

**Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Омский аграрный научный центр»**

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ
АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

Методические рекомендации

ОМСК 2025

Рецензент: Плешакова В.И. – профессор кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней Омского государственного аграрного университета (ФГБОУ ВО Омский ГАУ им. П.А. Столыпина), доктор ветеринарных наук, профессор

Методы оценки противотуберкулезной активности новых производных химических соединений: Метод. рекомендации / Н.А. Денгис, П.В. Аржаков. - ФГБНУ «Омский АНЦ». – Омск, 2025. – 20с

В методических рекомендациях описаны методы и технология оценки туберкулоцидной активности ДС и новых химических соединений.

Настоящие методические указания предназначены для организаций, осуществляющих разработку, изучение, производство, испытание, государственную регистрацию, сертификацию, применение новых противотуберкулезных препаратов, активно воздействующих непосредственно на микобактерий туберкулеза и дезинфицирующих средства (ДС) и их субстанций (действующих веществ – ДВ) при обеззараживании различных объектов ветеринарно-санитарного надзора, контаминированных возбудителем туберкулеза и микобактериозов сельскохозяйственных животных.

Материалы рассмотрены и утверждены на заседании Ученого совета ФГБНУ «Омский АНЦ», протокол № 3 от 18.10. 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Методы исследований и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций <i>in vitro</i>	5
1.1. Тест-микроорганизмы для изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций	5
1.2. Требования к тест-микроорганизмам	5
1.3. Приготовление рабочей суспензии тест-микробактерий, используемой в эксперименте при испытании дезинфицирующих средств	6
2. Метод батистовых тест-объектов	6
2.1. Приготовление и контаминация батистовых тест-объектов	7
2.2. Проведение обработки тест-объектов раствором испытуемого ДС и контроль эффективности обеззараживания	8
2.3. Учет и анализ результатов эксперимента	9
2.4. Определение влияния белковых загрязнений на туберкулоцидную активность ДС	10
3. Изучение бактериостатической и бактерицидной активности новых противотуберкулезных лекарственных средств в опытах <i>in vitro</i>	11
3.1. Штамм	11
3.2. Питательные среды и условия культивирования микобактерий	11
3.2.1. Приготовление сред для культивирования микобактерий	12
3.3. Приготовление стандартного раствора бактериальной суспензии	13
3.4. Приготовление разведений изучаемых соединений	13
3.5. Определение бактериостатической активности	14
3.5.1. Окраска мазков по Цилю–Нильсену	15
Заключение	18
Список литературы	19

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез, как зооантропонозное заболевание, во многих странах мира и Российской Федерации до настоящего времени остается одной из наиболее сложных проблем инфекционной патологии, при этом против туберкулеза и микобактериозов нет достаточно эффективных средств иммунопрофилактики и иммунотерапии [1].

Эпизоотическую обстановку по туберкулезу осложняет проявление так называемой неспецифической (парааллергической) реактивности крупного рогатого скота к туберкулину, обуславливающей неясность эпизоотической ситуации, необоснованный убой продуктивных животных, потерю продукции и приплода, ограничение племенной работы, а также дополнительные затраты на дифференциальную диагностику [2].

Поиск новых препаратов, обладающих высокой противотуберкулезной активностью, является необходимым условием в борьбе с туберкулезной инфекцией.

Объекты внешней среды в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах контаминированы как патогенными, так и нетуберкулезными микобактериями, наличием в составе их клеточной стенки восков, мицелловых кислот и полисахаридов определяется устойчивость ко многим физическим и химическим факторам, микобактерии устойчивы ко многим кислотам, щелочам, спиртам, а также не чувствительны к четвертичным аммониевым соединениям, которые присутствуют во многих дезинфицирующих препаратах [3-5].

В связи с вышесказанным представляется актуальной задачей для выполнения эффективных ветеринарно-санитарных мероприятий проведение экспериментов по сравнительной оценке чувствительности тест-микобактерий к воздействию дезинфицирующих средств (ДС) разных химических групп.

