

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МАСТИТА У КОРОВ ПРИ МОНО- И МИКСТ-ИНФЕКЦИИ

THE STUDY OF MASTITIS CAUSATIVE AGENTS' ANTIBIOTIC RESISTANCE IN COWS WITH MONO- AND MIXED INFECTIONS

Матренов Илья Сергеевич,

ООО «Нита-Фарм», Росси, Саратов

E-mail: matrenov.is@yandex.ru

Инженер-микробиолог

Красникова Екатерина Сергеевна

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, Россия,

Саратов

E-mail: krasnikovaes@yandex.ru

Профессор кафедры микробиологии,

биотехнологии и химии, д.в.н., доцент

Павленко Вероника Вячеславовна

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, Россия,

Саратов

E-mail: shansik23@gmail.com

Студент С-ВТ 401

Matrenov Ilya Sergeevich

LLC "Nita-farm", Russia, Saratov

E-mail: matrenov.is@yandex.ru

Engineer-microbiologist

Krasnikova, Ekaterina Sergeevna

FSBEI HE "Saratov State Agrarian University",

Russia, Saratov

E-mail: krasnikovaes@yandex.ru

Professor of Department of Microbiology,

biotechnology and chemistry, Doctor of Veterinary

science, associate professor

Pavlenko Veronika Vyacheslavovna

FSBEI HE "Saratov State Agrarian University",

Russia, Saratov

E-mail: shansik23@gmail.com

4th year student

Аннотация. Маститы являются одной из главных причин снижения продуктивности коров и ухудшения санитарно-бактериологического качества молока. Необоснованное использование антибиотиков приводит к возникновению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов и ограничению использования продукции животноводства. Цель исследования - оценка антибиотикорезистентности бактериальных контаминантов, содержащихся в пробах молока, взятых от коров, больных маститом. В исследуемых пробах были выявлены штаммы *Staphylococcus aureus*, *Escherchia coli* и *Klebsiella oxytoca*, в формах моно- и микст-инфекции. Выделенные *E.coli* и *Klebsiella oxytoca* были резистентны к амоксициллина тригидрату, проявляли умеренную чувствительность к доксициклину и азитромицину, были чувствительны к цефтиофуру и флорфениколу. Причём, выделенные в ассоциации, данные микроорганизмы проявляли большую резистентность к препаратам, чем выделенные в форме моноинфекции. *St. Aureus*, выделенный в форме микст-инфекции с *Klebsiella oxytoca*, проявил чувствительность к всем использовавшимся антибактериальным препаратам.

Abstract. Mastitis is one of the main causes of decrease in cows' productivity and deterioration of sanitary and bacteriological quality of milk. The unjustified using of antibiotics leads to the emergence of antibiotic-resistant strains of microorganisms and the restriction of the livestock products using. The aim of the study was to assess the antibiotic resistance of milk bacterial contaminants in cows with mastitis. Strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherchia coli* and *Klebsiella oxytoca* were revealed in samples in the forms of mono-and mixed infection. Isolated *E. coli* and *Klebsiella oxytoca* were resistant to amoxicillin trihydrate, showed moderate sensitivity to doxycycline and azithromycin, were sensitive to ceftiofur and florfenicol. Moreover, isolated in the association, these microorganisms showed greater resistance to drugs than isolated in the form of mono-infection. *St. Aureus*, isolated in the form of mixed infection with *Klebsiella oxytoca*, showed sensitivity to all used antibacterial drugs.

Ключевые слова. мастит, антибиотикорезистентность, пенициллины, макролиды, тетрациклины, фениколы, цефалоспорины, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*.

Keywords. mastitis, antibiotic resistance, penicillins, macrolides, tetracyclines, phenicols, cephalosporins, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*.

Введение

Продуктивность коров и качество молока являются важными показателями для животноводческих хозяйств. Несмотря на широкое распространение ветеринарных препаратов, направленных на лечение маститов, мастит продолжает являться одной из главных причин снижения продуктивности коров и ухудшения санитарно-бактериологического качества молока. Молоко от больных коров теряет питательную ценность, а также может вызвать различные заболевания людей из-за обсемененности контаминантами – представителями условно-патогенной микрофлоры, возбудителями мастита бактериальной этиологии [7]

Бессистемное микробиологическое исследование молока от коров, заболевших маститом, приводит к хаотическому использованию антибиотических, в частности, противомикробных, препаратов. Такое использование приводит к изменению чувствительности микрофлоры к ним, появлению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов и ухудшению качества продукции, производимой животноводческой отраслью агропромышленного комплекса. Остатки используемых препаратов сохраняются в продукции до 30 суток, что также приводит к ограничению использования продукции [9].

