

Руденко П. А., кандидат ветеринарних наук
Луганський національний аграрний університет

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ДО АНТИМІКРОБНИХ ЗАСОБІВ ШТАМІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ ВІД КЛІНІЧНО ЗДОРОВИХ КОТІВ

Рецензент – доктор ветеринарних наук, професор В. Й. Іздеський

Доведено, що ізольовані культури виявили високу чутливість до антибіотиків групи β-лактамів (за винятком L. acidophilus №24, L. plantarum «Victoria» №22, L. rhamnosus №5, L. rhamnosus №20 і L. rhamnosus №26, які показали значну варіабельність чутливості до антибактеріальних препаратів наведеної групи, що свідчить про значний потенціал даних мікроорганізмів). Резистентність до аміноглікозидів, лінкозамидів і фторхінолонів (за винятком гатіфлоксацину, який показав високу ефективність по відношенню до всіх молочнокислих мікроорганізмів).

Ключові слова: антибіотики, молочнокислі бактерії, перспективні штами, коти.

Постановка проблеми. Порушення мікробіоценозів макроорганізму внаслідок широкого застосування антибіотиків спричинило появу у мікрофлори стійкості до них. Навіть раціональне застосування антибіотиків із дотриманням інструктивних даних щодо використання препарату створює надзвичайно важливу проблему: під дією пресингу антибіотиків у пацієнта змінюється якісний і кількісний склад його нормальної мікрофлори [1, 3, 4]. Особливо істотні зміни нормального біоценозу відбуваються в разі необґрунтованого, безконтрольного та тривалого застосування антибіотиків, а також за комбінованого лікування з використанням декількох препаратів [6, 9].

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Визначення чутливості до антибіотиків перспективних штамів молочнокислих бактерій – важлива передумова для їх затвердження в якості пробіотика. За одночасного призначення з антибіотиками пробіотичних засобів, вони повинні бути стійкими до окремих антибактеріальних препаратів, аби вижити в шлунково-кишковому тракті [5, 7, 10].

Метою нашої роботи стало з'ясування чутливості до ряду антибіотиків штамів біфідо- та лактобактерій, ізольованих з екологічних ніш організму клінічно здорових котів.

Завдання: провести визначення чутливості до антибіотиків групи β-лактамів; визначити резис-

тентність до аміноглікозидів, лінкозамидів і фторхінолонів.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для дослідження були 18 клінічно здорових котів, які знаходились у притулку для бездомних тварин ЗАТ «Ясинуватського машинобудівельного заводу» (м. Ясинувате Донецької області). Нами було віділено 37 (17,3 %) штамів молочнокислих мікроорганізмів від загальної кількості вилучених культур.

Визначення чутливості біфідо- та лактофлори до антимікробних засобів проводили методом серійних розведень у живильному агарі [2]. В якості тест-препаратів використовували антибіотики, що широко використовуються у хірургічній практиці. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) протимікробного засобу визначали за затримкою росту мікроорганізмів у порівнянні з контролем на чашці, що містила найменшу кількість даного препарату. Для порівняння ефективності антибактеріальних засобів робили розрахунок МІК₅₀ та МІК₉₀ за допомогою пробіт-аналізу [8].

Результати досліджень. Доведено, що ізольовані культури *B. bifidum* проявляли найбільшу чутливість до препаратів групи β-лактамів (пеніцилінів та цефалоспоринів). Так, ріст чотирьох (100,0 %) ізолятів *B. bifidum* концентрації бензилпеніциліну пригнічували у межах від 100 до 400; концентрації метіциліну – у межах від 62,5 до 500; концентрації амоксициліну – у межах від 12,5 до 25,0; концентрації цефазоліну – у межах від 12,5 до 50,0; концентрації цефтріаксону – у межах від 6,25 до 25,0; концентрації цефепіму пригнічували у межах від 1,56 до 3,12 мкг/мл.

