

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ ШТАММАМ БАКТЕРИОФАГОВ

Золотухин Сергей Николаевич¹, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарной экспертизы»

Мелехин Андрей Сергеевич¹, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарной экспертизы»

Пименов Николай Васильевич², доктор биологических наук, профессор кафедры «Биология и патология мелких домашних, лабораторных и экзотических животных»

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА¹

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»²

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел 8(8422)559535; e-mail: fvm.zol@yandex.ru¹

109472, г. Москва, ул. Скрябина, 23; тел.: 8(495)377-91-17; e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru²

Ключевые слова: инфекционная диарея, патогенные энтеробактерии, антибиотики, бактериофаги.

В статье рассматривается чувствительность возбудителей диарейных заболеваний поросят сосунов к антибиотикам и бактериофагам. Показано, что ни один антибиотик не ингибирует стопроцентно изученных штаммов энтеробактерий. Наибольшим спектром литической активности по отношению к гомологичным бактериям обладал морганеллезный бактериофаг *Phagum M. morganii* М-20 УГСХА, он лизировал 90,6% изученных микроорганизмов, остальные штаммы бактериофагов были активны по отношению к гомологичным бактериям в пределах 79,3-89,3%.

Введение

Проблема борьбы с массовыми желудочно-кишечными заболеваниями новорожденных животных в настоящее время остается актуальной. Благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей установлено, что абсолютное большинство вспышек диарейных заболеваний молодняка имеют инфекционную природу, протекают массово, в виде энзоотических вспышек и наносят большой экономический ущерб животноводческим хозяйствам из-за гибели и снижения продуктивности заболевших животных [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Имеющиеся на вооружении практических ветеринарных работников средства специфической профилактики этих заболеваний направлены против ограниченного количества возбудителей болезни (эшерихий, сальмонелл, клостридий перфрингенс) и не активны по отношению к другим патогенным микроорганизмам, в частности представителям семейства *Enterobacteriaceae*

(родов *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Hafnia* и др.). Перечисленные микроорганизмы, по данным разных авторов, широко распространены в природе и довольно часто циркулируют в животноводческих хозяйствах, вызывая массовые желудочно-кишечные заболевания молодняка животных [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Применение антибиотиков «вслепую», без определения чувствительности выделенных микроорганизмов к используемым препаратам, не всегда дает желаемые положительные результаты. Это связано, в первую очередь, с появлением антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов к двум, трем и более применяемым в хозяйствах препаратам [7].

Во многих литературных источниках говорится о положительном опыте лечения и профилактики некоторых заболеваний животных, вызываемых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами с помощью специфических бактериофагов [8, 5, 9, 10, 11].

Поэтому перед исследователями стоит задача: определение чувствительности возбудителей инфекционной диареи к различным антибактериальным препаратам, в том числе и специфическим бактериофагам, что позволит более эффективно вести борьбу с заболеваниями, вызванными этими микроорганизмами и ускорить процесс ликвидации эпизоотического очага в конкретном хозяйстве.

Целью настоящего исследования являлось изучение чувствительности патогенных энтеробактерий, выделенных в различных хозяйствах из патологического и биоматериала из органов и тканей трупов и от больных диареей поросят-сосунков в период массовых желудочно-кишечных заболеваний к антибиотикам и производственным штаммам бактериофагов, используемым для изготовления поливалентного фагового био-препарата.

Объекты и методы исследований

Чувствительность энтеробактерий к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с помощью бумажных дисков, пропитанных соответствующими препаратами. Для этого использовали коммерческие наборы дисков, рекомендованные для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, родов *Staphylococcus*, *Enterococcus* и *Pseudomonas* (производитель – ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера). Исследование проводили согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [12], а также в соответствии с методические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» [13].

Для оценки чувствительности энтеробактерий использовали агар Мюллера-Хинтон (МХА) без дополнительных добавок.

Инокулят готовили методом прямого суспендирования в стерильном изотоническом растворе колоний чистой 18-24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде. Для этого стерильной бактериологической петлей собирали несколько колоний, суспендировали полученный материал в стерильном изотоническом растворе, доводя бактериальную суспензию до плотности 0,5 по стан-

дарту мутности МакФарланда, что приблизительно соответствовало 10^8 КОЕ/мл путем добавления в суспензию микробной массы или разбавляли ее стерильным изотоническим раствором.

Перед использованием стандарт мутности энергично встряхивали. Суспензию использовали не позднее 60 минут после приготовления.

Затем бактериальную суспензию инокулировали на агар, для чего погружали стерильный ватный тампон в суспензию, удаляли избыток суспензии, отжав тампон о стенки пробирки. Далее наносили инокулят штриховыми движениями на всю поверхность агара в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60° .

Диски в течение 15 минут плотно наносили на поверхность инокулированного исследуемой культурой и подсушенного агара.

Чашки с посевами ставили вверх дном в термостат для инкубирования при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$ на 16-20 ч.

Результаты учитывали, измеряя диаметр отсутствия роста микроорганизмов вокруг дисков, пропитанных антибиотиками, интерпретируя результаты согласно рекомендациям, изложенным в выше обозначенных инструктивных документах.

