опытной группы через 14 суток после введения препарата ($P \leq 0,05$ при $t = 2,10$)

Таблица 10 - Гематологические показатели 1 группы цыплят (АМП орально за 7 суток), (n=15, P≤0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ животного															Среднее, М±m	Норма	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
До введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	23,4	34,7	26,9	29	23,2	28,5	34,5	25,9	32,7	32,4	32,5	27,4	29,6	26,3	20,1	28,5±2,2	20-30	
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	3	2,8	2,5	2,6	2,9	3,1	3,1	2,9	2,1	2,1	2,4	2,5	2,6	1,8	2	2,6±0,2	2,8-4,2	
3.	Гемоглобин	г/л	92,4	94,2	108,5	69,4	100,7	97,7	66,3	71,5	77	90	92,4	74,5	64,8	68,3	77,9	83±7,2	80-100	
4.	СОЭ	мм/час	6	6	6	5	5	5	5	4	5	11	4	6	5	6	4	5,5±0,9	1-6	
5.	Псевдо-эозинофилы	%	22	23	30	22	23	27	22	28	27	41	30	29	28	22	28	26,8±2,5	18-30	
6.	Эозинофилы	%	6	5	4	4	3	6	7	7	3	7	7	5	3	7	6	5,3±0,8	1-8	
7.	Моноциты	%	5	3	4	3	4	5	5	3	3	4	3	4	3	5	4	3,9±0,4	1-6	
8.	Базофилы	%	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0,4±0,26	0-1	
9.	Лимфоциты	%	66	69	61	71	70	61	66	61	67	48	59	62	65	66	62	63,6±2,9	52-67	
Через 14 суток после введения препарата																				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	Лейкоциты	$10^9/\text{л}$	23,3	26,6	33,4	35,8	35,2	35,5	26	29,7	33,6		25,2	31,7	25,7	28,4	20,8	29,4±2,5	20-30
2.	Эритроциты	$10^{12}/\text{л}$	1,9	2,8	2,8	2,3	2,7	2,6	2,8	1,8	2,8		2,2	1,8	3	2,8	2,8	2,5±0,2	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	92,2	96,4	90,6	97,2	88,3	84,7	82,2	88,5	75,1		90,6	87,9	92	81,7	87,6	88,2±3*	80-100
4.	СОЭ	мм/час	6	4	6	5	6	5	4	4	4		4	6	5	5	5	4,9±0,4	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	28	27	24	27	27	24	30	23	24		23	28	27	29	24	26,1±1,2	18-30
6.	Эозинофилы	%	7	6	4	5	5	3	4	6	7		4	6	7	4	3	5,1±0,7	1-8
7.	Моноциты	%	5	3	5	5	4	3	5	3	3		3	4	4	4	4	3,9±0,4	1-6
8.	Базофилы	%	1	0	0	1	1	0	0	1	1		1	1	1	0	1	0,64±0,25	0-1
9.	Лимфоциты	%	59	64	67	62	63	70	61	67	65		69	61	61	63	68	64,3±1,7	52-67

Таблица 11 – Гематологические показатели 2 группы цыплят (АМП орально), (n=15, P<0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ животного															Среднее, М±m	Норма	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
До введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	51,6	44,7	50,7	47,4	39,7	26,3	37,6	32,1	39,5	51,8	38,4	40,2	51,9	35,9	44,8	42,2±3,9	20-30	
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	1,8	1,8	1,8	2,1	2	2	1,8	2	1,8	2	2	2,4	1,8	1,8	2	1,9±0,1	2,8-4,2	
3.	Гемоглобин	г/л	81,8	66,9	75,3	55,9	74,6	76,2	98,3	60,8	54	75	66,9	58,1	59,2	55,3	65,6	68,3±6,1*	80-100	
4.	СОЭ	мм/час	11	10	12	15	12	5	10	12	12	15	10	14	12	11	10	11,4±1,2	1-6	
5.	Псевдо-эозинофилы	%	30	34	40	29	33	24	31	37	40	30	38	33	37	37	40	34,2±2,4	18-30	
6.	Эозинофилы	%	5	6	4	3	3	6	7	4	6	6	7	7	5	6	3	5,2±0,7	1-8	
7.	Моноциты	%	4	3	3	3	3	3	5	3	3	3	3	3	5	4	5	3,5±0,4	1-6	
8.	Базофилы	%	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0,47±0,26	0-1	
9.	Лимфоциты	%	61	57	53	65	60	67	56	55	51	60	52	56	52	52	52	56,6±2,5	52-67	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Через 14 суток после введения препарата																			
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	31,6	20,8		26,5		19,7	20,8	34,2		30	33,2		22,3			26,6±2,9	20-30
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	1,8	3		2,5		1,8	3	2,5		3,2	2,7		1,9			2,5±0,3	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	74,5	90		73,8		85	96,9	90,5		85	77,1		81,5			83,8±4	80-100
4.	СОЭ	мм/час	4	5		4		6	6	6		5	4		6			5,1±0,5	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	28	27		26		23	22	25		26	23		29			25,4±1,2	18-30
6.	Эозинофилы	%	4	7		7		7	5	7		6	4		5			5,8±0,7	1-8
7.	Моноциты	%	3	5		3		4	4	3		4	4		3			3,7±0,4	1-6
8.	Базофилы	%	1	1		1		0	0	1		0	1		1			0,67±0,25	0-1
9.	Лимфоциты	%	64	60		63		66	69	64		64	68		62			64,4±1,4	52-67