Високу ступінь резистентності виділених культур *B. bifidum* нами відмічено у відношенні до препарату групи аміноглікозидів – гентаміцину. Так, дози гентаміцину в діапазоні від 1,56 до 25,0 мкг/мл не діяли на дослідні ізоляти біфідобактерій; 100,0 % штамів були резистентними до антибіотика. Проте концентрація препарату 50,0 мкг/мл пригнічувала ріст однієї (25,0 %), концентрація 100,0 мкг/мл – двох (50,0 %), а концентрація 200,0 мкг/мл – трьох

(75,0 %) дослідних культур *B. bifidum*. До того ж МІК₅₀ гентаміцину до ізолятів *B. bifidum* становила 100,0, а МІК₉₀ – 373,22 мкг/мл.

Неоднорідну чутливість у виділених культур *B. bifidum* нами відмічено стосовно до антибіотика групи лінкозамидів – лінкоміцину. Так, дози препарату в діапазоні від 1,56 до 6,25 мкг/мл не діяли на дослідні штами, концентрація лінкоміцину 12,5 мкг/мл пригнічувала ріст однієї (25,0 %), концентрація 50,0 мкг/мл пригнічувала ріст двох (50,0 %) і лише найбільше розведення антибіотика 100,0 мкг/мл пригнічувала ріст всіх чотирьох ізольованих культур біфідобактерій. До того ж МІК₅₀ лінкоміцину до ізолятів *B. bifidum* становила 60,99, а МІК₉₀ – 786,22 мкг/мл.

Слід зауважити, що стійкою резистентністю дослідні штами *B. bifidum* володіли по відношенню до антимікробного засобу із групи фторированих хінолонів – енрофлоксацину. Так, концентрація препарату 6,25 мкг/мл пригнічувала ріст однієї (25,0 %), концентрація енрофлоксацину 12,5 та 25,0 мкг/мл пригнічувала ріст двох (50,0 %), а до найменшого його розведення 50,0 мкг/мл чутливість проявляли три (75,0 %) дослідні культури біфідобактерій. Проте ні один зі штамів *B. bifidum* не проявив стійкості до гатіфлоксацину – представника нового покоління фторхінолонів з антианеробними властивостями (МІК₅₀ дорівнювало 0,12, а МІК₉₀ – 0,47 мкг/мл).

Виділені нами від клінічно здорових котів штами *B. adolescentis* також проявляли найбільшу чутливість до антибіотиків групи β-лактамів. Так, концентрації бензилпеніциліну – від 200 до 400,0; амоксициліну – від 12,5 до 25,0; метіциліну – від 125,0 до 500,0; цефазоліну – від 12,5 до 50,0; цефтріаксону – від 6,25 до 25,0; цефепіму – від 1,56 до 3,12 мкг/мл пригнічували ріст трьох (100,0 %) дослідних культур біфідобактерій. Встановлено, що до дослідних ізолятів *B. adolescentis* гатіфлоксацин виявився також високоактивним засобом, МІК₅₀ препарату становила 0,19, а МІК₉₀ – 1,57 мкг/мл.

Необхідно зазначити, що неоднорідну чутливість ізоляти *B. adolescentis* проявляли до гентаміцину: всі дослідні штами були резистентними за концентрацій антибіотика в діапазоні від 1,56 до 12,5 мкг/мл, 2 (66,6 %) ізоляти були стійкими за розведення препарату 25,0 і 50,0 мкг/мл і лише в мінімальному розведенні гентаміцину 200,0 мкг/мл усі три виділені культури *B. adolescentis* були до нього чутливі. МІК₅₀ гентаміцину дорівнювала 63,19, а МІК₉₀ – 492,38 мкг/мл.

