

IRSTI: 68.41.53

A.K. MUSSAYEVA¹, S.N. ABDRESHOV^{2*}, N.N. YEGOROVA¹,
A.N. YESHMUKHANBET^{2,3}, M.A. YESSENOVA^{2,3}, V.N. GORCHAKOV⁴,
G.A. DEMCHENKO²

¹Kazakh scientific-research veterinary institute, Almaty, Kazakhstan

²Institute of Genetics and Physiology, Almaty, Kazakhstan

³Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

⁴Research Institute of clinical and experimental Lymphology – branch of Institute of
Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

*e-mail: snabdreshov@mail.ru

CHARACTERISTICS OF BACTERIAL MICROFLORA IN RATS WITH MASSIVE INFECTION OF THE ABDOMINAL CAVITY

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.11

Abstract

Isolation of pathogens of infectious diseases isolated from animals, their identification based on the study of biological properties, determination of antibiotic resistance is an urgent task. During of inflammation of the abdominal cavity on a biological system *in vivo*, cultures of microorganisms were isolated on laboratory rats killed for diagnostic purposes, and their sensitivity to antibiotics was studied. As a result of the studies, it was found that on the 2nd and 5th days after infection of rats with coprological exudate an inflammatory process developed in the abdominal cavity, characterized by a disorder of blood and lymph circulation in blood and lymphatic vessels, in capillaries and venules, edema, hemorrhages in internal organs and vessels, necrosis tissues (on the 5th day after infection). As a result of bacteriological examination of exudate from the abdominal cavity, exudate from the abdominal cavity and liver of experimental rats, pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms were isolated. Cultures were identified based on the study of cultural-morphological, tinctorial and biochemical properties. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from samples of biological material of rats. The sensitivity of isolated microorganisms to antibiotics was studied. Knowledge of the etiology of infectious inflammation of the abdominal cavity of rats, the effect on pathogens of antibiotics of various groups, the correct selection of the drug contribute to the elimination of infection in the shortest possible time.

Keywords: exudate, abdominal inflammation, modeling, antibiotic resistance, lymph nodes.

Infectious diseases cause enormous economic damage to livestock production and represent the most important veterinary and biomedical problem [1]. The fight against infectious diseases of animals and humans is an urgent problem. Bacterial infections continue to occupy one of the leading places in the infectious pathology of animals and humans [2,3]. The main reservoir of infectious agents in nature are mammals, birds, and rodents [4]. Recently, the role of bacteria carriers as the main sources of infection of animals and humans has increased [5]. High incidence, increasing prevalence of bacterial infections, polymorphism of clinical forms (latent and erased forms) of the disease, frequent cases of the formation of long-term and lifelong bacterial carriage contribute to the infection of animals and humans. The widespread prevalence of antibiotic-resistant pathogens that cannot be treated indicates the urgency of the problem [6]. Solving the issues of asymptomatic bacterial carriage is closely related to the persistence of infectious agents in the body of laboratory rats during experimental peritonitis [7]. For the first time, the microbial landscape in rats infected intraperitoneally with a suspension of feces was studied. Modeling of scatological peritonitis in rats was carried out, and the body's immune response was studied. During a bacteriological study of biomaterial from rats with experimental peritonitis, pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms were isolated. All experimental animals were clinically healthy. The sensitivity of isolated cultures of microorganisms to antibiotics of various

groups was studied. Irrational use of antibiotics, often using maximum doses, increasing the course of treatment and frequency of use of drugs without taking into account sustainability, as well as the pharmacokinetics of drugs, leads to the development of adverse reactions, the formation of drug sensitivity of pathogens and bacterial carriage.

The purpose: to study the bacterial microflora in rats with inflammation of the abdominal organs and against the background of antibiotic administration.

Materials and methods of research

Studies on creation of experimental peritonitis on biological system in vivo on laboratory rats were carried out. In accordance with the aim and objectives of the program 12 rats - Sprague Dawley (SD) line sexually mature males and weighing 270 ± 5 g were used in the experiments. The purpose of the work is experimental modeling of scatological inflammation of the abdominal stripe in rats, studying the body's immune response. For the experiment, 3 experimental and 1 control groups of animals were formed. There were 3 rats (male) in each group. 1st control group (3 heads) - uninfected animals that did not receive treatment; 2nd experimental group (3 heads) – rats infected with fecal suspension at a dose of 0.5 cm^3 intraperitoneally, killed 2 days after infection; 3rd experimental group (3 heads) - rats infected with fecal suspension at a dose of 0.5 cm^3 intraperitoneally were treated with the antibiotic ceftriaxone twice at a dose of 25 mg per 100 g of weight 12 hours after infection for the first time and a second time 24 hours after infection according to the instructions for use, killed 2 days after infection; 4th experimental group (3 heads) - rats infected with fecal suspension at a dose of 0.5 cm^3 intraperitoneally, killed 5 days after infection. The animals were kept in the vivarium on standard feeding and drinking regimen. Each experimental and control groups of animals were kept in a separate cage provided with individual drinker and feeding. During the experiment all rats received a complete balanced diet. Before the beginning of the experiment all rats of experimental and control groups were examined, weighed, and thermomatered.

Acute inflammation of the abdominal stripe in rats of the experimental groups was caused by intraperitoneal administration of a suspension of scatological material (feces) in a dose of 0.5 cm^3 10% suspension was prepared from fresh scatological material taken from rats in sterile boxing conditions in physiological solution. Animals of all experimental groups were injected intraperitoneally with 0.5 cm^3 of a 10% suspension of scatological material. The animals of the experimental and control groups were observed for 5 days. When slaughtering, samples of biological material were taken from rats in the experimental and control groups for bacteriological examination. Abdominal exudate, abdominal flush and a 20 g piece of liver were taken into sterile containers for microbiological analysis. Cultures from samples of biological material from rats onto nutrient media were carried out immediately after collection.

When performing the work, bacteriological, serological, and biochemical research methods were used. When setting up the experiment, the physiological characteristics of the animal's body were taken into account [8]. After slaughter, a pathological examination of the rat corpses was carried out [9]. Biomaterial sampling was carried out in accordance with the methodological recommendations for sampling [10].

