

УДК: 615.28.015.8:579.861.2

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.2.70

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ МАСТИТАХ КОРОВ

Макавчик С.А. * – д. вет.н., доц.каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии (orcid.org/ 0000-0001-5435-8321), **Павлова В.С.** – студ.факультета ветеринарной медицины

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

*groza81@mail.ru

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, антимикробные препараты, антибиотикорезистентность, вирулентность, мастит

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antimicrobials, antibiotic resistance, virulence, mastitis

Благодарности: Работа выполнена в соответствии с тематическим планом-заданием на выполнение НИР по заданию Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2023 году.

Поступила: 02.05.2023

Принята к публикации: 20.05.2023

Опубликована онлайн: 29.06.2023

РЕФЕРАТ



Анализ антибиотикограмм, интерпретация результатов и лабораторный контроль за механизмами антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus*, как возбудителя инфекционных маститов коров, необходим для успешной фармакотерапии животных. Цель исследования – изучение антибиотикорезистентности бактерий *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока коров при инфекционных маститах.

В период с 2021 по 2022 год из молока коров при инфекционных маститах было выделено 100 изолятов, среди них обнаружено грамположительных *Staphylococcus aureus* в 16% случаев выделения.

При интерпретации антибиотикограммы установлено, что штаммы *Staphylococcus aureus* чувствительны к цефалоспорином, аминогликозидам линкозамидам, тетрациклином в 100% случаев выделения, к бензилпенициллином - 81%.

Резистентность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока коров при инфекционном мастите, к ампициллину, амоксициллину, бензилпенициллину – 19%, эритромицину – 12, 5% приводит к их ограниченному применению, что сокращает возможности терапии и сказывается на экономическом состоянии сельского хозяйства.

Таким образом, по результатам лабораторного исследования получены новые данные о возникновении и распространении полирезистентных возбудителей *Staphylococcus aureus* – возбудителей инфекционного мастита с целью коррекции лечебно-диагностических мероприятий в ветеринарной практике.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Staphylococcus aureus могут обнаруживаться в составе нормальной микрофлоры кожи животных, но также они способны вызывать развитие различных патологических процессов, таких как абсцессы, бронхиты, пиемии, септицемии, эндометриты, маститы и др. [3, 4, 5, 13].

Бактериальный фактор имеет основное значение в этиологии мастита. К микроорганизмам, чаще всего выделяемым при маститах у крупного рогатого скота, относится *Staphylococcus aureus* [1, 6].

Патогенность *S. aureus* обусловлена наличием экзотоксинов, эндотоксинов, экзоферментов, способностью образовывать биопленку. *S. aureus* выделяет большое количество различных экзотоксинов, которые подразделяются на три группы: цитотоксины, суперантигены и цитотоксические ферменты. К цитотоксинам относятся α -токсин (α -гемолизин), который вызывает лизис многих клеток, включая клетки крови, эндотелия, эпителия. Также к цитотоксинам относятся лейкоцидины, действие которых направлено на лейкоциты. Суперантигены представляют группу экзотоксинов, влияющих на иммунитет животного. Т-клеточные суперантигены предотвращают выработку функционального адаптивного иммунитета, В-клеточные суперантигены препятствуют выработке специфических антител. К цитотоксическим ферментам, выделяемым *S. aureus* относятся β -гемолизин и эпидермолицидные токсины [15].

Экзоферменты, выделяемые *S. aureus*, включают коагулазу, гиалуронидазу, дезоксирибонуклеазу, липазы, нуклеазы, протеазы, фермент, модифицирующий жирные кислоты [7, 14].

Образование биопленки способствует длительному сохранению микроорганизмов и обуславливает хроническое течение инфекционных процессов, обеспечивая устойчивость *S. aureus* к иммунным реакциям организма животного и действию антибиотиков [8, 15, 16].

Серьезной проблемой является появление метициллин-резистентные *S. aureus* (MRSA), обладающих устойчивостью к

пенициллинам и большинству других β -лактамовых антибиотиков. Метициллинрезистентные стафилококки имеют специфический ген - *mecA*, который локализован в сложноорганизованном мобильном элементе стафилококковой хромосомной кассете (*staphylococcal cassette chromosome mecSC C mec*), кодирует измененный пенициллинсвязывающий белок (РВР2а). Продукция этого низкоаффинного пенициллинсвязывающего белка обеспечивает высокую устойчивость практически ко всем производным бета-лактама, включая такие, как: карбапенемы, цефалоспорины, пенициллины, потенцированные пенициллины (например, амоксициллин и клавулановая кислота) [13].

Штаммы *S. aureus* зоонозного происхождения (LA-MRSA) могут передаваться между животными разных видов и людьми [2, 9, 17, 18].