Високу ступінь резистентності ізоляти *B. adolescentis* проявляли стосовно лінкоміцину: концен-

трації антибіотика від 1,56 до 6,25 мкг/мл не діяли на дослідні штами, за розведень препарату 12,5 і 25,0 мкг/мл чутливість реєстрували в однієї (33,3 %) дослідної культури, а максимальні концентрації лінкоміцину 50,0 і 100,0 мкг/мл були активні по відношенню до двох (66,6 %) ізольованих культур біфідобактерій. До того ж МІК₅₀ антибіотика становила 35,35, а МІК₉₀ – 459,68 мкг/мл.

Нами встановлена також висока стійкість дослідних сапрофітних мікроорганізмів до енрофлоксацину: за максимальних розведень препарату від 0,78 до 6,25 мкг/мл ми реєстрували резистентність у трьох (100,0 %) дослідних штамів; за розведення 12,5 мкг/мл стійкістю до енрофлоксацину володіли дві (66,6 %) культури *B. adolescentis*, а за максимальних його концентрацій 25,0 і 50,0 мкг/мл нами виявлена чутливість у двох (66,6 %) культур біфідобактерій – МІК₅₀ енрофлоксацина становила 19,77, а МІК₉₀ – 154,27 мкг/мл.

Дослідні штами лактобактерій проявляють неоднорідну чутливість до антибіотиків групи β-лактамів. Так, ізоляти *L. acidophilus* виявилися чутливими до бензилпеніциліну (МІК₅₀ становила 31,89, а МІК₉₀ – 133,26 мкг/мл), метіциліну (МІК₅₀ дорівнювала 39,86, а МІК₉₀ – 166,64 мкг/мл), амоксициліну (МІК₅₀ 1,99, а МІК₉₀ – 8,31 мкг/мл), а також до цефепіму (МІК₅₀ препарату була 0,26, а МІК₉₀ – 1,29 мкг/мл). Проте до антибіотиків цефалоспоринового ряду I і III поколінь цефазоліну та цефтріаксону відповідно ізольовані штами лактобактерій були резистентними. Так, навіть за максимальних концентрацій цефазоліну 25,0–50,0 і цефтріаксону 12,5–25,0 мкг/мл один (9,1 %) штам лактобактерій, а саме *L. acidophilus* №24, був стійким; МІК₅₀ цефазоліну становила 12,60, а МІК₉₀ – 35,50 мкг/мл; МІК₅₀ цефтріаксону дорівнювала 2,54, а МІК₉₀ – 18,86 мкг/мл.

Зауважимо, що нами відмічено також високу ступінь резистентності у дослідних культур лактобактерій до гентаміцину, лінкоміцину та енрофлоксацину. Так, 100,0 % дослідних штамів *L. acidophilus* були резистентними за концентрацій гентаміцину в діапазоні від 1,56 до 12,5 мкг/мл, 9 (81,8 %) ізолятів були стійкими за розведення препарату 25,0 мкг/мл, 8 (72,7 %) мікроорганізмів проявляли резистентність до антибіотика при його розведенні 50,0 мкг/мл. Навіть за мінімального розведення гентаміцину 200,0 мкг/мл лише 6 (54,5 %) ізолятів *L. acidophilus* були чутливими до препарату. Концентрації лінкоміцину від 1,56 до 3,12 мкг/мл не діяли на дослідні штами; за розведень препарату 6,25 мкг/мл чутливість реєстрували у 4 (36,4 %) виділених культур лактобактерій; за розведення 12,5 мкг/мл чутли-

вими були 6 (54,5 %) ізолятів; за розведення 25,0 і 50,0 мкг/мл нами зареєстрований один (9,1 %) штам лактобактерій, а саме *L. acidophilus* №24, який був резистентним до препарату; лише за максимальної його концентрації 100,0 мкг/мл антибіотик проявляв ефективність до 100,0 % дослідних бактерій. Встановлено, що за максимальних розведень енрофлоксацину в діапазоні 0,78–3,12 мкг/мл усі 11 (100,0 %) ізолятів проявляли стійкість до препарату, навіть за мінімальних розведень антибіотика 25,0 і 50,0 мкг/мл 7 (63,6 %) виділених культур *L. acidophilus* залишилися резистентними до нього. При цьому МІК₅₀ гентаміцину була 147,50, а МІК₉₀ – 1796,29 мкг/мл; МІК₅₀ лінкоміцину дорівнювала 9,32, а МІК₉₀ – 36,67 мкг/мл; МІК₅₀ енрофлоксацину становила 78,50, а МІК₉₀ – 1100,19 мкг/мл.

