

УДК 579.62: 579.63

**ВИВЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ ІЗОЛЯТІВ
STAPHYLOCOCCUS SPP., ВИДІЛЕНИХ З ОБ'ЄКТІВ ДОВКІЛЛЯ
МОЛОЧНИХ ФЕРМ СУМСЬКОЇ ОБЛАСТІ**

Касянчук В.В. д.вет. н., професор

v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua

Бергілевич О.М., д.вет. н., професор

o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua

Сумський державний університет, м. Суми

Скляр О.І., д.вет. н., професор

Лоцкін І.М, аспірант

Сумський національний аграрний університет, м. Суми

***Анотація.** В статті наведено результати вивчення чутливості до антибіотиків ізолятів *Staphylococcus spp*, виділених з об'єктів довкілля молочних ферм Сумської області. Завданнями дослідження було провести порівняльне вивчення чутливості до 10 антибіотиків виділених ізолятів *Staphylococcus spp* та встановити відмінності у рівнях та профілях чутливості ізолятів в залежності від їх походження.*

*Необхідно зазначити, що усі досліджувані ізоляти *Staphylococcus spp* були не чутливими до пеніциліну, помірночутливими - до оксациліну, а деякі - до гентаміцину, еритроміцину, оксациліну та чутливими – рифампіцину, лінкоміцину, тетрацикліну, цефазоліну та амоксициліну. Доведено, що ізоляти *Staphylococcus spp*. виділені з різних об'єктів молочних ферм проявляли різну та множинну резистентність до досліджуваних антибіотиків.*

***Ключові слова:** чутливість до антибіотиків, ґрунт, гній, молочні ферми, антибіотики, *Staphylococcus spp*.*

Актуальність проблеми. Антибіотики зробили революцію в лікуванні інфекційних хвороб у людей. Однак їх широке і не завжди правильне застосування призвело до виникнення і розповсюдження стійкості до антибіотиків. Людство вперше зіштовхнулося з проблемою резистентності бактерій до антимікробних засобів практично одночасно з відкриттям самих антибіотиків. У перші роки після відкриття пеніциліну, близько 99% патогенних стафілококів були чутливі до цього антибіотика, а в 60-і рр.. до пеніциліну залишилися чутливі вже не більше 20-30% [2].

Одним із основних екологічних забруднювачів є діяльність тваринницьких ферм, результати якої вважаються не лише джерелом надходження різних хімічних забруднювачів в навколишнє середовище, а також сприяє поширенню та циркуляції мікроорганізмів, в тому числі патогенних, які в свою чергу можуть бути загрозою для здоров'я людини. Застосування антибіотиків у сільському господарстві – для лікування і профілактики хвороб або як стимуляторів росту для тварин – сприяє розвитку антибіотикорезистентності у мікроорганізмів і передачі генів резистентності через харчовий ланцюг (з сировиною чи продуктами тваринного походження) від сільськогосподарських тварин, об'єктів навколишнього середовища (вода, ґрунт) до людей [2 – 4].

До основних відходів тваринницьких ферм, що потенційно містять патогенні бактерії відносяться фекалії, сеча тварин, молоко маститних корів, гній, вода, яка використовується у технологічному процесі. У відходах тваринницьких ферм можуть бути патогенні стафілококи та стрептококи, кишкові палички, лістерії, кампілобактерії, ієрсинії, клостридії та ін. Патогенні мікроорганізми можуть із стоками потрапити до місцевого водопостачання під час дощів. Крім того, патогенні мікроорганізми з ґрунту з пилом та опадами забруднюють повітря і ґрунтові води. Крім того, використання антибіотиків у тваринництві сприяє потраплянню антибіотикостійких видів бактерій до сировини і харчових продуктів [3].

Негативний вплив від застосування антибіотиків у тваринництві та на здоров'я людини і навколишнє середовище викликає стурбованість у більшості

розвинених країн. У США, країнах ЄС, Канаді розроблені державні програми щодо вивчення антибіотикорезистентних мікроорганізмів доквілля агровиробництв та розробки відповідних попереджуючих заходів [2].

Вченими було доведено, що генетичні детермінанти стійкості в таких звичайних для організму тварин мікроорганізмів як кишкова паличка, ентерококи можуть бути передані шляхом обміну плазмід, через транспозони до патогенних мікроорганізмів, останні через повітря, воду та їжу потрапляють до організму людини та викликають захворювання у людей [2]. ВООЗ на основі наукових даних з вивчення цієї проблеми з метою охорони здоров'я і навколишнього середовища, були надані рекомендації для країн організувати дослідження щодо вивчення рівня чутливості до антибіотиків різних важливих для здоров'я людини мікроорганізмів та розповсюдження антибіотикорезистентних бактерій у доквіллі тваринницьких ферм та розробляти відповідні заходи. Тому, є необхідність у проведенні таких досліджень в Україні для розробки відповідних запобіжних заходів.