The rat corpses were opened in sterile boxing conditions and collected pieces of liver, abdominal exudate, feces, etc. were placed in sterile Petri dishes. The liver at the puncture site was cauterized with a Pasteur pipette, tissue was collected into a Pasteur pipette and inoculated into test tubes with a nutrient medium. In sterile box conditions, a bacteriological study of biomaterial samples from slaughtered rats was carried out by seeding on liquid and solid nutrient media. The material was sown on solid and liquid nutrient media. Crops were done on MPB, MPA (Russia) and on special nutrient media (for cultivating intestinal bacteria on Endo medium, on Chromagard for cultivating coccal microflora, etc.). After 20 hours of cultivation at 37°C in a thermostat, the crops were examined visually, suspicious colonies were selected and smears were made. Bacteriological examination of biomaterial from rats was carried out in accordance with the "Guidelines for Bacteriological Diagnostics". Identification and taxonomic distribution of the

isolated crops were carried out in accordance with Bergey's identification guide [11]. The cultural and morphological properties of microorganisms were studied by inoculation on MPS, MPA (Russia) and differential diagnostic media. Microscopy was carried out on smears prepared from daily agar cultures, Gram-stained. The biochemical properties of microorganisms were studied by sowing isolated cultures on Hiss media with carbohydrates. The mobility of microbes was determined by growth on semi-solid agar [12].

To determine sensitivity to antibiotics, a daily broth culture of microorganisms that was not contaminated with foreign microflora was used. We used standard paper disks with antibiotics (2 mcg, 5×50 BioVitrum, Russia). The sensitivity of microorganism cultures isolated from animals was studied using the disk diffusion method in accordance with generally accepted methodological recommendations [13, 14]. 25 cm³ of MPA was sterilely poured into sterile Petri dishes with a diameter of 100 mm, culturing with test microorganisms (CFU 10⁶/mL). Before sowing, Petri dishes with agar were well dried in a thermostat for 48 hours. A bacterial suspension (a daily broth culture) in an amount of 0.1 cm³ was applied to the surface of the agar and evenly distributed with a spatula, after which discs soaked in various antibiotics were applied with sterile tweezers. In each cup, the effect of 7 antibiotics was tested. After application of the discs, the Petri dishes were incubated at a temperature of 37°C for 18-20 hours upside down. The results were assessed by the presence of zones of inhibited growth of microorganisms around the discs [15, 16, 17]. The absence of growth of the microorganism at a distance of more than 15 mm from the disk with the antibiotic indicated the sensitivity of the culture to this antibiotic. If the test microorganism developed in close proximity to the disk impregnated with the antibiotic, then this microorganism was assessed as resistant to the action of the antibiotic [18, 19]. The diameter of growth inhibition zones, taking into account the diameter of the disc itself, was measured with an accuracy of 1 mm. For quality control, test strains *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were used [20].

Results and discussion

The first clinical symptoms of the disease in animals of experimental groups 2 and 4 appeared on the second day after infection. The animals were lethargic, refused food, did not move, they were overcrowded, and there was slight swelling in the abdominal area. On clinical examination, rats in both groups exhibited anemia of visible mucous membranes. In animals of the 3rd experimental group, treated with the antibiotic ceftriaxone, 12 and 24 hours after infection, there were no clinical symptoms of the disease.

5 days after infection, the rats of the 4th experimental group were sacrificed. A pathological examination of rat carcasses was carried out. In rats of the 4th experimental group, pronounced pathological changes in the abdominal cavity were observed. Pathological changes were noted in the liver, spleen and intestines of rats in the form of hemorrhages and necrotic lesions. The internal organs were hyperemic, blood-filled and enlarged. Mesenteric lymphatics are enlarged, red, juicy. The abdominal cavity is enlarged and filled with milky, milky exudate with an unpleasant odor. The villi of the small intestine are enlarged, swollen, and filled with blood. Numerous erosions and necrotic lesions were observed on the mucous membrane of the small and large intestines. The liver is enlarged, yellow-red in color, filled with blood, with hemorrhages and dark foci of necrosis, clayey consistency. The gallbladder is enlarged and filled with bile. Exudate from the abdominal cavity was collected into sterile containers from killed rats, washing off a piece of liver from the abdominal cavity. As a result of the studies, it was established that on the 2nd and 5th days after infection of rats with coprological exudate in the abdominal cavity, acute inflammation of the abdominal cavity developed, in the form of peritonitis, which manifested itself as an inflammatory process characterized by a disorder of blood and lymph circulation in the blood and lymphatic vessels, in capillaries and venules, edema, hemorrhages in internal organs and vessels, tissue necrosis (5 days after infection). In experimental rats, there was a narrowing of the capillaries of the microcirculatory bed with emptying of the lumen of blood vessels, in which cellular elements of blood were found in small quantities. In the abdominal cavity there was a significant accumulation of serous and serous-purulent exudate, an inflammatory process and degenerative

changes were noted. The mucous membrane of the small intestine of rats showed severe swelling and pronounced inflammatory edema. The lymph nodes were enlarged. 5 days after infection, the rats showed dystrophic and degenerative changes in the abdominal organs. In experimental scatological peritonitis in animals of group 4, signs of diffuse fibrinous-purulent inflammation of the abdominal organs involving the deep layers of the peritoneum and underlying fatty and muscle tissues were found. The mucous membrane of the small intestine of rats showed severe swelling and pronounced inflammatory edema, enlargement of lymph nodes.

The results of the study showed that in the seeding from the flushing of the abdominal cavity, parenchymal organs, mesenteric lymph nodes from experimental rats 4, growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* was observed. In cultures from rats, growth of *P. aeruginosa* bacteria was observed. On MPA, *P. aeruginosa* grew in the form of convex small colonies with smooth blue-green edges. The MPB showed uniform turbidity. In Gram-stained smears, small gram-negative rods were observed, arranged in groups (clusters). In smears prepared from daily agar cultures and Gram stained, large gram-negative rods were noted, located singly in the smear, typical of *E.coli*. On MPA, *E.coli* grew as large, round, slimy, yellowish colonies

Thus, during the bacteriological study of biomaterial from rats of experimental groups 2 and 3 with experimental peritonitis and from rats of control group 1, no pathogenic microorganisms were sown.

From rats of the 4th experimental group, killed on the 5th day after infection, the causative agent of staphylococcal purulent infection *S.aureus* was isolated from all samples of biomaterial, presented in Figures 1,2.