Эти же изоляты энтеробактерий изучали на чувствительность к гомологичным бактериофагам, используемым для изготовления лечебно-профилактического био-препарата. Для этого штаммы фагов *Phagum Morganella morganii* М-20 УГСХА, *Phagum Escherichia coli* Е-70 УГСХА, *Phagum Citrobacter* С-61 УГСХА, *Phagum Proteus* П-261 УГСХА, *Phagum Enterobacter* Ен-13 УГСХА из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА, выделенные нами и депонированные во Всероссийской коллекции микроорганизмов ВГНКИ.

Для изучения спектра литической активности фагов (чувствительности культур) применяли метод нанесения капель бактериофагов на газон исследуемых штаммов микроорганизмов [14, 8]. С этой целью на поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносили 3-4 капли 18-24-часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. За-

тем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки с засеянными средами подсушивали в термостате в течение 15-20 минут. После чего на поверхность среды пипеткой легким прикосновением капли наносили исследуемый фаг, наклоняли чашку так, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37°C, оценку результатов проводили через 18-24 часа. В качестве контроля на поверхность плотной питательной среды с культурой наносили стерильный питательный бульон.

При положительном результате на поверхности агара наблюдали прозрачную зону лизиса исследуемой культуры. В контрольных чашках рост исследуемого микроорганизма был по всей поверхности среды без участков лизиса.

Результаты исследований

В рамках проводимых исследований была изучена чувствительность к пенициллину, гентамицину, ампициллину, неомицину, тетрациклину, стрептомицину, левомицетину, эритромицину, цефтриаксону и ципрофлоксацину у 235 штаммов энтеробактерии (76 вида *E. coli*, 53 *M. morganii*, 45 рода

Proteus, 32 – *Citrobacter* 29 – *Enterobacter*).

Почти все изученные штаммы были устойчивы к пенициллину, лишь 1 штамм энтеробактеров и 5 штаммов протей обладали умеренной устойчивостью к этому препарату, что составило 2,6% от общего количества изученных изолятов энтеробактерий.

К гентамицину были чувствительны 34,8% изолятов *E. coli*, 56,2% штаммов рода *Citrobacter*, 31% - *Enterobacter*, 33,3% - *Proteus* и 56,6% штаммов вида *M. morganii* из числа изученных. Устойчивы к этому антибиотику были 34,2% изолятов *E. coli*, 25,0% энтеробактерий рода *Citrobacter*, 34,5% - *Enterobacter*, 40,0% - *Proteus* и 28,3% изолятов вида *M. morganii* и умеренную устойчивость показали 31,5% штаммов *E. coli*, 18,6% *Citrobacter*, 34,5% *Enterobacter*, 26,7% *Proteus* и 15,1% вида *M. morganii*.

Ампициллин был активен в отношении 57,8% изолятов *E. coli*, 50% энтеробактерий рода *Citrobacter*, 34,5% *Enterobacter*, 37,7% *Proteus* и 60,4% изолятов вида *M. morganii*; устойчивы к нему были 27,3% изолятов *E. coli*, 31,3% энтеробактерий рода *Citrobacter*, 31,0% *Enterobacter*, 44,4% *Proteus* и 30,2%

Таблица 1

Результаты изучения чувствительности штаммов энтеробактерий к антибиотикам

№ пп	Антибиотик	Вид (род) возбудителя и результаты изучения чувствительности									
		<i>Escherichia coli</i>		<i>Citrobacter</i>		<i>Enterobacter</i>		<i>Proteus</i>		<i>Morganella morganii</i>	
		Количество всего	% чувствительных	Количество всего	% чувствительных	Количество всего	% чувствительных	Количество всего	% чувствительных	Количество всего	% чувствительных
1	Пенициллин	76	0	32	0	29	0	45	0	53	0
2	Гентамицин	76	34,8	32	56,2	29	31,0	45	33,3	53	56,6
3	Ампициллин	76	57,6	32	50,0	29	34,5	45	37,7	53	60,4
4	Неомицин	76	16,7	32	31,3	29	16,6	45	35,6	53	43,3
5	Тетрациклин	76	42,4	32	34,4	29	24,1	45	28,9	53	39,6
6	Стрептомицин	76	13,6	32	15,6	29	20,7	45	24,4	53	26,4
7	Левомицетин	76	60,6	32	56,6	29	51,7	45	64,4	53	66,0
8	Эритромицин	76	7,5	32	18,8	29	13,8	45	20,0	53	35,8
9	Цефтриаксон	76	84,7	32	81,3	29	72,4	45	77,8	53	77,3
10	Ципрофлоксацин	76	74,2	32	83,3	29	65,6	45	82,2	53	79,2