Метою роботи було вивчити чутливість до антибіотиків *Staphylococcus spp* та поширення антибіотикостійких штамів даних мікроорганізмів в об'єктах доквілля молочних ферм Сумської області.

Завданнями дослідження було:

1. Провести порівняльне вивчення чутливості до антибіотиків виділених ізолятів *Staphylococcus spp* з об'єктів молочних ферм (грунт, підстилка, гній).

2. Встановити відмінності у рівнях та профілях чутливості до антибіотиків виділених ізолятів в залежності від походження.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом слугували проби гною (15), ґрунту (20) з різних ділянок території молочних ферм, підстилки (8) з 3 молочних ферм Сумської області. Усього 43 проб. Були досліджені ізоляти *Staphylococcus spp*. Для бактеріологічних досліджень використовували рідкі та щільні поживні середовища. Для індикації мікроорганізмів використовували класичні лабораторні методи, а при їх ідентифікації дотримувалися

класифікації Берджі. Для визначення антибіотикочутливості використовували диско-дифузійний метод за МВ 9.9.5 - 143 - 2007 «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»[1].

При виборі антибіотиків для встановлення чутливості ізолятів *Staphylococcus spp.* звертали увагу на препарати які мають безпосередній вплив саме на ці мікроорганізми: бетта-лактами, макроліди, фторхінолони, аміноглікозиди і ванкомицин. Тобто на ті антибіотичні препарати, які мають природну активність проти зазначених мікроорганізмів, препарати, що використовуються в практиці при лікуванні тварин та на ті, які входять до складу кормів для тварин.

Вважається, що найбільш ефективними по відношенню до представників роду *Staphylococcus*, і зокрема *S. aureus* та коагулазонегативних стафілококів є бетта-лактамі антибіотики. Стійкість стафілококів до цих препаратів пов'язана або з продукцією бета-лактамаз, або з наявністю додаткового пеніцилінзв'язуючого білка (ПЗБ2а). Виявлення і диференціація цих двох механізмів резистентності дозволяє прогнозувати активність усіх бета-лактамічних антибіотиків без оцінки чутливості до кожного з цих препаратів. При цьому необхідно враховувати наступні закономірності:

- штами *Staphylococcus spp.*, які не мають механізмів резистентності, чутливі до всіх бета-лактамічних антибіотиків;

- бета-лактамази (пеніцилінази) *Staphylococcus spp.* здатні гідролізувати природні і напівсинтетичні пеніциліни, крім оксациліну і метициліну. Чутливість або резистентність до бензилпеніциліну є індикатором активності природних і напівсинтетичних пеніцилінів.

- інші бета-лактами з потенційною антистафілококовою активністю (антистафілококові пеніциліни, цефалоспорини I, II і IV поколінь) зберігають активність відносно бета-лактамазопродукуючих штамів;

- штами *Staphylococcus spp.*, які мають білок ПЗБ2а (метицилінорезистентні), клінічно стійкі до всіх бета-лактамічних антибіотиків. Маркером наявності ПЗБ2а є стійкість до оксациліну і метициліну.

Тому визначення чутливості *Staphylococcus spp.* до бета-лактамних антибіотиків повинне включати виконання двох тестів визначення чутливості: 1) до бензилпеніциліну або виявлення продукції бета-лактамаз (пеніциліназ) та 2) до оксациліну або виявлення ПЗБ2.

Вважається, що резистентні до оксациліну стафілококи є стійкими до усіх бетта-лактамних антибіотиків. Критерії оцінки резистентності *S. aureus* та коагулазонегативних стафілококів по відношенню до оксациліну різняться.

Тому, нами було вивчено чутливість до антибіотиків, які підлягають вивченню в першу чергу (пеніцилін, оксацилін, еритроміцин, ванкоміцин та гентаміцин) та додаткові (амоксицилін, тетрациклін, рифампіцин, лінкоміцин, цефазолін).