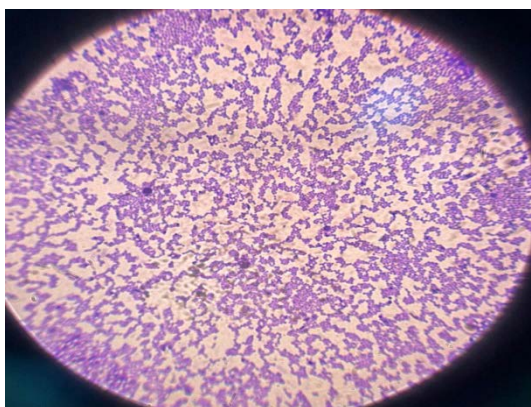


Figure 1 – *Staphylococcus aureus* in a Gram-stained smear (x1000)

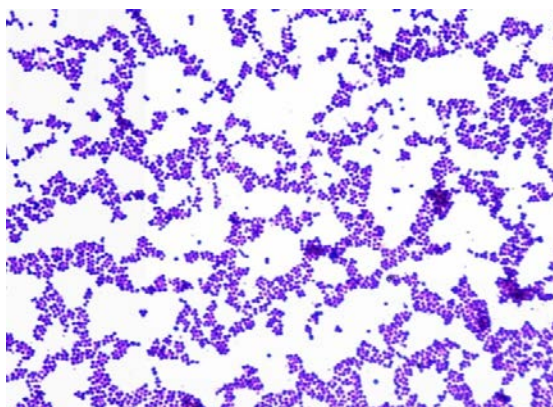


Figure 2 – *Staphylococcus aureus* in a Gram-stained smear (x1800)

Figures 1 and 2 show *Staphylococcus* isolated from biomaterial from rats of the 4th experimental group. The figures show gram-positive cocci of regular spherical shape, located in groups and clusters.

In seedings from all samples (exudate from the abdominal cavity, washings from the abdominal cavity, liver, spleen, heart, lung, kidney, large and small intestine) from 3 rats of the 4th experimental group, abundant growth of *P.aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) was observed. . Of all internal organ samples from rats of experimental group 4, growth of *P. aeruginosa* bacteria was noted. *P. aeruginosa* was cultured from parenchymal organs and mesenteric lymph nodes. Abundant growth of *P. aeruginosa* was observed in cultures from the mesenteric lymph nodes of rats, large and small intestines. *P. aeruginosa* was cultured from the liver and spleen of rats as moderate colony growth. *P. aeruginosa* was inoculated from the heart and kidney of rats in the form of single colonies. *P. aeruginosa* intensively disseminated not only in the intestine, but also in the parenchymal organs of infected rats. On the MPB, *P. aeruginosa* grew as a uniform turbidity, forming a film and turning the medium blue-green. *P. aeruginosa* isolated from rats is shown in Figure 3.

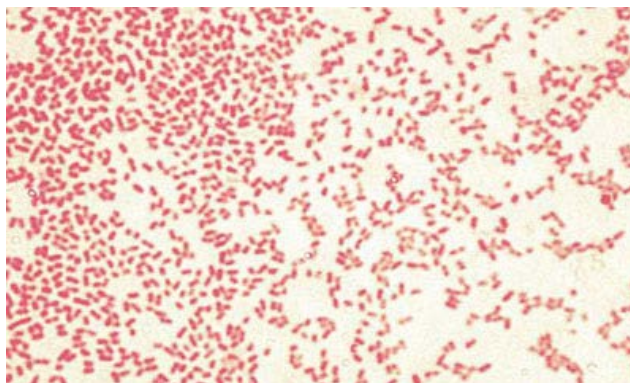


Figure 3 – *P. aeruginosa* in a Gram-stained smear (x1800)

Figure 3 shows straight, small gram-negative rods with rounded ends. No contamination with foreign microflora was noted. The figure shows that *Pseudomonas aeruginosa* has a straight or slightly curved rod-shaped shape. *P. aeruginosa* is an opportunistic microorganism. However, as a result of the widespread use of antibiotics for treatment and as a growth stimulator in animals, *P. aeruginosa* is the causative agent of various inflammatory processes, including generalized forms.

In seedings from all samples of biomaterial from 3 rats of the 4th experimental group, abundant growth of *E. coli* was observed. *E. coli* was abundantly cultured from all biomaterial samples. On the MPB, *Escherichia coli* grew in the form of intense turbidity with the formation of sediment and gas; on the MPB, round, shiny, convex colonies grew in an S-shape. *E. coli* was plated on Endo differential diagnostic medium for enterobacteria. Round, large, shiny colonies of bright crimson color grew on Endo medium.

Highest sensitivity *E. coli* isolated from rat feces was observed with fluoroquinolone antibiotics (norfloxacin, ofloxacin up to 34 mm), gentamicin (30 mm), tetracycline (25 mm), ceftriaxone (23 mm).

As a result of an experiment conducted on white laboratory rats, experimental peritonitis caused by the causative agent of purulent-septic infections *S.aureus* was caused. Purulent peritonitis in rats was complicated by conditionally pathogenic microorganisms - *Pseudomonas aeruginosa* *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* *E.coli*, isolated from biomaterial from rats as a result of bacteriological research

During a postmortem examination of rats, pathoanatomical and degenerative changes in the abdominal cavity were observed, characterized by the accumulation of serous-purulent exudate, dystrophic tissue degeneration, massive hemorrhages and foci of necrosis. As a result of a bacteriological study, the causative agent of purulent-septic infections *S. aureus*, *P.aeruginosa* and *E. coli* was isolated from all samples of biological material from rats of the 4th experimental group. In rats of the 3rd experimental group, twice treated with the antibiotic ceftriaxone in accordance with the instructions for use, no pathogenic microorganisms were found, which indicates the high therapeutic effectiveness of the antibiotic. Ceftriaxone is a third generation cephalosporin. *Cephalosporins* are a class of β -lactam antibiotics whose chemical structure is based on 7-*aminocephalosporanic acid* (7-ASA). The main features of cephalosporins compared to penicillins are their greater resistance to β -lactamase enzymes produced by microorganisms.

Fluoroquinolones are divided into first-generation and second-generation antibiotics. Of the fluoroquinolones, ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin are included in the list of vital and essential drugs. As a result of the experiment, it was established that the greatest sensitivity in experimental peritonitis in rats was observed with fluoroquinolone antibiotics, cephalosporins, aminoglycosides and tetracycline.

Conclusion

Based on the study of biological properties, the identification of isolated microorganisms was carried out. The cultures were identified on the basis of culture-morphological, tinctorial and biochemical properties. On the 5th day after infection in experimental rats purulent-necrotic peritonitis caused by *S. aureus*, complicated by conditionally pathogenic microorganisms *P. aeruginosa* and *E. coli* was observed. *E. coli* showed high sensitivity to tetracyclines. Antibiotics of tetracyclines group, which are widely used in clinic and veterinary medicine for the treatment of infections. *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* isolated from rat biomaterial showed sensitivity to aminoglycosides (gentamicin) and showed high sensitivity to fluoroquinolones, which are currently considered one of the most important groups of antibacterial drugs and were characterized by activity mainly against Gram-negative bacteria. Fluoroquinolones have activity against a wide range of pathogens causing infections of the abdominal cavity inflammation. High efficacy and good tolerability of fluoroquinolones in acute inflammatory processes was shown in comparative analyses of studies of antibacterial drugs of different groups.