Таблица 12 – Гематологические показатели 3 группы цыплят (АМП инъекционно), (n=15, P≤0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ животного															Среднее, М±m	Норма	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
До введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	35,6	20,8	37,3	43,7	48,8	32,6	33,5	42,8	45,6	48,4	34,3	44,1	46,6	49,8	49,5	40,9±4,2	20-30	
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	2,3	2	1,5	2,2	2,3	1,9	1,8	2,1	2,6	2,5	1,9	2	1,4	1,7	1,9	2±0,2	2,8-4,2	
3.	Гемоглобин	г/л	95,4	75,3	66,1	56,4	88,1	82,6	59,2	79,9	60,7	91,3	73,4	67,5	82,8	87,5	82,6	76,6±6,2	80-100	
4.	СОЭ	мм/час	11	6	13	14	10	14	11	15	9	9	12	10	12	11	14	11,4±1,2	1-6	
5.	Псевдо-эозинофилы	%	41	28	32	36	32	33	32	34	36	34	33	29	32	35	36	33,5±1,6	18-30	
6.	Эозинофилы	%	3	4	5	5	3	3	7	5	7	4	6	7	6	5	5	5±0,7	1-8	
7.	Моноциты	%	5	4	5	4	3	4	5	5	5	3	5	5	4	3	4	4,3±0,4	1-6	
8.	Базофилы	%	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0,4±0,26	0-1	
9.	Лимфоциты	%	51	63	57	55	62	60	55	56	51	59	55	58	58	57	55	56,8±1,7	52-67	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Через 14 суток после введения препарата																			
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л		35,5	33,7			20,5	21,3	23	20,7	26,7		20,2	23,9	32,8	32,5	26,4±3,1	20-30
2.	Эритроциты	10 ¹² /л		2,3	1,8			2,9	2,2	2,4	2,4	3,1		3	2,6	2,3	2,2	2,5±0,2	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л		87,5	92,6			90,5	85,7	91,9	94,8	92,3		85,8	85	92,3	80,4	89±2,2	80-100
4.	СОЭ	мм/час		5	4			4	5	5	4	4		5	5	6	6	4,8±0,4	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%		24	27			29	22	26	23	30		24	27	26	24	25,6±1,3	18-30
6.	Эозинофилы	%		5	3			6	5	6	4	4		4	3	5	7	4,7±0,6	1-8
7.	Моноциты	%		4	5			4	3	3	3	3		3	3	3	3	3,4±0,3	1-6
8.	Базофилы	%		1	0			0	0	0	1	0		1	1	0	1	0,45±0,26	0-1
9.	Лимфоциты	%		66	65			61	70	65	69	63		68	66	66	65	65,8±1,3	52-67

Таблица 13 – Гематологические показатели 4 группы цыплят (АМП+ЭНФ), (n=15, P≤0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ животного															Среднее, М±m	Норма	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
До введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	47,5	41,5	43,1	35	48,5	38	44	39,8	49,2	34,6	49,2	42,6	29,3	31,2	37,8	40,8±3,3	20-30	
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	2	2,1	1,8	1,8	2	1,8	2	1,9	1,9	1,8	2	2,3	2,4	2	1,8	2±0,1	2,8-4,2	
3.	Гемоглобин	г/л	68	90,6	96,9	97	73	61,1	59,2	91	94,4	98,1	98,7	71,7	56,4	71,5	54,3	78,8±8,6	80-100	
4.	СОЭ	мм/час	9	9	12	9	13	15	12	14	15	11	11	10	9	9	12	11,3±1,1	1-6	
5.	Псевдо-эозинофилы	%	30	38	31	37	36	41	33	31	40	38	35	31	39	40	39	35,9±1,9	18-30	
6.	Эозинофилы	%	5	4	7	3	4	4	4	3	4	4	4	3	7	5	3	4,3±0,6	1-8	
7.	Моноциты	%	5	5	3	5	5	5	4	4	3	5	3	3	5	5	5	4,3±0,5	1-6	
8.	Базофилы	%	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0,6±0,26	0-1	
9.	Лимфоциты	%	59	52	59	54	54	50	59	61	52	52	57	63	48	50	53	54,9±2,3	52-67	