Устойчивость *S. aureus* к антибактериальным препаратам может быть обусловлена различными механизмами, в том числе такими как наличие ферментов, изменение проницаемости внешней мембраны, наличие эффлюкс-системы [12,13].

Антибиотикорезистентность *S. aureus* является актуальной проблемой, так как продукты животного происхождения часто контаминированы резистентными стафилококками, что способствует передаче генов устойчивости к антибактериальным препаратам стафилококкам организма человека или плотоядных животных [8,10,11].

Цель исследования – изучение антибиотикорезистентности бактерий *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока коров при инфекционных маститах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ / MATERIALS AND METHOD

Отбор проб и исследования проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени коров» [9].

Первичные посева биоматериала делали по секторам на колумбийский агар с

бараньей кровью, мясопептонный агар (МПА) 6,5% соли, ГРМ-агар, инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов.

Изучали морфологические, культурально-биохимические и патогенные свойства. Для последующей идентификации стафилококков до вида применяли тест-системы: STAPHtest 24 («Erba Lachema»), Чешская Республика).

Каталазную активность определяли с использованием 3%-й перекиси водорода, коагулазную активность с применением плазмы кроличей цитратной сухой (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Гемолитическую активность изучали путем посева стафилококка на кровяной агар, лецитиназную активность на среде желточно-солевом агаре. Исследование по ферментации маннита проводили на маннитол-солевом агаре (Оболенск, Россия).

Чувствительность к антибиотикам из

групп цефалоспоринов, аминогликозидов, линкозамидов, тетрациклинов, бензилпенициллинов, макролидов определяли диско-диффузионным методом и интерпретацию результатов антибиотикорезистентности провели с учетом рекомендаций EUCAST (Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам), версия 10.0 [14,15].

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В период с 2021 по 2022 год из молока коров больных инфекционным маститом в ходе работы выделены 100 изолятов, из них идентифицированы *Staphylococcus aureus* в 16% случаев выделения.

Представленные в табл.1 данные показывают, что все исследуемые изоляты *Staphylococcus aureus* обладали факторами патогенности: гемолизины; экзоферменты (плазмокоагулаза, липаза) (табл.1).

Таблица 1
Важность некоторых факторов патогенности изолятов *Staphylococcus aureus*

Изолят	Каталаза	Коагулаза	Лецитиназа	Ферментация маннита	Гемолиз
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=13)	+	+	+	+	β
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	+	+	+	+	α

Эритромицин использован для определения чувствительности к азитромицину, кларитромицину и рокситромицину;

Бензилпенициллин использовали, как индикаторный препарат для определения чувствительности *S. aureus* ко всем пенициллинам, в том числе к амоксициллину.

Тетрациклин использовали, как индикаторный препарат для определения чувствительности *S. aureus* ко всем тетрациклинам. Однако, некоторые изоляты, резистентные к тетрациклину, могут быть чувствительными к доксициклину.

Цефокситин, как индикаторный препарат для определения чувствительности к бета-лактамам препаратам и цефалоспорином.

При интерпретации антибиотикограммы большинство изолятов *Staphylococcus aureus* чувствительны к цефокситину

(n=16), гентамицину (n=16), клиндамицину (n=16), тетрациклину (n=16), тобрамицину (n=16), эритромицину (n=14), ампициллину (n=13), амоксициллину (n=13), бензилпенициллину (n=13), а также резистентны к ампициллину (n=3), амоксициллину (n=3), бензилпенициллину (n=3), эритромицину (n=2) (табл.2).

Таким образом, штаммы *Staphylococcus aureus* устойчивы к препаратам одной и двух групп, соответственно.

Однако, появление полирезистентности *Staphylococcus aureus* к различным группам антибактериальных средств может привести к ограниченному применению антибиотиков, что существенно сокращает возможности терапии и сказывается на экономическом состоянии сельского хозяйства.

Таблица 2
Антибиотикорезистентные профили *Staphylococcus aureus*

Изолят	АМП	Бензилпенициллин	Ампициллин	Амоксициллин	Цефокситин	Эритромицин	Клиндамицин	Гентамицин	Тобрамицин	Тетрациклин
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=13)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)	Р	Р	Р	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=2)	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч

Примечание: Р – резистентность, Ч-чувствительность.

Полученные нами исследования свидетельствуют о чувствительности *Staphylococcus aureus* к тетрациклинам и коррелируют с данными, полученными ранее в Российской Федерации и с тенденцией к тому, что наиболее используемые противомикробные препараты в ветеринарной медицине – тетрациклины, которые занимают 40,5% от общего количества [1, 8, 16, 17].

Микробиологическому ранжированию стафилококков как возбудителей гнойно-септических болезней животных в ветеринарной практике отводится главная роль в определении стратегии и тактики использования антимикробных препаратов [3,4].