Антибиотикорезистентность – это сохранение микроорганизмами способности к росту и размножению в присутствии концентрации антибактериальных препаратов, создаваемой при введении терапевтических доз препарата [2]. Резистентность к действию антибиотиков возникает в результате генетических изменений: изменения собственных генов, приобретения нового генетического материала, изменение уровня экспрессии собственных генов [8] Возникшая антибиотикорезистентность штаммов микроорганизмов в условиях воспроизведения клеточной культуры с применением антибиотикотерапии имеет предрасположенность к распространению в популяциях, и не ограничивается одним видом [5].

На данном этапе проблематика возникновения резистентности бактериальной биоты к противомикробным препаратам – всемирно признанная, о чем свидетельствует принятый на 68 Всемирной ассамблее здравоохранения Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. Он состоит из пяти стратегических целей, одной из которых является укрепление базы фактических данных путем усиления глобального эпиднадзора и научных исследований [3].

Материалы и методы исследования

Цель исследования. Целью нашего исследования является оценка антибиотикорезистентности бактериальных контаминантов, содержащихся в пробах молока, взятых от коров, больных маститом.

В соответствие с целью исследования был определен ряд задач:

- осуществить высеив проб молока на питательные среды;
- выделить изоляты – чистые культуры;
- идентифицировать выделенные изоляты;

- провести испытание выделенных культур на чувствительность к антибактериальным препаратам диск-диффузионным методом.

Материал и методы исследования. Отбор проб осуществлялся от 30 коров разных возрастных групп в стерильные пробирки. Для выделения чистых культур микроорганизмов свежее сырое молоко отсевали на мясопептонный агар (МПА) и кровяной агар (КА), для идентификации использовали наборы ПБДЭ и ПБДС (Диагностические системы, Россия). Определяли чувствительность полученных изолятов к пяти антимикробным препаратам диск-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [6]. Для тестирования чувствительности выделенных изолятов использовали стандартные диски с препаратами, содержащими в себе: амоксициллина тригидрат 20 мкг (группа пенициллинов), азитромицин 15 мкг (группа макролидов), доксициклин 30 мкг (группа тетрациклинов), флорфеникол 30 мкг (группа фениколов), цефтиофур 30 мкг (группа цефалоспоринов), производитель НИЦФ (Россия).

Основная часть. Результаты исследования.

Идентификация изолятов выявила следующие бактерии-контаминанты: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*.

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Диаметр зон задержки роста, М±m

Штамм /ассоциация (группа животных)	Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов, мм				
	Доксициклин	Цефтиофур	Флорфеникол	Амоксициллина тригидрат	Азитромицин
<i>E.coli</i>	24,47±2,01*	28,10±2,05**	40,07±3,93**	9,31±0,89	19,95±2,01*
<i>St.aureus</i>	26,37±2,61**	33,76±3,27**	27,12±2,69**	36,06±3,58**	26,45±2,61**
<i>Klebsiella oxytoca</i>	14,26±1,41	20,23±2,01*	26,88±2,67**	7,41±0,71	16,54±1,64
<i>E.coli</i> / в ассоциации с <i>Klebsiella oxytoca</i>	14,09±1,37	23,41±2,14*	22,21±2,16*	8,84±0,86	16,03±1,51
<i>Klebsiella oxytoca</i> / в ассоциации с <i>E.coli</i>	11,23±1,03	21,38±2,09*	23,01±2,26*	7,09±0,71	16,74±1,59
<i>St.aureus</i> / в ассоциации с <i>Klebsiella oxytoca</i> и <i>E.coli</i>	16,37±1,61*	13,76±1,27*	17,12±2,69*	26,06±2,58*	16,45±1,61*
<i>E.coli</i> / в ассоциации с <i>Klebsiella oxytoca</i> и <i>St.aureus</i>	13,31±1,27	22,90±2,21*	25,73±2,24**	8,98±0,88	17,01±1,67
<i>Klebsiella oxytoca</i> / в ассоциации с <i>E.coli</i> и <i>St.aureus</i>	12,98±1,25	21,11±2,09*	25,98±2,60**	8,41±0,83	16,28±1,61

Примечание: * - умеренная чувствительность к препарату;

** - высокая чувствительность к препарату.

Проведенное исследование показывает избирательную чувствительность выделенных биологических агентов условно-патогенной микрофлоры семейства Enterobacteriaceae. В рамках проводимого исследования не выявлен феномен сочетанной устойчивости к двум и более антибактериальным препаратам. В то же время, выявлен феномен усиления антибиотикорезистентности микрофлоры в результате ассоциации двух видов микроорганизмов, выделенных из одной пробы молока по сравнению с монокультурой из пробы. При этом исследования, проведенные в работе Н.Е. Горковенко и Ю.А. Макарова [4], показывают высокую чувствительность

изолятов бактерий рода *Esherichia*, *Enterobacter* к доксициклину, что не подтвердилось проведенными нами исследованиями – изоляты, выделенные из молока отдельно взятого хозяйства показывали промежуточную чувствительность к данному АМП, что может свидетельствовать о применении препаратов с доксициклином в данном хозяйстве ранее.