Зазначимо, що до гатіфлоксацину, представника нового покоління фторированих хінолонів, ізольовані нами штами *L. acidophilus* проявляли чутливість. При цьому МІК₅₀ гатіфлоксацину дорівнювала 0,20, а МІК₉₀ – 0,46 мкг/мл.

Ізольовані штами *L. plantarum* проявляли неоднорідну чутливість до пеніцилінів. Так, дослідні культури були чутливі до метіциліну – концентрації антибіотика в діапазоні від 125,0 до 500,0 мкг/мл затримували ріст дев'яти (100,0 %) виділених бактерій. До бензилпеніциліну в концентрації 200,0 мкг/мл залишився стійким один (11,1 %) штам лактобактерій, а саме *L. plantarum* «Victoria» №22, проте за найбільшого розведення антибіотика 400,0 мкг/мл всі 9 (100,0 %) дослідних ізолятів були до нього чутливими. До амоксициліну, навіть у його максимальній концентрації 25,0 мкг/мл, встановлена стійкість у одного (11,1 %) ізоляту, а саме у *L. plantarum* «Victoria» №22.

Нами також встановлено неоднорідну чутливість у дослідних культур лактобактерій до цефалоспоринов. Так, концентрації цефазоліну в діапазоні від 0,78 до 3,12 мкг/мл не діяли на всі ізольовані штами; за розведення препарату 6,25 мкг/мл стійкість виявлена у 7 (77,8 %) культур лактобактерій; за концентрації антибіотика 12,5 мкг/мл чутливими до нього були 5 (55,5 %) ізолятів; за його розведення 25,0 мкг/мл чутливість виявлена у шести (66,7 %) мікроорганізмів; навіть у максимальній його концентрації 50,0 мкг/мл виявлена резистентність до цефазоліну у однієї (11,1 %) виділеної культури *L. plantarum*, а саме у *L. plantarum* «Victoria» №22. Необхідно відмітити, що штам *L. plantarum* «Victoria» №22 проявляв стійкість до цефтріаксону і цефепіму у концентраціях 12,5 і

1,56 мкг/мл відповідно. Проте найменші розведення цефтріаксону 25,0 і цефепіму 3,12 мкг/мл затримували ріст усіх дев'яти (100,0 %) ізолятів лактобактерій. При цьому МІК₅₀ цефазоліну становила 13,9, а МІК₉₀ – 55,84 мкг/мл; МІК₅₀ цефтріаксону дорівнювала 5,46, а МІК₉₀ – 13,45 мкг/мл; МІК₅₀ цефепіму складала 0,68, а МІК₉₀ – 1,67 мкг/мл.