При аналізі антибіотикочутливості виділених штамів мікроорганізмів враховували оптимальні значення величини діаметру затримки росту, що характеризують рівні чутливості для кожного антибіотику, що наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Критерії інтерпретації результатів визначення чутливості до антибіотиків *Staphylococcus spp.* (граничні значення діаметрів зон пригнічення росту (мм))[1]

Антибіотики	Вміст антибіотика у диску	Діаметр зони затримки росту, мм		
		Резистентний	Помірний	Чутливий
Бета-лактами				
Пеніциліни				
Пеніцилін, ПЕН	10 Од	≤28	-	≥29
Амоксицилін, АМХ ¹⁰	10 мкг			≥20
Оксацилін, ОХ ¹	1 мкг			
<i>Staphylococcus aureus</i>		≤10	11-12	≥13
Коагулазонегативні стафілококи		≤17	-	≥18
Цефалоспоріни				
Цефазолін, CZ ³⁰	30 мкг			≥20
Аміноглікозиди				
Гентаміцин, GEN ¹⁰	10 мкг	≤12	13-14	≥15
Глікопептиди				
Ванкоміцин, VA ³⁰	30 мкг			≥15

Тетрацикліни				
Тетрациклін, ТЕ ³⁰	30 мкг	≤14	15-18	≥19
Лінкозаміди				
Лінкомицин L ¹⁵	15 мкг	≤17	16-20	≥21
Макроліди				
Еритроміцин E ¹⁵	13 мкг	≤17	16-23	≥21
Інші препарати				
Рифампіцин, РИФ	15 мкг	≤16	17-19	≥20

Результати дослідження. Нашим об'єктом досліджень були *Staphylococcus spp.*, відносно яких ми визначили чутливість до певного спектру антибіотиків. На рис 1 представлено результати досліджень антибіотикочутливості *Staphylococcus spp.* диско-дифузійним методом, виділених з підстилки одного із господарств.

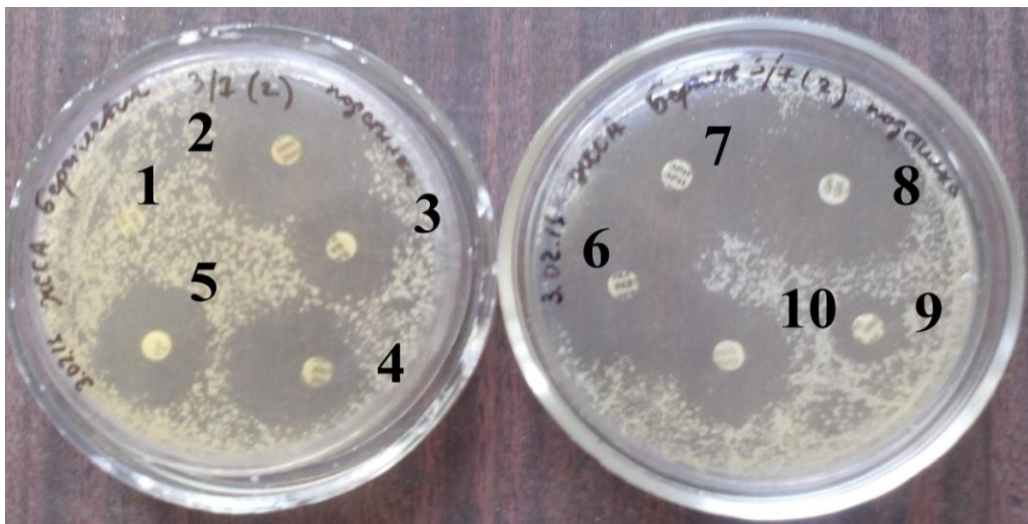


Рис. 1. Результати визначення чутливості до антибіотиків ізолятів *Staphylococcus spp.*, виділених з підстилки

Примітка. 1- пеніцилін, 2-рифампіцин, 3 – ванкомицин, 4-лінкомицин, 5- гентаміцин, 6-тетрациклін, 7- еритроміцин, 8 – цефазолін, 9 – оксацилін, 10 - амоксицилін

Узагальнені результати проведеної роботи наведено у таблиці 1.

На трьох різних фермах було досліджено 43 проб різних об'єктів та лише у 27 пробах було виділено *Staphylococcus spp.*

Таблиця 2

Результати визначення чутливості до антибіотиків *Staphylococcus spp.* в господарствах