References:

- 1 Adeyemi O. A., José A. RA, et al. Editorial: Alternative and complementary methods for the control of infectious diseases in animals. *Front. Vet. Sci., Sec. Veterinary Pharmacology and Toxicology*. 2022, 9: 1-3 (doi.org/10.3389/fvets.2022.1015253)
- 2 Delphine DG. Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, et al. The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front Vet Sci*. 2018, 5: 14 (doi: 10.3389/fvets.2018.00014)
- 3 Ayukekbong J.A., Ntemgwana M., Atabe A.N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrob. Resist. Infect. Cont.* 2017, 6:47 (doi: 10.1186/s13756-017-0208-x)
- 4 Barrett A. Vector and Rodent-borne Diseases in Europe and North America: Distribution, Public Health Burden and Control. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, 13(8): 1278 (doi:10.3201/eid1308.070626)
- 5 Eisen RJ., Ensore RE., Atiku LA., Zielinski-Gutierrez E., Mpanga JT., Kajik E, et al. Evidence that rodent control strategies ought to be improved to enhance food security and reduce the risk of rodent-borne illnesses within subsistence farming villages in the plague-endemic West Nile region, Uganda. *Int J Pest Manag.* 2013, 59(4): 259–270 (doi:10.1080/09670874.2013.845321)
- 6 Zhao Y., Yang QE., Zhou X., Wang FH., Muurinen J, Virta MP., et al. Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: status and solutions. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2021, 51: 2159–96 (doi:10.1080/10643389.2020.1777815)
- 7 Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, et al. The Peritoneum: Beyond the Tissue—A Review. *Front Physiol*. 2018, 9: 738 (doi:10.3389/fphys.2018.00738)
- 8 Monica L. Andersen, Lucile M.F. Winter Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *Biomedical Sciences An. Acad. Bras. Ciênc.* 2019, 91(1) (doi.org/10.1590/0001-3765201720170238)
- 9 Freires IA, Morelo DFC, Soares LFF, Costa IS, de Araújo LP, Bresghello I, Abdalla HB, Lazarini JG, Rosalen PL, Pigossi SC, Franchin M. Progress and promise of alternative animal and non-animal methods in biomedical research. *rch Toxicol*. 2023, 97(9): 2329-2342 (doi:10.1007/s00204-023-03532-1)
- 10 Prudnikov V.S., Zhukov A.I., German S.P., Anisim I.A. *Patologicheskaja anatomija sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh. Uchebnoe posobie / «Uchebnik.- Minsk: Informacionno-vychislitel'nyj centr Minfina*. 2010:1-351 (<https://elibrary.ru/item.asp?id=27391943>)
- 11 Hoult Dzh., Krig N., Snit P. *Opredelitel' bakterij Berdzhi / Mir. Moskva*. 1997. (https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_61284#1)
- 12 Don J. Brenner, Noel R. Krieg, George M. Garrity, David R. Boone (Vice Chairman), Paul Vos, Michael Goodfellow, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. / Springer, New York (NY)*. 2005. [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://voifidoctor2.files.wordpress.com/2013/03/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology-volume-ii-part-b.pdf>)
- 13 Bajmahanova G.B., Fajzulina Je.R., Tatarkina L.G., Spankulova G.A., Mombekova G.A., Bajmahanova B.B., Balgimbaeva A.S., Tleubekova D.A., Akylova M.A., Serikova A.H., Daurenbekova Sh.Zh., Doolotkel'dieva T.D., Trenozhnikova L.P. *Izuchenie antibakterial'nyh svojstv aktinomycetov iz*

jekstremal'nyh mestoobitanij Kazahstana. *Mikrobiologija i virusologija*. 2023, 3(42):193-210. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12)

14 Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016, 387: 176–187 (doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0)

15 Umiralieva Zh.Z., Dzhajmurzina A.A. Chuvstvitel'nost' vozbuditel'ja bakterial'nogo ozhoga bakterij *Erwinia amylovora* k antibiotikam. *Mikrobiologija i virusologija*. 2023, 2(41):220-228. (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.15)

16 Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*. 2019, 9:49. (doi: 10.3390/diagnostics9020049)

17 Syal K., Mo M., Yu H., Iriya R., Jing W., Guodong S., Wang S., Grys T.E., Haydel S.E., Tao N. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics*. 2017, 7:1795–1805. (doi:10.7150/thno.19217)

18 Gould IM., Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013;4(2):185–191. (doi: 10.4161/viru.22507)

19 Lee A.S., Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., Harbarth S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018, 4: 18033 (doi: 10.1038/nrdp.2018.33)

20 Aslanzadeh, J. Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Springer, Boston*. 2006: 84-116. (doi:10.1007/0-387-32892-06)

А.К. МУСАЕВА¹, С.Н. ӘБДІРЕШОВ^{2*}, Н.Н. ЕГОРОВА¹, А.Н. ЕШМУХАНБЕТ^{2,3},
М.А. ЕСЕНОВА^{2,3}, В.Н. ГОРЧАКОВ⁴, Г.А. ДЕМЧЕНКО²

¹Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринариялық институты, Алматы Қазақстан

²Генетика және физиология институты, Алматы Қазақстан

³Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы Қазақстан

⁴Клиникалық және эксперименттік лимфология ғылыми-зерттеу институты – РҒА СБ Цитология және генетика институтының филиалы, Новосибирск, Ресей Федерациясы

*e-mail: snabdreshov@mail.ru

ҚҰРСАҚ ҚУЫСЫНДА ИНФЕКЦИЯСЫ БАР ЕГЕУҚҰЙРЫҚТАРДЫҢ БАКТЕРИЯЛЫҚ МИКРОФЛОРАСЫНА СИПАТТАМА

Түйін

Жануарлардан бөлініп алынған жұқпалы аурулардың қоздырғыштарын оқшаулау, олардың биологиялық қасиеттерін зерттеу негізінде, антибиотикке төзімділіктілігін анықтау өзекті міндетердің бірі болып табылады. *In vivo* биологиялық жүйесіндегі іш қуысының қабынуы кезінде диагностикалық мақсатта өлтірілген зертханалық егеуқұйрықтарда микроорганизмдердің дақылдары оқшауланып, олардың антибиотиктерге сезімталдығы зерттелді. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде егеуқұйрықтарды іш қуысына копрологиялық экссудатпен жұқтырғаннан кейін 2-ші және 5-ші күні эксперименттік перитонит дамығаны анықталды, ол қан мен лимфа тамырларындағы, капиллярлар мен венулалардағы қан мен лимфа айналымының бұзылуымен, ұлпалардың ісінумен, ішкі мүшелер мен тамырлардағы геморрагиялармен, некрозбен сипатталатын қабыну процесінде көрінді (инфекциядан кейін 5 күн). Құрсақ қуысының экссудатын, құрсақ қуысының экссудатын және тәжірибелі егеуқұйрықтардың бауырын бактериологиялық зерттеу нәтижесінде патогендік және шартты патогендік микроорганизмдер бөлініп алынды. Дақылдарды культуралды-морфологиялық, тинкториалдық және биохимиялық қасиеттерін зерттеу негізінде анықталды. Егеуқұйрықтардың биологиялық материалының сынамаларынан *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* оқшауланған. Оқшауланған микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдығы зерттелді. Егеуқұйрықтардың жұқпалы іш қабынуының этиологиясын білу, әр түрлі топтағы антибиотиктердің қоздырғыштарына әсер ету, препаратты дұрыс таңдау инфекцияны қысқа мерзімде жоюға ықпал етеді.