1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОЦЕНКИ ТУБЕРКУЛОЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ И ИХ СУБСТАНЦИЙ *IN VITRO*

Применение эффективных дезинфицирующих средств позволяет обеззаразить различные объекты (поверхности помещений для содержания животных, оборудования, предметов ухода и инструментов, воздуха и др.), которые могут быть контаминированы одновременно патогенными микроорганизмами различных видов и разорвать тем самым их пути передачи в организм животных и обслуживающего персонала через эти объекты [6,7].

Возрастает роль неспецифических противоэпидемических мероприятий, среди которых ведущую роль занимает химическая дезинфекция, направленная на уничтожение возбудителей на объектах внешней среды, имеющих значение в передаче инфекции.

1.1. Тест-микроорганизмы для изучения и оценки туберкулоцидной активности дезинфицирующих средств и их субстанций

К применению в отечественной ветеринарной практике для дезинфекции при туберкулезе предлагаются различные ДС как отечественного, так и зарубежного производства, имеющие туберкулоцидные режимы, разработанные с использованием наиболее устойчивых тест-микроорганизмов, что должно гарантировать их эффективность в отношении возбудителя [6].

Исследование и оценку туберкулоцидной и микобактерицидной (в отношении непатогенных микобактерий) активности ДС, проводят, используя в качестве тест-микроорганизмов референтные штаммы нетуберкулезных (*Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium scrofulaceum*) и туберкулезных микобактерий *Mycobacterium bovis* шт. 14.

1.2. Требования к тест-микроорганизмам

Тест-микобактерии должны иметь типичные морфологические, культуральные, биохимические, тинкториальные и ферментативные свойства, присущие данному штамму, и обладать стандартной устойчивостью к эталонным ДС и температуре.

1.3. Приготовление рабочей суспензии тест-микобактерий, используемой в эксперименте при испытании дезинфицирующих средств

Для приготовления рабочей суспензии культуру микобактерий снимают платиновой лопаточкой или стеклянной палочкой с плотной питательной среды и помещают в толстостенную стеклянную пробирку. Микробную биомассу тщательно гомогенизируют, постепенно добавляя по каплям стерильную дистиллированную воду. Густую исходную бактериальную суспензию оставляют на 15 мин. Для осаждения негомогенизированных конгломератов и частиц. Полученную надосадочную жидкость отбирают пастеровской пипеткой, переносят в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности (ФГУН «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича» Роспотребнадзора), и стандартизируют по оптическому стандарту мутности № 10 (он соответствует $1 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл), добавляя стерильную дистиллированную воду. Суспензия, содержащая такое количество живых микробов, при контаминации ею батистовых тест-объектов, тест-поверхностей и т. п. обеспечивает требуемые (порядка $1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$ КОЕ/см²) уровни их обсеменения живыми клетками тест-микробы.

2. МЕТОД БАТИСТОВЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ

Методика эксперимента предусматривает проведение контаминации микобактериями батистовых тест-объектов, контроля

исходного уровня обсеменения тест-объектов, обработки (замачивания) тест-объектов в испытываемом дезинфицирующем растворе, нейтрализации ДС после заданной экспозиции воздействия, инкубирование нейтрализованных тест-объектов на плотной питательной среде.

2.1. Приготовление и контаминация батистовых тест-объектов

Батистовую ткань погружают на 24 часа в холодную питьевую воду для удаления аппрета. Затем ткань тщательно стирают с мылом, прополаскивают в холодной воде, кипятят, сушат и гладят утюгом. С помощью иглы в приготовленном куске батистовой ткани выдергивают нитки в продольном направлении на расстоянии 10 мм друг от друга и в поперечном – на расстоянии 5 мм друг от друга. По этим линиям ткань разрезают ножницами на отдельные тест-объекты; раскладывают по 50 штук в чашки Петри, которые завертывают в бумагу и автоклавируют в паровом стерилизаторе 20 мин. При 132° С (1,1 кгс/см²). Приготавливают рабочую суспензию тест-микобактерий в количестве, достаточном для контаминации используемых в опыте тест-объектов (из расчета 0,2 мл на тест).