Об'єкти досліджень	Кількість досліджуваних проб	Антибіотики									
		еритроміцин	ванкоміцин	лінкоміцин	тетрациклін	гентаміцин	оксацилін	амоксацилін	цефазолін	пеніцилін	рифиміцин
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Розміри діаметрів затримки росту мікроорганізмів, мм											
Ферма №1											
Гній з ферми	5	27±2,0	25±1,5	26±1,2	22±0,7	27±±0,8	35±0,5	33±1,3	30±1,1	8±0,2	30±1,5
Грунт біля корівника (5-10 м)	5	28±0,3	20±0,5	27±0,7	30±0,3	31±0,5	17±1,2	35±1,5	25±1,5	8±0,2	30±1,2
Грунт на відстані 40-50 м від корівника	4	28±1,3	30±1,5	33±0,5	37±0,6	29±±0,5	18±1,5	39±0,5	29±0,5	10±1,5	32±0,9
Грунт із пасовища	5	25±1,2	20±0,7	38±0,5	39±0,6	30±0,3	19±1,5	36±0,5	36±0,5	9±0,3	32±0,7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ферма №2											
Гній з ферми	5	14±0,7	21±0,9	20±0,9	25±0,7	16±0,9	38±1,3	25±1,5	9±1,1	25±1,2	27±0,5
Ґрунт біля корівника (5-10 м)	3	27±0,4	24±1,1	15±0,5	22±0,9	15±0,5	40±1,2	38±0,7	8±1,3	23±0,6	29±1,4
Ферма №3											
Гній з ферми	5	36±0,7	29±0,9	30±0,9	40±1,5	30±1,5	25±1,3	38±1,1	8±1,3	30±1,3	29±1,3
Ґрунт з території ферми	3	30±0,6	29±1,1	32±1,5	42±0,7	33±0,8	27±0,6	36±1,2	8±1,2	32±1,3	32±1,3
Підстилка	8	34±0,9	33±1,1	34±1,3	41±1,2	37±0,5	27±0,7	40±0,6	8±0,8	33±1,3	32±1,2

При чому найбільш часто цей мікроорганізм ми виділяли із проб гною з ферми та ґрунту, який був недалеко від ферми – на відстані до 10 м.

Виділені ізоляти *Staphylococcus spp* проявляли різну чутливість до досліджуваних антибіотиків, при чому *Staphylococcus spp* виділені із різних об'єктів до одного і того ж антибіотику мали різну стійкість. Так наприклад *Staphylococcus spp* виділені з ґрунту біля корівника ферми №1 були чутливими до більшості із досліджуваних антибіотиків (до 8 із 10 досліджуваних) та помірночутливими лише до оксациліну ($17 \pm 1,2$ мм) і зовсім не чутливими до пеніциліну ($8 \pm 0,2$ мм). Ізоляти *Staphylococcus spp*, які були виділені із гною ферми № 2 проявляли чутливість до 4 видів антибіотиків: ванкоміцину ($21 \pm 0,9$ мм), тетрацикліну ($25 \pm 0,7$ мм), амоксициліну ($25 \pm 1,5$), рифампіцину ($27 \pm 0,5$ мм).

Необхідно зазначити, що усі досліджувані штами були не чутливими до пеніциліну, оскільки зона затримки росту до цього антибіотику була найменшою серед усіх досліджуваних антибіотиків та у середньому її діаметр становив 8 ± 2 мм. Також помірночутливими усі досліджувані штами були до оксациліну, а деякі до гентаміцину, еритроміцину оксациліну.

Враховуючи оптимальні стандартні значення затримки росту за дії таких антибіотиків як пеніцилін (в усіх досліджуваних господарствах), гентаміцин, еритроміцин (ферма №2), ванкоміцин та оксациліну (ферма №2 та №3) можна заключити що вони також є малоефективними до виділених нами ізолятів *Staphylococcus spp*.

Висновки

1. В результаті проведеної роботи здійснено аналіз профілів резистентності виділених ізолятів *Staphylococcus spp* до ряду антибіотиків. Встановлено, що з таких об'єктів молочних ферм як гній, ґрунт та підстилка у 62,8% випадків були виділені *Staphylococcus spp*, які були не чутливими до пеніциліну, помірно чутливими до гентаміцину, еритроміцину, ванкоміцину та оксациліну. На підставі отриманих даних щодо антибіотикорезистентності місцевих штамів

визначено антибіотики, які можуть бути препаратами вибору при лікуванні тварин в кожному із конкретних господарств.

2. Отримані дані розширюють дані про біологічні характеристики бактерій роду *Staphylococcus* і зокрема щодо їх антибіотикорезистентності. Визначено, що ізоляти *Staphylococcus spp.* виділені з різних об'єктів молочних ферм проявляли різну антибіотикочутливість. Найбільш високу антибіотикочутливість проявляли ізоляти *Staphylococcus spp.*, що виділені ґрунту з територій досліджуваних ферм.

3. Створено лабораторну колекцію антибіотикорезистентних штамів, для встановлення генетичного підтвердження наявності генів, які відповідають за антибіотикорезистентність у даного виду мікроорганізмів.

4. Доведено множинну резистентність виділених мікроорганізмів, тому застосування антибіотиків в господарствах повинно базуватися та здійснюватися виключно на основі антибіотикограми.