Доведено, що у дослідних культур *L. plantarum* спостерігається резистентність до лінкоміцину: навіть за максимальних концентрацій антибіотика 50,0 і 100,0 мкг/мл нами виявлена стійкість у одного (11,1 %) ізоляту, а саме у *L. plantarum* «Victoria» №22. При цьому МІК₅₀ лінкоміцину становила 13,79, а МІК₉₀ – 67,54 мкг/мл. Нами встановлена також висока ступінь резистентності у дослідних ізолятів лактобактерій до гентаміцину та енрофлоксацину. Так, концентрації гентаміцину в діапазоні від 1,56 до 12,5 мкг/мл не затримували ріст дев'яти (100,0 %) ізольованих культур мікроорганізмів; за розведення 25,0 мкг/мл – спостерігали стійкість у восьми (88,9 %) штамів; за концентрації 50,0 і 100,0 мкг/мл чутливість спостерігали у чотирьох (44,4 %) ізолятів; навіть за мінімального розведення антибіотика 200,0 мкг/мл нами виявлена резистентність у чотирьох (44,4 %) виділених культур *L. plantarum*. Максимальні концентрації енрофлоксацину 25,0 і 50,0 мкг/мл затримували ріст п'яти (55,5 %) ізольованих штамів мікроорганізмів. При цьому МІК₅₀ гентаміцину становила 126,15, а МІК₉₀ – 1383,31 мкг/мл; МІК₅₀ енрофлоксацину дорівнювала 54,87, а МІК₉₀ – 1048,11 мкг/мл. Необхідно звернути увагу й на те, що нами встановлена висока чутливість у ізолятів *L. plantarum* до гатіфлоксацину: МІК₅₀ гатіфлоксацину дорівнювала 0,13, а МІК₉₀ – 0,35 мкг/мл. Усі ізоляти *L. rhamnosus* були чутливими до бензилпеніциліну (МІК₅₀ антибіотика дорівнювала 55,3, а МІК₉₀ – 204,77 мкг/мл), цефтріаксону (МІК₅₀ препарату складала 3,12, а МІК₉₀ – 8,98 мкг/мл) і гатіфлоксацину (МІК₅₀ фторхінолону дорівнювала 0,24, а МІК₉₀ – 0,73 мкг/мл). Неоднорідну чутливість ізольовані штами лактобактерій проявляли до цефепіму. Так, концентрації цефепіму в діапазоні від 0,04 до 0,18 мкг/мл не затримували ріст усіх десяти ізольованих культур бактерій; за розведення 0,39 мкг/мл ми спостерігали чутливість у трьох (30,0 %) ізолятів; за концентрації 0,78 мкг/мл чутливість спостерігали у семи (70,0 %) виділених мікроорганізмів; за концентрації 1,56 мкг/мл встановлена стійкість до антибіотика лише у одного (10,0 %) штаму, а саме у *L. rhamnosus* №26; однак усі 10 (100,0 %) дослідних лактобактерій були чутливими до цефалоспорину IV покоління за його мінімального розведення 3,12 мкг/мл. При цьому МІК₅₀

цефепіму складала 0,56, а МІК₉₀ – 1,47 мкг/мл.

Встановлено, що у дослідних ізолятів *L. rhamnosus* існує стійкість до цефазоліну: навіть за максимальної концентрації антибіотика 50,0 мкг/мл ми спостерігали резистентність до нього у двох (20,0 %) ізольованих штамів, а саме у *L. rhamnosus* №5 і *L. rhamnosus* №26. При цьому МІК₅₀ цефазоліну дорівнювала 14,75, а МІК₉₀ – 72,47 мкг/мл. Окрім того, резистентність у лактобактерій зареєстровано і до амоксициліну. Так, за мінімальних розведень антибіотика 12,5 і 25,0 мкг/мл стійкість спостерігали також у двох (20,0 %) дослідних ізолятів, а саме у *L. rhamnosus* №20 і *L. rhamnosus* №26. При цьому МІК₅₀ амоксициліну складала 6,80, а МІК₉₀ – 30,26 мкг/мл. Високу ступінь резистентності ми реєстрували у дослідних штамів мікроорганізмів також до метіциліну, гентаміцину, лінкоміцину та енрофлоксацину. Навіть за максимальних концентрацій метіциліну 250,0 і 500,0 мкг/мл стійкістю до нього володіли три (30,0 %) штами, а саме *L. rhamnosus* №5, *L. rhamnosus* №20 і *L. rhamnosus* №26. При цьому МІК₅₀ метіциліну дорівнювала 139,47, а МІК₉₀ – 1455,76 мкг/мл. За мінімального розведення гентаміцину 200,0 мкг/мл лише 5 (50,0 %) дослідних культур лактобактерій були чутливими до препарату. При цьому МІК₅₀ гентаміцину складала 179,89, а МІК₉₀ – 1372,70 мкг/мл. За максимальних концентрацій лінкоміцину