Стерильные батистовые тест-объекты (в количестве 50 – 100 штук) в чашке Петри заливают 10 – 20 мл рабочей суспензии тест-микобактерий, содержащей 10⁹ КОЕ/мл, и, равномерно смачивая, оставляют тест-объекты в суспензии в закрытой чашке Петри. Через 30 мин. Тест-объекты, контаминированные бактериальной суспензией, стерильным пинцетом с соблюдением асептики переносят в стерильную чашку Петри на поверхность двухслойной стерильной фильтровальной бумаги, покрывают их сверху стерильной фильтровальной бумагой и закрывают чашку. Оставляют на 10 мин. С целью удаления избытка жидкости. Для фиксации микроорганизмов на батистовых тест-объектах, последние переносят на поверхность сухой стерильной фильтровальной бумаги в чашке Петри и сверху прикрывают стерильным листом фильтровальной бумаги, подсушивают в термостате при 37 °С в течение 20 мин. С

приоткрытыми крышками. Хранение контаминированных тест-объектов возможно в холодильнике при температуре (4 ± 2) °C в течение суток.

Контроль исходного количества живых тест-микобактерий на тест-объекте

Для контроля количества жизнеспособных микобактериальных клеток на тест-объекте его погружают в колбу со 100 мл стерильной дистиллированной воды. Колбу устанавливают на шейкер и встряхивают течение 30 мин. Для отмывания бактериальных клеток с бязевого (батистового) тест-объекта. Из полученной суспензии производят посев по 0,1 мл на 5 пробирок (5 повторностей) со средой Левенштейна-Йенсена, инкубируют в термостате при 37 °C в течение 14 – 21 суток. Выросшие колонии на поверхности питательной среды подсчитывают, определяют среднее значение, производят пересчет с учетом разведения. Количество жизнеспособных бактериальных клеток в приготовленной суспензии на тест-объекте должно составлять 10^5 – 10^6 микробных тел. Если рост микобактерий отсутствует при посеве суспензии объемом 0,1 мл, можно увеличить объем до 0,2 – 0,3 мл и, соответственно, учесть его при расчете бактериальной концентрации на тест-объекте.

2.2. Проведение обработки тест-объектов раствором испытуемого ДС и контроль эффективности обеззараживания

Стерильным пинцетом погружают необходимое для проведения эксперимента количество контаминированных тест-штаммом микобактерий тест-объектов в пробирку или чашку Петри с раствором ДС (объем ДС должен рассчитываться с учетом соотношения 1,0 мл раствора на 1 тест-объект), обеспечивая полное смачивание (погружение) тест-объектов, фиксируют время начала экспозиции и следят за соблюдением температурного режима (20 ± 2) °C.

По истечении заданного времени экспозиции стерильным пинцетом извлекают тест-объект из раствора ДС и погружают его на 1 – 2 мин. В пробирку со стерильным раствором нейтрализатора при

температуре (20 ± 2) °С (пробирку с раствором нейтрализатора и погруженным в него тестом не встряхивают). Затем при помощи пинцета размещают тест-объект на скошенную поверхность питательной среды Левенштейна-Йенсена (на скошенную площадку питательной среды в пробирке можно разместить 3 тест-объекта, что позволяет увеличить без дополнительных затрат количество проб на каждую экспозицию, а значит, и достоверность результатов оценки эффективности средства). Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, помещают в термостат в наклонном положении под углом 30° таким образом, чтобы стекающий с теста посевной материал тоже равномерно распределился по поверхности питательной среды, и инкубируют при 37 °С в течение 10 – 14 дней с ежедневным просмотром.