Кілт сөздер: экссудат, құрсақ қуысының қабынуы, модельдеу, антибиотиктерге төзімділік, лимфа түйіндері.

MPHTI: 68.41.53

А.К. МУСАЕВА¹, С.Н. АБДРЕШОВ^{2*}, Н.Н. ЕГОРОВА¹, А.Н. ЕШМУХАНБЕТ^{2,3},
М.А. ЕСЕНОВА^{2,3}, В.Н. ГОРЧАКОВ⁴, Г.А. ДЕМЧЕНКО²

¹Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы, Казахстан

²Институт генетики и физиологии, Алматы, Казахстан

³Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан

⁴НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики, Новосибирск, Российская федерация

*e-mail: snabdreshov@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ У КРЫС ПРИ МАССИРОВАННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.11

Аннотация

Выделение возбудителей инфекционных заболеваний от животных, их идентификация на основе изучения биологических свойств, определение антибиотикорезистентности является актуальной задачей. В результате проведенных исследований установлено, что на 2-е и 5-е сутки после инфицирования крыс копрологическим экссудатом в брюшную полость развивался воспалительный процесс, характеризующийся расстройством крово- и лимфообращения в кровеносных и лимфатических сосудах, в капиллярах и венулах, отеком, гемorragиями во внутренних органах и сосудах, некрозом тканей (на 5 сутки после заражения). В результате бактериологического исследования экссудата из брюшной полости и печени опытных крыс были выделены патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Культуры идентифицировали на основе изучения культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств. Из проб биологического материала крыс выделены *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Изучена чувствительность выделенных микроорганизмов к антибиотикам. Знание этиологии инфекционного воспаления брюшной полости крыс, действие на возбудителей антибиотиков различных групп, правильный подбор препарата способствуют ликвидации инфекции в кратчайшие сроки.

Ключевые слова: экссудат, воспаление брюшной полости, моделирование, антибиотикорезистентность, лимфатические узлы.

Инфекционные болезни наносят огромный экономический ущерб животноводству и представляют важнейшую ветеринарную и медико-биологическую проблему [1]. Борьба с инфекционными болезнями животных и человека является актуальной проблемой. Бактериальные инфекции продолжают занимать одно из ведущих мест в инфекционной патологии животных и человека [2,3]. Основным резервуаром возбудителей инфекций в природе являются млекопитающие, птицы, грызуны [4]. В последнее время возросла роль бактерионосителей как основных источников заражения животных и человека [5]. Высокая заболеваемость, возрастающая распространенность бактериальных инфекций, полиморфизм клинических форм (латентные и стертые формы) болезни, частые случаи формирования длительного и пожизненного бактерионосительства способствуют заражению животных и человека. Широкое распространение антибиотикорезистентных возбудителей, не поддающихся лечению, свидетельствует об актуальности проблемы [6]. Решение вопросов бессимптомного бактерионосительства тесно связано с персистенцией возбудителей инфекций в организме лабораторных крыс при экспериментальном перитоните [7]. Впервые изучен микробный пейзаж у крыс, зараженных внутрибрюшинно взвесью фекалий. Проведено моделирование копрологического перитонита у крыс, изучен иммунный ответ организма. При бактериологическом исследовании биоматериала от крыс с экспериментальным перитонитом выделены патогенные и условно патогенные

микроорганизмы. Изучена чувствительность выделенных культур микроорганизмов к антибиотикам различных групп. Нерациональное применение антибиотиков зачастую с использованием максимальных доз, увеличение курса лечения и кратности применения препаратов без учета чувствительности, а также особенностей фармакокинетики лекарственных препаратов приводит к развитию побочных реакций, формированию лекарственной устойчивости возбудителей и бактерионосительства.

Цель исследования: изучить бактериальной микрофлоры у крыс при воспалении органов брюшной полости и на фоне введение антибиотика.

Материал и методы исследования

Проведены исследования по созданию экспериментального перитонита на биологической системе *in vivo* на лабораторных крысах. В соответствии с целью и задачами программы в экспериментах использовали 12 крыс- линии Sprague Dawley (SD) половозрелых самцах и весом 270 ± 5 г. Для эксперимента были сформированы 3 опытных и 1 контрольная группы животных. В каждой группе было по 3 крысы (самцы). 1-я контрольная группа (3 головы)- не инфицированные животные, не получавшие лечения; 2-я опытная группа (3 головы) – крысы, зараженные фекальной суспензией в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутрибрюшинно, убитые через 2-е суток после инфицирования; 3-я опытная группа (3 головы) - крысы, зараженные фекальной суспензией в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутрибрюшинно, получали лечение антибиотиком цефтриаксоном дважды в дозе 25 мг на 100 г веса через 12 часов после заражения первый раз и второй раз - через 24 часа после заражения согласно наставлению по применению, убитые через 2 суток после инфицирования; 4-я опытная группа (3 головы) - крысы, зараженные фекальной суспензией в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутрибрюшинно, убитые через 5 суток после инфицирования. Животные содержались в виварии на стандартном режиме кормления и поения. Каждая опытная и контрольная группы животных находились в отдельной клетке, обеспеченной индивидуальной поилкой и кормлением. В течение эксперимента все крысы получали полноценное сбалансированное питание. Перед началом эксперимента всех крыс опытных и контрольной групп осматривали, взвешивали, термометрировали.

Острое воспаление брюшной полости у крыс опытных групп вызывали путем внутрибрюшинного введения суспензии копрологического материала (фекалий) в дозе $0,5 \text{ см}^3$.10% суспензию готовили из свежего копрологического материала, отобранного от крыс, в стерильных условиях бокса на физиологическом растворе. Животным всех опытных групп вводили нутрибрюшинно $0,5 \text{ см}^3$ 10% суспензии копрологического материала. За животными опытных и контрольной групп вели наблюдение в течение 5 суток. У крыс опытных и контрольной групп при забое отбирали пробы биологического материала для бактериологического исследования. В стерильные контейнеры отбирали экссудат из брюшной полости, смыв из брюшной полости и кусочки печени весом 20 г для микробиологического анализа. Через 20 часов проводили визуальную оценку посевов из проб биоматериала от крыс.