Таким образом, не вызывает сомнения, что появление и распространение стафилококков с усилением и проявлением патогенных свойств являются одними из основных причин возникновения инфекционного мастита у коров.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Staphylococcus aureus обладают природной резистентностью к ряду антибиотиков, включая цефтазидим, азтреонам, полимиксин, колистин, налидиксовую кислоту.

Staphylococcus aureus чувствительны к цефалоспорином (n=16), аминогликозидам (n=16), линкозамидам (n=16), тетра-

циклинам (n=16), бензилпеницилинам (n=13), макролидам (n=14), а также резистентны к бензилпенициллину (n=3), эритромицину (n=2).

Таким образом, по результатам лабораторного исследования получены новые данные о возникновении и распространении возбудителей *Staphylococcus aureus* – возбудителей инфекционного мастита с целью коррекции лечебно-диагностических мероприятий в ветеринарной практике.

RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL PREPARATIONS OF STAPHYLOCOCCUS ISOLATED FROM MILK DURING INFECTIOUS MASTITIS OF COWS

Makavchik S.A. – PhD of vet. sciences St. Petersburg state academy of veterinary medicine, St. Petersburg, Pavlova V.S., student, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia.

Acknowledgments: The work was carried out in accordance with the thematic plan-task for the implementation of research work on the instructions of the Ministry of Agriculture of Russia at the expense of the federal budget in 2023.

ABSTRACT

Analysis of antibiograms and interpretation of the results, laboratory monitoring of the mechanisms of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk in infectious mastitis of cows is necessary for successful pharmacotherapy of animals.

The aim of the study was to study the antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* bacteria isolated from milk in infectious mastitis of cows.

In the period from 2021 to 2022, 100 strains of microorganisms were isolated from milk in infectious mastitis of cows. The strains were identified as gram-positive *Staphylococcus aureus* - 16%.

When interpreting the antibiogram, it was found that strains of *Staphylococcus aureus* are sensitive to cephalosporins, aminoglycosides, lincosamides, tetracyclines in 100% of isolation cases, and to benzylpenicillins - 81%. and also resistant.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Балагула Т.В., Антибиотики в ветеринарии: загрязнение продукции животноводства, Балагула Т.В., Лаврухина О.И., Батов И. В., Макаров Д.А., Третьяков А.В., / Международный вестник ветеринарии. 2022. – № 4. – С.174-179, DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.4.174
2. Ваганова, А.Н. Устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* зоонозного происхождения - новая угроза здоровью населения/Ваганова А.Н., Борисенко С.В., Сокурова А.М., Вербов В.Н.//Журнал инфектологии. - 2019. -Т. 11. - № 4. - С. 122-133.
3. Долганов В.А., Епанчинцева О.С., Лютикова А.В., Завгородняя Н.В. Распространение и этиология маститов у дойных коров // ОмГТУ. – 2012. – №5. – С. 107-109.
4. Макавчик С.А., Сухинин А.А., Енгалшев С.В., Кротова А.Л. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение антимикробных препаратов: монография - Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2021.с. 152.: ил.
5. Макавчик, С.А. Антибиотикорезистентность микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, изолированных от животных / С. А. Макавчик, А. Л. Кротова // Международный вестник ветеринарии. — 2021. — № 3. — С. 103-107.
6. Макавчик, С.А. Бактериальные болезни крупного рогатого скота, вызванные полирезистентными микроорганизмами (диагностика, лечение и профилактика): автореферат дис... доктора ветеринарных наук: 06.02.02,06. 02.03/Макавчик С.А. 2021 -39 с.
7. Макавчик, С. А. Механизмы резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от крупного рогатого скота/ Макавчик С. А., Кротова А. Л., Баргман Ж. Е., Сухинин А. А., Приходько Е. И.// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- 2020; 4: 41–46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41.
8. Макавчик, С. А. Рациональная фармакотерапия животных с основами ранжирования антимикробных препаратов в ветеринарных лабораториях/Макавчик С.А.//Ветеринария. - 2022. - № 2. - С. 9-12.
9. Методическими указаниями по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени коров: утв. ГУВ. МСХ СССР 30 декабря 1983 г. №115-69.
10. Прасолова О.В., Анализ распространения генетических детерминант резистентности к тетрациклинам, цефалоспорином, пенициллинам, фторхинолонам и колистину в рамках ветеринарного мониторинга на территории РФ, Прасолова О.В., Тимофеева И.А., Осипова Ю.А., Акинина Т.Н., Крылова Е.В., Кирсанова Н.А., Куриченкова Е.О., Путинцева А.В., Богомазова А.Н., Леухина О.О., Солтынская И.В // КМАХ. 2022. Т.24. Приложение 1, С.29.
11. Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, Molle V. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins* (Basel). 2021 Sep 23;13(10):677. doi: 10.3390/

toxins13100677. PMID: 34678970; PMCID: PMC8540901.

12. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011 Sep-Oct;2(5):445-59. doi: 10.4161/viru.2.5.17724. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21921685; PMCID: PMC3322633.

13. Crespo-Piazuelo D, Lawlor PG. Live-stock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. *Ir Vet J*. 2021 Aug 6;74(1):21. doi: 10.1186/s13620-021-00200-7. PMID: 34362463; PMCID: PMC8348836.

14. EUCAST. Экспертные правила определения чувствительности к антибиотикам EUCAST. Доступно по адресу: https://www.eucast.org/expert.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/

15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). MIC distributions and ECOFFs <https://mic.eucast.org/search/>.

16. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Mar 17;10:107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107. PMID: 32257966; PMCID: PMC7089872.

17. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Sep 4:e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18. PMID: 30209034; PMCID: PMC6148192.

18. Tam K., Torres V.J. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol. Spectr*. 2019;7:16. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.

REFERENCES

1. Balagula T.V., Antibiotics in veterinary medicine: contamination of livestock products, Balagula T.V., Lavrukhina O.I., Batov I.V., Makarov D.A., Tretyakov A.V., / *International Veterinary Bulletin* . 2022. - No. 4. - P.174-179, DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.4.174

2. Vaganova, A.N. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus of zoonotic origin - a new threat to public health / Vaganova A.N., Borisenko S.V., Sokurova A.M., Verbov V.N.//*Journal of Infectology*. - 2019. -T. 11. - No. 4. - S. 122-133.

3. Dolganov V.A., Epanchintseva O.S., Lyutikova A.V., Zavgorodnyaya N.V. Distribution and etiology of mastitis in dairy cows // *OmGTU*. - 2012. - No. 5. - S. 107-109.

4. Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Engashev S.V., Krotova A.L. Laboratory methods for the control of multiresistant pathogens of bacterial animal diseases and the rational use of antimicrobial drugs: monograph - St. Petersburg: VVM, 2021.p. 152.: ill.

5. Makavchik, S.A. Antibiotic resistance of Staphylococcus aureus microorganisms isolated from animals / S. A. Makavchik, A. L. Krotova // *International Veterinary Bulletin*. - 2021. - No. 3. - S. 103-107.

6. Makavchik, S.A. Bacterial diseases of cattle caused by multidrug-resistant microorganisms (diagnosis, treatment and prevention): abstract of dissertation.... doctor of veterinary sciences: 06.02.02.06. 02.03/ Makavchik S.A. 2021 -39 p.

7. Makavchik, S. A. Mechanisms of resistance to antimicrobial drugs in microorganisms isolated from cattle / Makavchik S. A., Krotova A. L., Bargman Zh. E., Sukhinin A. A., Prikhodko E. I. // *Issues of legal regulation in veterinary medicine*. - 2020; 4:41-46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41.

8. Makavchik, S. A. Rational pharmacotherapy of animals with the basics of ranking antimicrobials in veterinary laboratories / Makavchik S.A.//*Veterinary*. - 2022. - No. 2. - S. 9-12.

9. Guidelines for the bacteriological examination of milk and udder secretion of cows: approved by the Ministry of Agriculture of the USSR on December 30, 1983 No. 115-69

10. Prasolova O.V., Analysis of the distribution of genetic determinants of resistance to tetracyclines, cephalosporins, penicillins, fluoroquinolones and colistin in the frame-

- work of veterinary monitoring in the territory of the Russian Federation, Prasolova O.V., Timofeeva I.A., Osipova Yu.A., Akinina T.N., Krylova E.V., Kirsanova N.A., Kurichenkova E.O., Putintseva A.V., Bogomazova A.N., Leukhina O.O., Soltynskaya I.V. // *КМАН*. 2022. V.24. Annex 1, p.29.
11. Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, Molle V. Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins (Basel)*. 2021 Sep 23;13(10):677. doi: 10.3390/toxins13100677. PMID: 34678970; PMCID: PMC8540901.
12. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011 Sep-Oct;2(5):445-59. doi: 10.4161/viru.2.5.17724. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21921685; PMCID: PMC3322633.
13. Crespo-Piazuelo D, Lawlor PG. Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. *Ir Vet J*. 2021 Aug 6;74(1):21. doi: 10.1186/s13620-021-00200-7. PMID: 34362463; PMCID: PMC8348836.
14. EUCAST. Экспертные правила определения чувствительности к антибиотикам EUCAST. Доступно по адресу: https://www.eucast.org/expert.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). MIC distributions and ECOFFs <https://mic.eucast.org/search/>.
16. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Mar 17;10:107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107. PMID: 32257966; PMCID: PMC7089872.
17. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Sep 4:e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18. PMID: 30209034; PMCID: PMC6148192.
18. Tam K., Torres V.J. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol. Spectr*. 2019;7:16. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.