2.3. Учет и анализ результатов эксперимента

Учет результатов посевов проводят визуально путем подсчета выросших колоний на самом тест-объекте и на поверхности питательной среды. Наличие роста колоний тест-микобактерий на тест-объекте и на поверхности питательной среды показывает, что тестируемое ДС в данном режиме применения (концентрация раствора и экспозиция воздействия) не обеспечивает надежного туберкулоцидного эффекта. Отсутствие роста колоний тест-микобактерий на тест-объекте и на поверхности питательной среды свидетельствует о наличии у средства в данном режиме (концентрация раствора и экспозиция воздействия) туберкулоцидной эффективности, отвечающей предъявляемым требованиям к ДС для практического их использования (обеспечение снижения уровня обсемененности объекта на 10^5 КОЕ/см²). Эффективной экспозицией для рабочего раствора испытанной концентрации считается вторая экспозиция из показавших отсутствие в посевах соответствующих им проб жизнеспособных микобактерий. Количество и интервал (шаг) экспозиций, при которых осуществляется отбор проб на эффективность ДС, выбирают на основе данных о составе и

эффективности входящих в средство действующих веществ. Средство, растворы которого обеспечивают при температуре (20 ± 2) °С в течение 60 мин полную гибель микобактерий тест-микроорганизма, может рассматриваться как перспективное туберкулоцидное ДС для дальнейшего изучения.

2.4. Определение влияния белковых загрязнений на туберкулоцидную активность ДС

Проводят с целью выявления возможности влияния (или установления его отсутствия) белковых загрязнений на обеззараживаемом объекте на туберкулоцидную активность ДС. Исследование проводят методом батистовых тест-объектов, только для контаминации тест-объектов используют суспензию тест-микобактерий, содержащую 20,0 % белково-липидной смеси (сметана 15% жирности), которую добавляют в суспензию при ее приготовлении. Инактивацию белково-липидной смеси проводят автоклавированием (120 °С, 1,1 кгс/см², 45 минут). Если активность препарата не снижается в присутствии 20,0 % белково-липидной смеси, то ее концентрацию в суспензии тест-микроорганизма увеличивают до 40,0 %. Отсутствие снижения туберкулоцидной активности ДС при добавлении 40,0 % белково-липидной смеси позволяет считать ДС не реагирующим на присутствие белковых загрязнений.

3. ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЙ И БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОТИВО- ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ОПЫТАХ IN VITRO

Поиск новых противотуберкулезных препаратов, активно воздействующих непосредственно на микобактерий туберкулеза и не вызывающих побочных реакций, является необходимым условием в борьбе с туберкулезной инфекцией. Большое значение здесь имеют микробиологические исследования, при которых изучается эффективность лечения экспериментального туберкулеза с учетом изменения бактериальной популяции, определение бактериостатической и бактерицидной активности новых препаратов в сравнении с традиционно применяемыми. Принципиальные подходы к изучению противотуберкулезной активности различных синтетических и природных соединений не отличаются от методов экспериментальной антимикробной активности в отношении других микроорганизмов, однако имеют важные особенности, обусловленные биологией микобактерий туберкулеза [4].

3.1. Штамм

Противотуберкулезную активность химических соединений определяли по отношению к культуре эталонного штамма *Mycobacterium bovis* шт.14 (ВНИИБТЖ)

3.2. Питательные среды и условия культивирования микобактерий

Питательной средой для культивирования микобактерий, согласно международным стандартам, является плотная яичная среда Левенштейна-Йенсена. Штамм регулярно должен пересеваться раз в 3 – 4 месяца. Время роста культуры на плотных яичных средах в среднем составляет 21 день (18 – 28 дней).

0.2.1. Приготовление сред для культивирования микобактерий *Среда Левенштейна–Йенсена*

Состав:

*Солевой раствор: калий фосфорнокислый однозамещенный – 2,4 г
магний сернокислый – 0,24 г
магний лимоннокислый – 0,6 г
L-аспарагин – 3,6 г
глицерин – 12 мл
вода дистиллированная – 600 мл*

Реактивы растворяют в указанной последовательности при подогревании, не доводя до кипения, и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. В течение 20 мин. Срок хранения стерилизованной солевой основы составляет 3 – 4 недели. Яичная масса: 24–27 штук (в зависимости от величины) свежих диетических яиц моют в теплой проточной воде щеткой с мылом, погружают на 30 мин. В 70% этиловый спирт. Затем яйца разбивают стерильным пинцетом в стерильную посуду с бусами над пламенем горелки, хорошо гомогенизируют, добавляют 600 мл солевого раствора и 20 мл стерильного 2% водного раствора малахитового зеленого. Смесь фильтруют через марлевый фильтр. Питательную среду разливают в пробирки по 5 мл и свертывают в наклонном положении при 85 °С в течение 45 мин в электросвертывателе с автоматической регулировкой температуры.