При выполнении работы использовались бактериологические, серологические, биохимические методы исследований. При постановке опыта учитывали физиологические особенности организма животных [8]. После забоя проводили патологоанатомический осмотр трупов крыс [9]. Отбор проб биоматериала проводили в соответствии с методическими рекомендациями по отбору проб [10].

Крыс вскрывали в стерильных условиях бокса, отбирали в стерильные чашки Петри кусочки печени, брюшного экссудата, фекалий и др. Печень на месте прокола прижигали пастеровской пипеткой, набирали в пастеровскую пипетку ткань и засевали в пробирки с питательной средой. В стерильных условиях бокса проводили бактериологическое исследование проб биоматериала от забитых крыс путем высева на жидкие и плотные питательные среды. Посевы делали на МПБ, МПА (Россия) и на специальные питательные среды (для культивирования бактерий кишечной группы - на среде Эндо, на хромагар - для

культивирования кокковой микрофлоры и др.). Через 20 часов культивирования при +37°C в термостате посеvy просматривали визульно, отбирали нетипичные колонии и делали мазки. Бактериологическое исследование биоматериала от крыс проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике». Идентификацию и таксономическое распределение выделенных культур осуществляли в соответствии с определителем Берджи [11]. Культурально-морфологические свойства микроорганизмов изучали путем посева на МПБ, МПА, дифференциально-диагностические среды. Проводили микроскопию мазков, приготовленных из суточных агаровых культур, окрашенных по Граму. Биохимические свойства микроорганизмов изучали при посеve выделенных культур на среды Гисса с углеводами. Подвижность микробов определяли по росту на полужидком агаре [12]. Для определения чувствительности к антибиотикам использовали суточную бульонную культуру микроорганизмов, не контаминированную посторонней микрофлорой. В работе использовали стандартные бумажные диски с антибиотиками (2 мкг, 5×50 БиоВитрум, Россия). Чувствительность культур микроорганизмов, выделенных от животных, изучали диско-диффузным методом в соответствии с общепринятыми методическими рекомендациями [13, 14]. В стерильные чашки Петри диаметром 100 мм стерильно наливали по 25 см³ МПА, культивирование тест-микроорганизмов (КОЕ 10⁶/мл).

Перед посевом чашки Петри с агаром хорошо подсушивали в термостате в течение 48 часов. Бактериальную суспензию (суточную бульонную культуру) в количестве 0,1 см³ наносили на поверхность агара и равномерно распределяли шпателем, после чего стерильным пинцетом накладывали диски, пропитанные различными антибиотиками. В каждой чашке испытывали действие 7 антибиотиков. После аппликации дисков чашки Петри инкубировали при температуре 37°C в течение 18-20 часов кверху дном. Оценку результатов проводили по наличию зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков [15,17]. Отсутствие роста тест-организма на расстоянии более 15 мм от диска с антибиотиком указывало на чувствительность культуры к данному антибиотику. Если испытуемый микроорганизм развивался в непосредственной близости от диска, пропитанного антибиотиком, то данный микроорганизм оценивали, как устойчивый к его действию. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм [18,19]. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм. Для контроля качества использовали тест-штаммы *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [20].

Результаты и обсуждение

Первые клинические симптомы заболевания у животных 2-й и 4-й опытных групп появились на вторые сутки после инфицирования. Животные были вялыми, отказывались от корма, не двигались, наблюдалась их скученность, отмечался небольшой отек в области живота. При клиническом осмотре у крыс обеих групп наблюдалась анемия видимых слизистых оболочек. У животных 3-й опытной группы, леченных антибиотиком цефтриаксоном, через 12 и 24 часа после заражения, клинические симптомы заболевания отсутствовали.

Через 5 суток после заражения крысы 4-й опытной группы были забиты. Проводили патологоанатомический осмотр тушек крыс. У крыс 4-й опытной группы наблюдались выраженные патологоанатомические изменения в брюшной полости. Отмечались патологические изменения в печени, селезенке и кишечнике крыс в виде кровозлияний, некротических очажков. Внутренние органы были гиперемированы, кровенаполнены и увеличены. Брыжеечные лимфатические узлы увеличены и гиперемированы. Брюшная полость увеличена, заполнена мутным экссудатом молочного цвета с неприятным запахом. Ворсинки тонкого кишечника набухшие, кровенаполнены. Желчный пузырь расширен, заполнен желчью. В стерильные контейнеры от убитых крыс отбирали экссудат из брюшной полости, смыв из брюшной полости и кусочек печени. В результате проведенных

исследований установлено, что на 2-е и 5-е сутки после инфицирования крыс копрологическим экссудатом в брюшную полость развивалось острое воспаление брюшной полости в виде перитонита, который проявлялся расстройством крово- и лимфообращения в кровеносных и лимфатических сосудах, в капиллярах и венах, отеком, геморрагиями во внутренних органах и сосудах, некрозом тканей (на 5 сутки после заражения). У опытных крыс отмечалось сужение капилляров микроциркулирующего русла с запустеванием просвета сосудов, в которых в небольшом количестве обнаруживались клеточные элементы крови. В брюшной полости наблюдалось значительное скопление серозного и серозно-гнойного экссудата, отмечался воспалительный процесс и дистрофические изменения. На слизистой оболочке тонкого отдела кишечника крыс отмечалось сильное набухание и выраженный воспалительный отек, увеличение лимфатических узлов.

Результаты исследования показали, что в высевах из смыва брюшной полости, паренхиматозных органов, брыжеечных лимфатических узлов от крыс 4-й опытной группы отмечался рост синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* и кишечной палочки *Escherichia coli*. На МПА *P. aeruginosa* росли в виде выпуклых мелких колоний с ровным краями сине-зеленого цвета. На МПБ наблюдалось равномерное помутнение. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдались мелкие грамотрицательные палочки, расположенные группами (скоплениями). В мазках, приготовленных из суточных агаровых культур и окрашенных по Граму, отмечались крупные грамотрицательные палочки, располагающиеся в мазке одиночно, типичные для *E.coli*. На МПА *E.coli* росли в виде крупных круглых слизистых колоний желтоватого цвета.

Таким образом, при бактериологическом исследовании биоматериала от крыс 2-й и 3-й опытных групп с экспериментальным перитонитом и от крыс 1-й контрольной группы патогенные микроорганизмы не высевались. От крыс 4-й опытной группы, забитых на 5-е сутки после инфицирования, из всех проб биоматериала выделен возбудитель стафилококковой гнойной инфекции *S. aureus*, представленный на рисунках 1,2.