Анализ данных о резистентности изолятов бактерий, выделенных из молока коров отдельно взятого хозяйства, больных маститом, дает картину более полную, чем обобщенные литературные данные. Результаты конкретизированного исследования, локализованного в рамках одного хозяйства, позволяют сделать более точные выводы о состоянии потенциально патогенной и патогенной микрофлоры с учетом влияния на неё ранее применяемых антимикробных препаратов, идентифицировать возбудителей инфекции, провести анализ резистентности выделенной микрофлоры с учетом ситуативной бактериальной ассоциации, что, в свою очередь, дает возможность для проведения более эффективной антимикробной терапии.

Выводы.

1. Выделенные из большинства проб молока *E.coli* и *Klebsiella oxytoca* резистентны к амоксициллина тригидрату, проявляют умеренную чувствительность к доксициклину и азитромицину, чувствительны к цефтиофуру и флорфениколу.

2. Результаты сравнения размеров зон ингибирования показывают повышенную устойчивость штамма *E.coli* в ассоциации с *Klebsiella oxytoca*, по сравнению с монокультурой, в отношении исследуемых препаратов.

3. Выделенный из двух проб молока *St. aureus* проявил чувствительность к всем использовавшимся антибактериальным препаратам.

4. Выделенная из проб молока новотельных коров монокультура *E.coli* обладает наименьшей устойчивостью к воздействию использовавшихся в эксперименте антибактериальных препаратов.

5. Не зарегистрировано существенных различий в резистентности микрофлоры в различные периоды периода лактации коров.

Список источников

1. Абаимова А.Д. Резистентность организма коров и эффективность их лечения при мастите в лактационный период [Текст]: Автореф. Дис. Канд.вет.наук /А.Д.Абаимова.-М., 1999.-24 с.

2. Биологическая характеристика бактерий, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, при хронических заболеваниях / Е.В. Беляева и др. // Медицинский альманах. – 2009. - 2(7). - 114-117.

3. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам, 2001. – 168 с. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.who.int/drugresistance/surveillance/ru/>

4. Горковенко Н.Е. Антибиотикорезистентность энтеробактерий / Н.Е. Горковенко, Ю.А.Макаров // Бюллетень научных исследований. – 2008. - №14. С 56-60.

5. Динамический анализ особенностей структуры и антибиотикорезистентности микрофлоры многопрофильных лечебно-профилактических учреждений / Н.Н. Митрофанова, В.Л. Мельников, Е.Н. Миронова, Т.М. Ковешникова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2008. - № 4. – С. 3-10.

6. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200038583>.

7. Нежданов А.Г. Мастит и акушерская патология у коров /А.Г.Нежданов, В.Г. Зинкевич // Ветеринария.-1999.-№9. –С.36-39.

8. Применение полимеразной цепной реакции в молекулярной диагностике инфекционных болезней животных / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, О.В. Прасолова, М.В. Виноходова // Учебное пособие. - СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017. - 96 с.

9. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspective / P.Gruet [at all] // Advanced Drug Delivery Review.-2001.-Vol.50(1).-P.245-259.

References

1. Abaimova A.D. Resistance of the organism of cows and the effectiveness of their treatment during mastitis during the lactation period [Text]: Author's abstract. Dis. Candidate of Science / A.D. Abaimova.-M., 1999.-24 p.

2. Biological characteristics of bacteria colonizing the mucous membranes of the respiratory tract in chronic diseases / E.V. Belyaev and others. // Medical almanac. - 2009. - 2 (7). - 114-117.

3. WHO global strategy for containing antimicrobial resistance, 2001. - 168 p. [Electronic resource]. - URL: <http://www.who.int/drugresistance/surveillance/en/>

4. N.E. Gorkovenko Antibiotic resistance of enterobacteria / N.E. Gorkovenko, Yu.A. Makarov // Bulletin of scientific research. - 2008. - №14. From 56-60.

5. Dynamic analysis of the features of the structure and antibiotic resistance of microflora of multi-profile treatment-and-prophylactic institutions / N.N. Mitrofanova, V.L. Melnikov, E.N. Mironova, T.M. Koveshnikov // News of higher educational institutions. Volga region. Medical sciences. - 2008. - № 4. - p. 3-10.

6. МУК 4.2.1890-04 Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Methodical instructions. - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200038583>.

7. Nezhdanov A.G. Mastitis and obstetric pathology in cows / A.G.Nezhdanov, V.G. Zinkevich // Veterinary.-1999.-№9. -С.36-39.

8. The use of polymerase chain reaction in the molecular diagnosis of infectious animal diseases / А.А. Sukhinin, S.A. Makavchik, OV Prasolov, M.V. Vinokhodov // Study Guide. - SPb .: Publishing house of FSBEI HE SPBGAVM, 2017. - 96 p.

9. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspective / P.Gruet [at all] // Advanced Drug Delivery Review.-2001.-Vol.50 (1) .- P.245-259.