В опытах *in vitro* кроме плотных питательных сред используется жидккая синтетическая питательная среда Школьниковой.

Жидкая среда Школьниковой

Состав среды:

*калий фосфорнокислый однозамещенный – 1,5 г
натрий фосфорнокислый двузамещенный – 2,5 г
магний сернокислый – 0,5 г
натрий лимоннокислый – 1,5 г
железо лимоннокислое аммиачное зеленое, водное – 0,05 г
L-аспарагин – 1,0 г
глицерин – 30 мл*

дистиллированная вода – до 1 л

Реактивы последовательно растворяют в теплой дистиллированной воде, доводят pH до 7,0, используя для этого 40% раствор натрия гидроксида. Стерилизуют в автоклаве при 1 атм. В течение 30 мин. Перед посевом суспензии микобактерий в среду вводят 10% раствор стерильной плазмы крови человека или инактивированной при 70 °С сыворотки крупного рогатого скота.

3.3. Приготовление стандартного раствора бактериальной суспензии

Культура микобактерий (14–21-дневная), выращенная на плотной яичной среде, в стерильных условиях снимается с косяка платиновой лопаточкой, растирается в пробирке и суспензируется в 0,9% растворе NaCl (физиологический раствор). Далее крупным частицам культуры дают осесть, выдерживая пробирку 20 мин. При комнатной температуре. Взвесь бактерий отбирается пипеткой и переносится в другую пробирку. Необходимая оптическая плотность, или мутность, соответствующая 5 стандарту, достигается добавлением в пробирку физиологического раствора. В 1 мл суспензии, соответствующей 5 стандарту оптической плотности, содержится 500 млн микробных тел (5×10^8 микробных тел). Суспензию микобактерий засевают в жидкую среду Школьниковой из расчета 0,2 мл на 2 мл среды. Такой способ засева обеспечивает равномерное внесение посевного материала в пробы.

3.4. Приготовление разведений изучаемых соединений

Исходный раствор испытуемого соединения готовят с использованием стерильного физиологического раствора. В случае низкой растворимости вещества применяют этиловый спирт, диметилсульфоксид (ДМСО) или растворитель, предложенный разработчиками препарата. Навеску вещества растворяют в минимальном объеме растворителя и после этого разводят дистиллированной водой или физиологическим раствором до нужной

концентрации. Например, к навеске 10 мг вещества добавляют 1, 2, 3 мл этилового спирта или ДМСО, встряхивают, при необходимости подогревают в теплой водяной бане или в термостате при 37 °С. После этого полученный раствор или гомогенную взвесь доводят водой или физиологическим раствором до необходимой концентрации. При применении высоких концентраций растворителей необходимо контролировать эффект воздействия этих веществ на рост микобактерий.

В случае изучения веществ – гомологов известных противотуберкулезных препаратов при выборе испытуемых концентраций целесообразно ориентироваться на данные о минимальных подавляющей (МПК) и бактерицидной (МБК) концентрациях этих препаратов. В случае изучения веществ, относящихся к новым химическим группам, следует испытывать широкий спектр концентраций.

Пример расчета необходимых концентраций для исследования новых соединений в жидкой среде Школьниковой:

I разведение: 10 мг вещества +10 мл жидкости (дистиллированная вода или другой растворитель) = 10 мл – концентрация 1000 мкг/мл;

II разведение: 1 мл I разведения + 9 мл среды Школьниковой = 10 мл – концентрация 100 мкг/мл. Это и есть исходное рабочее разведение.