50,0 і 100,0 мкг/мл стійкість зареєстровано у шести (60,0 %) ізольованих культур *L. rhamnosus*. При цьому МІК₅₀ лінкоміцину дорівнювала 179,89, а МІК₉₀ – 1372,70 мкг/мл. Максимальна концентрація енрофлоксацину 50,0 мкг/мл також не діяла на шість (60,0 %) ізолятів дослідних мікроорганізмів. При цьому МІК₅₀ енрофлоксацину складала 89,71, а МІК₉₀ – 1867,97 мкг/мл.

Висновки: 1. Ізольовані нами культури біфідо- і лактобактерій виявили високу чутливість до антибіотиків групи β-лактамів (за винятком *L. acidophilus* №24, *L. plantarum* «Victoria» №22, *L. rhamnosus* №5, *L. rhamnosus* №20 і *L. rhamnosus* №26, які показали значну варіабельність чутливості до антибактеріальних препаратів даної групи, що свідчить про значний потенціал цих мікроорганізмів), резистентність до аміноглікозидів, лінкозамидів і фторхінолонів (за винятком гатіфлоксацину, що показав високу ефективність по відношенню до всіх молочнокислих мікроорганізмів).

2. Отримані відмінності в антибіотикорезистентності перспективних штамів лактобактерій доводять перевагу створення комплексних пробіотичних препаратів.

У наступних дослідженнях необхідно встановити адгезивні та антагоністичні властивості культур-кандидатів у пробіотичні препарати для лікування та профілактики хірургічної інфекції в котів.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Рациональное використання антимікробних препаратів як фактор стимулювання розвитку антибіотикорезистентності / М. Косенко, В. Музика, Ю. Косенко [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2007. – №8. – С. 40–41.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л. Б. Борисов, Б. И. Кузьмин-Соколов, И. С. Фрейлин [и др.] / Под ред. Л. Б. Борисова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1984. – С. 77–78.
3. Сотніков В. Сучасна антибіотикотерапія у ветеринарії / В. Сотніков // Ветеринарна практика. – 2008. – №5. – С. 14.
4. Шкиль Н. Н. Изменение антибиотикочувствительности микроорганизмов при контакте с антибактериальными препаратами / Н. Н. Шкиль, Ю. В. Конюхова, Н. А. Шкиль // Ветеринарный врач. – 2008. – №3. – С. 33–35.
5. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains / N. Karapetkov, R. Georgieva, N. Rumyan [et al.] // Benef. Microbes. – 2011. – № 2(4). – P. 335–339.
6. Condition-based use of antimicrobials in cats in Finland: results from two surveys / K. H. Thomson, M. H. Rantala, T. K. Viita-Aho [et al.] // J. Feline Med. Surg. – 2009. – №11(6). – P. 462–466.
7. Characterization of vaginal lactobacilli in women after kidney transplantation / G. Martirosian, H. Radosz-Komoniewska, B. Pietrzak [et al.] // Anaerobe. – 2012. – № 18(2). – P. 209–213.
8. In vitro activity of tigecycline, a new glycylicycline, tested against 1326 clinical bacterial strains isolated from Latin America / A. C. Gales, R. N. Jones, S. S. Andrade [et al.] // The Brazilian J. of Infect. Dis. – 2005. – Vol. 9(5). – P. 348–356.
9. Severe abdominal dog bite wounds in a pregnant cat / I. H. Kumru, K. Seyrek-Intas, B. Tuna [et al.] // J. Feline Med. Surg. – 2007. – №3. – P. 499–502.
10. The natural antimicrobial peptide subtilisin acts synergistically with glycerol monolaurate, lauric arginate, and ε-poly-L-lysine against bacterial vaginosis-associated pathogens but not human lactobacilli / K. S. Noll, M. N. Prichard, A. Khaykin [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – № 56(4). – P. 756–761.