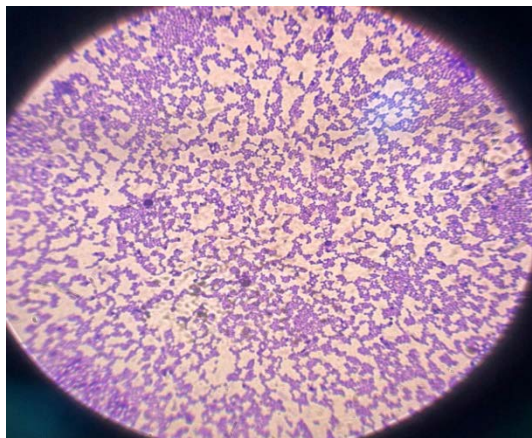


Рисунок 1 – *Staphylococcus aureus* в мазке, окрашенном по Граму (увл.1000х)

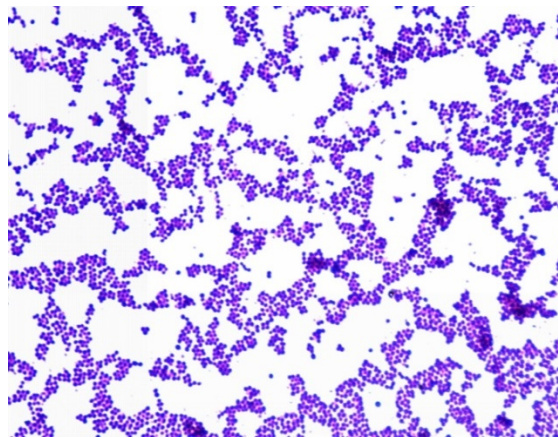


Рисунок 2 – *Staphylococcus aureus* в мазке, окрашенном по Граму (увл. 1800х)

На рисунках 1 и 2 показаны стафилококки, выделенные из биоматериала от крыс 4-й опытной группы. На рисунках видны грамположительные кокки правильной шарообразной формы, располагающиеся группами и скоплениями. Стафилококки обладают выраженной гемолитической и протеолитической способностью, что является их таксономическим признаком. Гемолитические свойства стафилококков, выделенных от крыс 4-й опытной группы, изучали путем посева суточной бульонной культуры на кровяной агар.

В высевах из всех проб (экссудат из брюшной полости, смыв из брюшной полости, печень, селезенка, сердце, легкое, почка, толстый и тонкий отделы кишечника) от 3-х крыс 4-й опытной группы наблюдался обильный рост *P.aeruginosa* (синегнойная палочка).

Обильный рост *P. aeruginosa* отмечался в высевах из брыжеечных лимфатических узлов крыс, толстого и тонкого отделов кишечника. *P.aeruginosa* высевалась из печени и селезенки крыс в виде умеренного роста колоний. Из сердца, почки крыс *P.aeruginosa* высевалась в виде единичных колоний. *P.aeruginosa* интенсивно диссеминировала не только в кишечнике, но и в паренхиматозных органах зараженных крыс. На МПБ *P. aeruginosa* росла в виде равномерного помутнения с образованием пленки и окрашиванием среды в сине-зеленый цвет. На МПА выростали мелкие круглые колонии, окрашенные в сине-зеленый цвет (характерное для синегнойной палочки пигментобразование). *P. aeruginosa*, выделенная от крыс, представлена на рисунке 3.

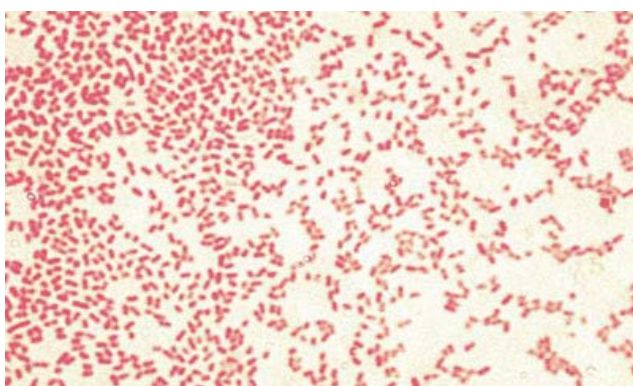


Рисунок 3 - *P. aeruginosa* в мазке, окрашенном по Граму (увл. 1800х)

На рисунке 3 видны прямые мелкие грамтрицательные палочки с закруглёнными концами. Контаминации посторонней микрофлорой не отмечалось. На рисунке показано, что синегнойная палочка имеет прямую или слегка изогнутую палочковидную форму. *P. aeruginosa* условно-патогенный микроорганизм. Однако в результате широкого применения антибиотиков для лечения и в качестве стимулятора роста у животных *P. aeruginosa* является возбудителем разнообразных воспалительных процессов, в том числе генерализованных форм.

Изучена чувствительность *P. aeruginosa* к антибиотикам различных групп. *P. aeruginosa* проявила высокую чувствительность к цефалоспорином - цефтриаксону (32 мм), к цефотаксиму (29 мм), к антибиотикам фторхинолонового ряда - офлоксацину, норфлоксацину (до 30 мм), к аминогликозидам - гентамицину (31 мм).

В высевах из всех проб биоматериала от 3-х крыс 4-й опытной группы наблюдался обильный рост *Escherichia coli*. На МПБ *E.coli* росла в виде интенсивного помутнения с образованием осадка и газа, на МПА выростали круглые блестящие выпуклые колонии в S-форме. *E.coli* высевали на дифференциально-диагностическую среду Эндо для энтеробактерий. На среде Эндо росли круглые крупные блестящие колонии яркомалинового цвета. Культуры, выделенные от крыс, не контаминированы посторонней микрофлорой. Наибольшая чувствительность *E. coli*, выделенной из фекалий крысы, отмечалась к антибиотикам фторхинолонового ряда (норфлоксацин, офлоксацину до 34 мм), гентамицину (30 мм), тетрациклину (25 мм), цефтриаксону (23 мм).

Таким образом, в результате опыта, проведенного на белых лабораторных крысах, вызван экспериментальный воспалительный процесс в виде перитонита, обусловленный возбудителем гнойно-септических инфекций *S.aureus*. Гнойный перитонит крыс осложнялся условно патогенными микроорганизмами – синегнойной палочкой *P. aeruginosa* и кишечной палочкой *E.coli*, выделенными из биоматериала от крыс в результате бактериологического исследования.