3.5. Определение бактериостатической активности

Для выявления бактериостатической активности изучаемых веществ применяют метод серийных разведений. В пробирки разливают по 2 мл питательной среды Школьниковой. Для получения серий необходимых концентраций изучаемых препаратов в первую опытную пробирку наливают 4 мл исходного рабочего разведения. Ряд серийных разведений получают, перенося последовательно из каждой пробирки в следующую по 2 мл жидкости. Из последней, 10-й пробирки, 2 мл жидкости удаляют. Концентрации в данном случае уменьшаются от 100 до 0,195 мкг/мл. Кроме того, в каждом опытном ряду необходимо наличие 2-х контрольных пробирок, содержащих

2 мл среды без препаратов. Далее во все пробирки ряда засевают по 0,2 мл бактериальной суспензии, приготовленной по 5 стандарту оптической плотности. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, которые парафинируют и инкубируют в термостате при 37 °С. В качестве контрольного ряда необходимо применять известные противотуберкулезные препараты. Рост культуры эталонного штамма *Mycobacterium bovis* шт.14 (ВНИИБТЖ) в пробирках без препарата может быть определен визуально на 10 день в виде пленки на поверхности среды; на 14 день появляются хлопья или зернистый осадок на дне пробирки. Из этого осадка готовятся мазки и окрашиваются по Цилю–Нильсену.

3.5.1. Окраска мазков по Цилю–Нильсену

Приготовленные мазки покрывают фильтровальной бумагой и наносят 1,5 мл карболового фуксина на один мазок, затем медленно нагревают предметное стекло с мазком над пламенем горелки до появления пара. При этом не допускают кипение фуксина и высушивание материала. Мазок с прогретым раствором оставляют на 5 мин. Затем удаляют фильтровальную бумагу и аккуратно смывают остатки краски со стекла проточной водой. Обесцвечивание проводят 25% раствором серной кислоты (2 мл на мазок) в течение 3 мин. Затем промывают препарат проточной водой и дополнительно обрабатывают 96% этиловым спиртом (2 мл на мазок) в течение 5 мин. Гашение фона достигается обработкой 0,3% раствором метиленового синего в течение 30-60 с. Приготовление растворов: Все растворы готовятся с использованием дистиллированной воды

1. Насыщенный спиртовой раствор фуксина: основной фуксин – 3 г, 96% этиловый спирт – 100 мл.

2. Рабочий раствор фуксина: кристаллы фенола – 5 г, медленно нагревают до расплавления, доливают 90 мл воды, затем в полученный раствор фенола добавляют 10 мл насыщенного раствора фуксина.

3. 25% раствор серной кислоты: в 300 мл воды доливают 100 мл 98% (концентрированной) серной кислоты. Данная манипуляция

проводится с крайней осторожностью! 4. 0,3% метиленовый синий: 0,3 г метиленового синего растворяют в 100 мл воды.

Результаты посевов оценивали по количеству микобактерий туберкулеза (МБТ) в полях зрения по следующей схеме:

0 – отсутствие МБТ в 100 полях зрения;

± – от 1 до 9 МБТ на 100 полей зрения;

+ – от 10 до 100 МБТ на полей зрения;

++ – от 1 до 9 МБТ в одном поле зрения;

+++ – от 10 и более МБТ в одном поле зрения, образование «кос».

Пример: Результаты испытаний туберкулостатической активности новых производных химических соединений представлены в таблице.

Таблица 1 – Определение минимальных подавляющих концентраций химических соединений методом серийных разведений в жидкой питательной среде

Химическое соединение	Минимальная концентрация препаратов, мкг/мл										Контроль
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,195	
KШ-21	±	±	+	++	++	++	++	++	++	++	+++
KVK-41	0	0	0	0	0	±	±	±	±	+	+++
KVK-42	0	0	±	±	±	±	±	±	+	+++	
KVK-61z	0	0	0	+	+	+	+	++	++	++	+++
KVK-62	0	0	0	0	0	0	0	±	+	++	+++
KVK-77	0	±	±	±	+	++	++	++	++	+++	+++
KAO-28	0	0	0	0	0	0	±	±	+	+	+++
KAO-66	0	0	±	±	±	±	±	+	+	+	+++
KAO-62	0	0	±	±	±	+	+	+	+	+	+++
KAO-101	0	0	0	0	0	±	±	±	+	+	+++
KAO-105	0	±	+	+	+	+	+	+	++	++	+++