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Через 14 суток после введения препарата																			
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	23,3	26,5		28,3	33,3	33,4	26,1	20,5	28,2	20,5	36,3	22,8	21,9	27,2	31,5	27,1±2,6	20-30
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	2,1	2,3		2,7	1,9	2,9	1,8	2,4	1,8	2,6	2,2	2,5	3,2	1,8	2,2	2,3±0,2	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	97,7	84,7		75	76,1	96	93,3	91,1	89,2	85,7	75,6	73,4	93,7	77,5	86,5	85,4±4,3	80-100
4.	СОЭ	мм/час	4	4		4	5	5	5	6	5	4	5	4	4	6	6	4,8±0,4	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	29	26		28	30	26	28	26	26	24	26	28	25	22	23	26,2±1,1	18-30
6.	Эозинофилы	%	5	6		6	4	4	3	6	3	6	6	5	5	7	3	4,9±0,7	1-8
7.	Моноциты	%	3	3		5	5	4	3	5	3	4	5	3	4	5	3	3,9±0,5	1-6
8.	Базофилы	%	1	0		1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0,5±0,26	0-1
9.	Лимфоциты	%	62	65		60	61	66	65	62	68	65	63	63	66	66	70	64,4±1,4	52-67

Таблица 14 – Гематологические показатели 5 группы цыплят (ЭНФ), (n=15, P≤0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ животного															Среднее, М±m	Норма	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
До введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	38	40	33,1	32,5	31,8	38,1	45,9	36,9	35,8	50,6	48,7	31,8	50,6	32,5	46,1	39,5±3,6	20-30	
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	2,1	1,4	2,5	2,5	1,4	1,6	1,5	1,6	2	2,3	2	2,4	2,1	1,7	2,3	2±0,2	2,8-4,2	
3.	Гемоглобин	г/л	62,7	87,6	57,6	88,5	80,4	56,2	81,1	79,4	68,8	91,5	85	88,9	87,9	59,6	89,2	77,6±6,5	80-100	
4.	СОЭ	мм/час	11	14	15	15	9	14	11	10	15	12	9	10	14	10	11	12±1,1	1-6	
5.	Псевдо-эозинофилы	%	35	39	38	32	29	29	35	32	38	30	38	31	32	32	32	33,5±1,7	18-30	
6.	Эозинофилы	%	4	5	4	5	3	4	5	5	6	6	7	4	5	5	6	4,9±0,5	1-8	
7.	Моноциты	%	4	3	5	5	4	4	4	3	3	4	4	5	3	3	4	3,9±0,4	1-6	
8.	Базофилы	%	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0,53±0,26	0-1	
9.	Лимфоциты	%	56	52	52	57	64	63	55	60	53	60	50	59	60	60	57	57,2±2,1	52-67	

Продолжение таблицы 14

Гематологические показатели 5 группы цыплят (ЭНФ), (n=15, P≤0,05)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Норма
Через 14 суток после введения препарата																			
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	33,5	22,3	36,3	24,7	23,5	29,9	31,9	25,2	29	26,4			25,7		20,5	27,4±2,4	20-30
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	2,4	3,2	1,8	2,3	3	2,7	3	3,1	3	2,6			2,6		3,1	2,7±0,2	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	90,4	87,7	88,2	83,1	86,9	80,7	82,5	78,4	85,3	72,3			87,4		97,2	85±3,2	80-100
4.	СОЭ	мм/час	5	4	5	5	5	5	5	4	4	4			4		6	4,7±0,3	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	23	26	30	27	27	22	26	30	29	27			23		22	26±1,5	18-30
6.	Эозинофилы	%	4	4	4	6	4	7	4	3	7	4			5		4	4,7±0,7	1-8
7.	Моноциты	%	5	4	3	4	5	5	4	5	4	5			5		5	4,5±0,3	1-6
8.	Базофилы	%	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1			1		1	0,75±0,23	0-1
9.	Лимфоциты	%	67	66	62	63	63	65	66	61	59	63			66		68	64,1±1,4	52-67