При патологоанатомическом осмотре у крыс наблюдались патологоанатомические и дегенеративные изменения в брюшной полости, характеризовавшиеся скоплением серозно-гнойного экссудата, дистрофическим перерождением ткани, массовыми геморрагиями и

очажками некроза. В результате бактериологического исследования из всех проб биологического материала от крыс 4-й опытной группы выделены возбудитель гнойно-септических инфекций *S.aureus*, а также *P.aeruginosa* и *E.coli*. У крыс 3-й опытной группы, которые получившие лечение антибиотиком цефтриаксоном в соответствии с наставлением по применению, патогенных микроорганизмов не обнаружено, что свидетельствует о высокой терапевтической эффективности антибиотика. Цефтриаксон относится к цефалоспорином III поколения. Цефалоспорины (*cephalosporins*) - класс β -лактаманых антибиотиков, в основе химической структуры которых лежит 7-аминоцефалоспороновая кислота (7-АЦК). Основными особенностями цефалоспоринов по сравнению с пенициллинами является их большая резистентность по отношению к β -лактамазам-ферментам, вырабатываемым микроорганизмами.

Фторхинолоны подразделяют на препараты первого поколения и второго поколения антибиотиков. Из препаратов группы фторхинолонов офлоксацин, ципрофлоксацин и моксифлоксацин входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. В результате проведенного эксперимента установлено, что наибольшая чувствительность при экспериментальном перитоните крыс отмечалась у антибиотиков фторхинолонового ряда, цефалоспоринов, аминоглизидов и тетрациклина.

Заключение

Культуры идентифицировали на основе изучения культурально-морфологических и биохимических свойств. На 5-е сутки после инфицирования у опытных крыс наблюдается гнойно-некротический перитонит, вызванный *S. aureus*, осложненный условно патогенными микроорганизмами *P. aeruginosa* и *E.coli*. *E. coli* проявила высокую чувствительность к тетрациклинам. Антибиотики группы тетрациклинов, широко применяются в клинике и ветеринарии для лечения инфекций.

S. aureus, *P. aeruginosa* и *E.coli*, выделенные из биоматериала от крыс, проявили чувствительность к аминогликозидам (гентамицину) и показали высокую чувствительность к фторхинолонам (англ. *fluoroquinolones*), которые на сегодняшний день рассматриваются как одна из важнейших групп антибактериальных препаратов и характеризуются активностью преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий. Фторхинолоны обладают активностью в отношении широкого спектра патогенов, вызывающих инфекции брюшной полости. Высокая эффективность и хорошая переносимость фторхинолонов при острых воспалительных процессах была показана в сравнительных анализах исследований антибактериальных препаратов разных групп.

Литература:

- 1 Adeyemi O. A., José A. RA, et al. Editorial: Alternative and complementary methods for the control of infectious diseases in animals. *Front. Vet. Sci., Sec. Veterinary Pharmacology and Toxicology*. 2022, 9: 1-3 (doi.org/10.3389/fvets.2022.1015253)
- 2 Delphine DG, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, et al. The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front Vet Sci*. 2018, 5: 14 (doi: 10.3389/fvets.2018.00014)
- 3 Ayukekbong J.A., Ntemgwa M., Atabe A.N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrob. Resist. Infect. Cont.* 2017, 6:47 (doi: 10.1186/s13756-017-0208-x)
- 4 Barrett A. Vector and Rodent-borne Diseases in Europe and North America: Distribution, Public Health Burden and Control. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, 13(8): 1278 (doi:10.3201/eid1308.070626)
- 5 Eisen RJ., Ensore RE., Atiku LA., Zielinski-Gutierrez E., Mpanga JT., Kajik E, et al. Evidence that rodent control strategies ought to be improved to enhance food security and reduce the risk of rodent-borne illnesses within subsistence farming villages in the plague-endemic West Nile region, Uganda. *Int J Pest Manag.* 2013, 59(4): 259–270 (doi:10.1080/09670874.2013.845321)

6 Zhao Y., Yang Q.E., Zhou X., Wang F.H., Muurinen J., Virta M.P., et al. Antibiotic resistance in the livestock and aquaculture industries: status and solutions. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2021, 51: 2159–96 (doi:10.1080/10643389.2020.1777815)

7 Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, et al. The Peritoneum: Beyond the Tissue—A Review. *Front Physiol.* 2018, 9: 738 (doi:10.3389/fphys.2018.00738)

8 Monica L. Andersen, Lucile M.F. Winter Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *Biomedical Sciences An. Acad. Bras. Ciênc.* 2019, 91(1) (doi.org/10.1590/0001-3765201720170238)

9 Freires IA, Morelo DFC, Soares LFF, Costa IS, de Araújo LP, Breseghello I, Abdalla HB, Lazarini JG, Rosalen PL, Pigossi SC, Franchin M. Progress and promise of alternative animal and non-animal methods in biomedical research. *Toxicol.* 2023, 97(9): 2329-2342 (doi:10.1007/s00204-023-03532-1)

10 Прудников В.С., Жуков А.И., Герман С.П., Анисим И.А. *Патологическая анатомия сельскохозяйственных животных. Учебное пособие.* «Учебник.- Минск: Информационно-вычислительный центр Минфина. 2010:1-351 (<https://elibrary.ru/item.asp?id=27391943>)

11 Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи / Мир. Москва. 1997. (https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_61284#1)

12 Don J. Brenner, Noel R. Krieg, George M. Garrity, David R. Boone (Vice Chairman), Paul Vos, Michael Goodfellow, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed.* / Springer, New York (NY). 2005. [Электрон. ресурс]. - URL: (<https://voifidoctor2.files.wordpress.com/2013/03/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology-volume-ii-part-b.pdf>)

13 Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А., Момбекова Г.А., Баймаханова Б.Б., Балгимбаева А.С., Глеубекова Д.А., Акылова М.А., Серикова А.Х., Дауренбекова Ш.Ж., Доолоткельдиева Т.Д., Треножникова Л.П. Изучение антибактериальных свойств актиномицетов из экстремальных местообитаний Казахстана. *Микробиология и вирусология.* 2023, 3(42):193-210. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12)

14 Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.* 2016, 387: 176–187 (doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0)

15 Умираниева Ж.З., Джаймурзина А.А. Чувствительность возбудителя бактериального ожога бактерий *Erwinia amylovora* к антибиотикам. *Микробиология и вирусология.* 2023, 2(41):220-228. (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.15)

16 Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics.* 2019, 9:49. (doi: 10.3390/diagnostics9020049)

17 Syal K., Mo M., Yu H., Iriya R., Jing W., Guodong S., Wang S., Grys T.E., Haydel S.E., Tao N. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics.* 2017, 7:1795–1805. (doi:10.7150/thno.19217)

18 Gould IM., Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence.* 2013;4(2):185–191. (doi: 10.4161/viru.22507)

19 Lee A.S., Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., Harbarth S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018, 4: 18033 (doi: 10.1038/nrdp.2018.33)

20 Aslanzadeh, J. Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Springer, Boston.* 2006: 84-116. (doi:10.1007/0-387-32892-06)