Химическое соединение	Минимальная концентрация препаратов, мкг/мл										Контроль
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,195	
КАО-106	0	0	0	0	0	±	±	+	+	+	+++
КМН-27	±	±	±	+	+	+	+	+	+	++	+++
КМН-28	±	±	+	+	+	+	+	++	++	++	+++
КМН-31	0	0	±	±	+	+	+	+	+	+	+++
КМН-32	0	0	±	±	+	+	+	+	+	+	+++
КМН-33	0	0	0	0	±	±	+	+	+	+	+++
ГСК	0	0	0	0	±	±	+	++	+++	+++	+++
изониазид	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	+++

Как видно из таблицы предложенный метод серийных разведений показал, что минимальная подавляющая концентрация для соединений KVК-41, KVК-42 и КАО-28 составила 0,39 мкг/мл, для соединений KVК-62 и КАО-101 – 0,78 мкг/мл, для соединений КАО-66 и КАО-106 – 1,56 мкг/мл, для соединения КМН-33 и ГСК – 3,12 мкг/мл.

Умеренное туберкулостатическое действие наблюдали у соединений КАО-62, KVК-77, КМН-31 и КМН-32, которые вызывали бактериолиз в концентрациях 6,25-12,5 мкг/мл.

Самое слабое бактериостатическое действие на *M. Bovis* шт. 14 оказывали соединения КШ-21, КАО-105 и КМН-28, которые вызывали частичное подавление роста в жидкой среде при концентрации 50 мкг/мл, а также КМН-27 и KVК-61z в минимальной концентрации 25 мкг/мл.

По результатам исследований получено свидетельство о регистрации базы данных RU 2024620562, 05.02.2024. Заявка от 01.02.2024 «Противотуберкулезная активность *in vitro* новых производных химических соединений» [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы оценки противотуберкулезной активности новых производных химических соединений могут быть использованы для разработки эффективных туберкулоцидных и микобактерицидных режимов дезинфицирующих средств, применяемых для обеззараживания объектов ветеринарно-санитарного надзора, это достигается использованием в качестве тест-микроорганизмов штаммов нетуберкулезных (*Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium scrofulaceum*) и туберкулезных микобактерий *Mycobacterium bovis* циркулирующих в условиях производственных и технологических объектов животноводства.

Список литературы

1. Эпизоотическая ситуация в РФ. Отчеты по эпидситуации в стране: сайт Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) [Электронный ресурс]: <https://fsvps.gov.ru/ru/iac/rf/ezhekvertalnyj-otchet> (дата обращения: 01.07.2024)
2. Приказ Минсельхоза России от 08.09.2020 № 534 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулеза»
3. Попов П.А., Смирнов А.М., Дорожкин В.И., Гуненкова Н.К., Попов Н.И. Итоги научной деятельности Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии за 2022 год // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». 2023. № 2 (46). С. 134–142.
4. Горяинова Г.М., Скрипникова А.С., Шалагинова А.Д., Гуненкова Н.К. Перспективы применения дезинфицирующих средств при проведении ветеринарно-санитарных мероприятий на объектах ветеринарного надзора // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». 2023. № 1 (45). С. 6–11.
5. Дорожкин В.И., Попов Н.И., Щербакова Г.Ш. Композиционные препараты на защите здоровья животных // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. 2022. 18. С. 771-785.
6. Методы изучения и оценки туберкулоидной активности дезифицирующих средств МУ 3.5.2596 – 10 (2010г).
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
8. Противотуберкулезная активность *in vitro* новых производных химических соединений / Н.А. Денгис, Е.С. Борисов // Свидетельство о государственной регистрации базы данных RU 2024620562, 05.02.2024. Заявка от 01.02.2024.

Научное издание

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ
АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Методические рекомендации

Подписано в печать 30.01.2025 г. Формат бумаги 60 x 84 1/16.

Печать оперативная. Гарнитура «Times New Roman».

Усл. Печ. л. 1,16. Уч. изд. л. 0,68. Тираж 50 экз.

Отпечатано в типографии И.П.Макшеевой Е.А.

644012, г. Омск, ул. Долгирева, 126. Тел.: 89083194462