Література

1. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів/ Методичні вказівки № 9.9.5 - 143 - 2007/Міністерство охорони здоров'я України, Державна санітарно-епідеміологічна служба, Кив. – 2007. 10с

2. Antibiotic resistance threats in the United States / Centers for Disease Control and Prevention, 2013. – 114p.

3. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle / Sawant AA, Hegde NV, Straley BA, Donaldson SC, Love BC, Knabel SJ, Jayarao BM /Appl. Environ. Microbiol. – №73. – 2007– P.56–163.

4. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. //Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G. / Science, – №337.– 2012. – P.1107–1111.

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ИЗОЛЯТОВ *STAPHYLOCOCCUS SPP.*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МОЛОЧНЫХ ФЕРМ СУМСКОЙ ОБЛАСТИ

Касянчук В.В. д.вет. н., профессор, v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua
Бергилевич А.Н., д.вет. н., профессор, o.bergylevyich@med.sumdu.edu.ua

Сумской государственной университет, г. Сумы

Скляр А.И., д.вет. н., профессор

Лоцкин И.Н., аспирант

Сумской национальной аграрный университет, г. Сумы

Аннотация. В статье приведены результаты изучения чувствительности к антибиотикам изолятов *Staphylococcus spp.*, выделенных из объектов окружающей среды молочных ферм Сумской области. Задачами исследования было провести сравнительное изучение чувствительности к 10 антибиотикам выделенных изолятов *Staphylococcus spp.* и установить различия в уровнях и профилях чувствительности изолятов в зависимости от их происхождения.

Необходимо отметить, что все исследуемые изоляты *Staphylococcus spp.* были не чувствительными к пенициллину, умеренночувствительными – к оксациллину, а некоторые - к гентамицину, эритромицину, оксациллину и чувствительными - к рифампицину, линкомицину, тетрациклину, цефазолину и амоксициллину. Доказано, что изоляты *Staphylococcus spp.* выделенные из различных объектов молочных ферм проявляли разную и множественную резистентность к рассматриваемым антибиотиков.

Ключевые слова: чувствительность к антибиотикам, почва, навоз, молочные фермы, антибиотики, *Staphylococcus spp.*

**STUDY OF SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS ISOLATES OF
STAPHYLOCOCCUS SPP. THAT WERE ISOLATED FROM
ENVIRONMENTAL FACILITIES OF DARY FARMS OF SUMY REGION**

Kasianchuk V. V., v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua

Berhilevych O. M., o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua

Sumy State University, Sumy

Sklar O.I., Lotskin I.M.,

Sumy National Agrarian University, Sumy

Summary. The negative impact of the use of antibiotics in animal and human health and the environment is a concern in most developed countries. In the US, the

EU, Canada developed national programs for the study of microorganisms resistant to antibiotics environmental agricultural production and the development of appropriate preventive measures. The results of the study of the sensitivity to antibiotics isolates of Staphylococcus spp, isolated from environmental objects of dairy farms of Sumy region. The samples of manure (15), ground (20) from different parts of the territory of dairy farms, bedding (8) from 3 dairy farms Sumy region. There were 43 samples. To determine the sensitivity to antibiotics was used disc-diffusion method The objectives of the study was to conduct a comparative study of the sensitivity to 10 antibiotics isolates Staphylococcus spp and set different levels of sensitivity and profiles of isolates according to their origin.

As a result of the analysis of the resistance profiles of selected isolates of Staphylococcus spp to several antibiotics. Found that objects such as dairy farms, manure, soil and litter in 62.8% of cases were identified Staphylococcus spp, which were not susceptible to penicillin, moderately susceptible to gentamicin, erythromycin, gentamicin, vancomycin and oxacillin. Based on data on antibiotic resistance strains identified local antibiotics, which may be the drugs of choice in the treatment of animals in each specific farms. These data expand the data on the biological characteristics of the bacteria Staphylococcus genus and particularly for their antibiotic resistance. Determined that isolates of Staphylococcus spp. isolated from different dairy farms showed objects of different antibiotics. Most isolates showed high sensitivity to antibiotics Staphylococcus spp, which are marked with soil areas investigated farms. It is proved that isolates of Staphylococcus spp. isolated from different sites of dairy farms showed different and multiple resistance to antibiotics. A collection of antibiotic-resistant strains of laboratory to establish a genetic confirmation of the genes responsible for antibiotic resistance in this type of microorganisms. Proved multiple resistant microorganisms selected because the use of antibiotics in farms and should be based solely on antibiotikogrammy.

Keywords: *antibiotic sensitivity, soil, manure, dairy farms, antibiotics, Staphylococcus spp.*