Таблица 15 – Гематологические показатели б (контрольной) группы цыплят, (n=15, P≤0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ животного															Среднее, M±m	Норма	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
До введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	35,3	51,9	37,5	42,8	37,3	50,9	35,1	48,5	30,6	40	37,4	31,3	28,2	48,9	49,4	40,3±4	20-30	
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	1,7	2,1	2,2	2,3	2,2	1,7	2,2	1,5	1,7	1,4	2,5	2,5	1,7	1,4	1,6	1,9±0,2	2,8-4,2	
3.	Гемоглобин	г/л	60,8	59,7	74	97,1	57,6	88,6	86,9	77,7	87,5	70,3	75,2	97	55,2	85,9	91,6	77,7±7,3	80-100	
4.	СОЭ	мм/час	12	10	14	14	9	14	14	14	10	14	11	12	15	13	12	12,5±0,9	1-6	
5.	Псевдо-эозинофилы	%	41	39	34	29	34	29	33	30	38	29	35	39	39	40	35	34,9±2,2	18-30	
6.	Эозинофилы	%	5	6	4	5	6	6	7	4	7	6	6	3	3	6	4	5,2±0,7	1-8	
7.	Моноциты	%	4	5	3	4	5	4	3	5	3	5	4	4	5	3	5	4,1±0,4	1-6	
8.	Базофилы	%	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0,6±0,26	0-1	
9.	Лимфоциты	%	49	50	58	61	54	61	56	61	51	59	55	53	53	51	55	55,1±2,1	52-67	

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Через 14 суток после введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	26,5																23,5±6	20-30
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	1,9																2,4±0,9	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	93,2																88,4±9,5	80-100
4.	СОЭ	мм/час	4																5±2	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	23																26,5±6,9	18-30
6.	Эозинофилы	%	6																4,5±2,9	1-8
7.	Моноциты	%	5																5,0±0,0	1-6
8.	Базофилы	%	0																0,5±0,98	0-1
9.	Лимфоциты	%	66																63,5±4,9	52-67

Таблица 16 – Гематологические показатели 7 (интактной) группы цыплят, (n=15, P≤0,05)

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	№ животного															Среднее, М±m	Норма	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
До введения препарата																				
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	35,1	36,1	26,1	32,8	23,6	34	33	28,1	28,1	35,9	29,9	30,9	25,7	30,2	23,8	30,2±2,1	20-30	
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	3,1	2,3	2,4	2,5	1,7	2,9	3	2,7	2,2	2,1	2,6	2,9	2,4	1,8	1,8	2,4±0,2	2,8-4,2	
3.	Гемоглобин	г/л	92,1	98,5	110	74,1	104,7	88,7	70,9	80,8	80,6	98,5	95,1	80	80,3	67,5	72,7	86,3±6,6	80-100	
4.	СОЭ	мм/час	6,6	5,7	5,7	5,2	5,5	3,2	5,2	3,9	5	10,2	4	5,9	5,3	3,8	6,1	5,4±0,8	1-6	
5.	Псевдо-эозинофилы	%	24	22	28	23	25	24	23	24	26	41	33	29	29	21	23	26,3±2,6	18-30	
6.	Эозинофилы	%	5	5	4	4	3	6	7	3	3	7	7	5	3	7	7	5,1±0,8	1-8	
7.	Моноциты	%	2	3	4	3	4	5	5	3	3	4	3	4	3	3	5	3,6±0,5	1-6	
8.	Базофилы	%	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0,5±0,3	0-1	
9.	Лимфоциты	%	68	69	63	70	68	64	65	69	68	48	56	62	64	69	65	64,5±3	52-67	

Гематологические показатели 7 (интактной) группы цыплят, (n=15, P≤0,05)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Норма
Через 14 суток после введения препарата																			
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	23,2	35,9	28,2	21,2	23,8	40,1	26,5	27,1	31,4	33,9	24,3	25,1	31,8	27	38,2	29,2±2,9	20-30
2.	Эритроциты	10 ¹² /л	2,9	2,9	2,3	2,7	3	3	3,2	2,9	1,9	1,6	2,6	2,5	2,6	1,9	1,8	2,5±0,3	2,8-4,2
3.	Гемоглобин	г/л	101	92,5	111,5	75,3	99,8	95,5	62,6	75,9	73,6	97,9	88,6	74,3	90,3	78,9	73,5	86,1±6,9	80-100
4.	СОЭ	мм/час	6,2	3,1	3,3	5	5,3	5	5,3	3,9	5	5,5	3,9	6,2	5,1	10,1	6,3	5,3±0,8	1-6
5.	Псевдо-эозинофилы	%	21	25	31	22	24	27	23	28	29	32	33	31	25	22	28	26,7±2	18-30
6.	Эозинофилы	%	7	5	4	4	2	6	7	8	3	7	8	5	3	7	2	5,2±1,1	1-8
7.	Моноциты	%	2	3	4	3	4	5	5	3	3	4	3	4	3	1	2	3,3±0,6	1-6
8.	Базофилы	%	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0,6±0,3	0-1
9.	Лимфоциты	%	69	67	60	71	70	61	65	60	64	56	55	59	68	70	68	64,2±2,7	52-67