Таблица 2

Результаты изучения спектра литического действия и специфичности бактериофагов

№ пп	Штамм бактериофага	Вид (род) возбудителя и результаты изучения чувствительности									
		<i>Escherichia coli</i>		<i>Citrobacter</i>		<i>Enterobacter</i>		<i>Proteus</i>		<i>Morganella morganii</i>	
		Исследовано штаммов	Количество чувствительных %	Исследовано штаммов	Количество чувствительных %	Исследовано штаммов	Количество чувствительных %	Исследовано штаммов	Количество чувствительных %	Исследовано штаммов	Количество чувствительных %
1	E-70 УГСХА	76	67/88,2	32	-	29	-	45	-	53	-
2	C-61 УГСХА	76	-	32	26/81,6	29	-	45	-	53	-
3	En-13 ГСХА	76	-	32	-	29	23/79,3	45	-	53	-
4	П-261 ГСХА	76	-	32	-	29	-	45	39/86,7	53	-
5	M-20 УГСХА	76	-	32	-	29	-	45	-	53	48/90,6

изолятов вида *M. morganii*. Умеренную устойчивость к этому препарату показали 14,4% *E. coli*, 18,8% *Citrobacter*, 34,5% *Enterobacter*, 17,8% *Proteus* 9,4% *M. morganii*.

Левомецетин активно ингибировал выделенные микроорганизмы в пределах 51,7-66%, к нему были устойчивы 17,8-31,3% и умеренно устойчивы в пределах от 3,1 до 20,7% изолятов энтеробактерий.

Невысокую активность проявили антибиотики неомицин, тетрацилин, стрептомицин и эритромицин. К этим антибиотикам были чувствительны 7,9-43,3%, устойчивы 20,8-74,2% и умеренно устойчивы 10,5-53,1% проверенных изолятов.

Наибольшую активность проявили препараты цефалоспоринового ряда, антибиотики цефтриаксон и ципрофлоксацин. К ним были чувствительны 65,6-84,2% изученных микроорганизмов, устойчивы 5,6-15,6% и умеренно устойчивы от 3 до 24,1% изолятов разных родов энтеробактерий.

Результаты изучения чувствительности выделенных и идентифицированных штаммов энтеробактерий отражены в таблице 1.

Исследования показали, что ни один из проверенных препаратов не ингибировал 100% выделенных изолятов энтеробактерий, вызывающих инфекционную диарею у поросят.

Результаты изучения диапазона литической активности производственных штам-

мов бактериофагов отражены в таблице 2, из которой видно, что изученные штаммы бактериофагов обладали строгой специфичностью и не лизировали представителей энтеробактерий гетерологичных родов. Наибольшим спектром литической активности по отношению к гомологичным бактериям обладал морганеллезный бактериофаг *Phagum M. morganii* M-20 УГСХА, он лизировал 90,6% изученных микроорганизмов, остальные штаммы бактериофагов были активны по отношению к гомологичным бактериям в пределах 79,3-89,3%.

Выводы

Большинство штаммов энтеробактерий, выделенных при массовых желудочно-кишечных заболеваниях поросят-сосунов, обладали полирезистентностью к антибиотикам: пенициллину, гентамицину, ампициллину, неомицину, тетрациклину, стрептомицину, левомецетину, эритромицину. Наибольшую активность проявили препараты цефалоспоринового ряда, антибиотики цефтриаксон и ципрофлоксацин. К ним были чувствительны 65,6-83,3% изученных микроорганизмов, устойчивы 9,1-16,7% и умеренно устойчивы 3-12% культур. Ни один из проверенных препаратов не ингибировал 100% выделенных изолятов энтеробактерий, вызывающих инфекционную диарею у поросят.

Штаммы бактериофагов из серии УГ-СХА обладали строгой специфичностью и не лизировали представителей энтеробактерий гетерологичных родов. Наибольшим спектром литической активности по отношению к гомологичны бактериям обладал морганеллезный бактериофаг *Phagum M. morganii* М-20 УГСХА, он лизировал 90,6% изученных микроорганизмов, остальные штаммы бактериофагов были активны по отношению к гомологичным бактериям в пределах 79,3-89,3%.

Библиографический список

1. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Е.А. Непоклонов [и др.]. – Казань: Издательство «Фэн», 2002. – 592 с.
2. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных: монография / С.Н. Золотухин . – Ульяновск, 2004. – 125 с.
3. Золотухин, С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев. – Ульяновск, 2005. – 126 с.
4. Золотухин, С.Н. Неспецифическая профилактика смешанной кишечной инфекции телят и поросят / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Л.С. Каврук // Практик. – 2006. – № 6. – С. 72.
5. Применение биокомпозитного материала «ЛитАр» в сочетании с бактериофагами при лечении переломов конечностей у животных / С.Н. Золотухин, В.Ю. Пичугин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. - №3. - С.45-49.
6. Мелехин, А.С. Этиология смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов / А.С.Мелехин, Д.С. Золотухин, С.Н. Золотухин // Вестник ветеринарии.– 2011. – Том 59, № 4. – С. 75-77.
7. Золотухин, С.Н., Чувствительность патогенных энтеробактерий, выделенных при диареях молодняка животных к антибиотикам и специфическим бактериофагам / С.Н. Золотухин, А.С. Мелехин, Д.А.Васильев, Л.С. Каврук, Н.И.Молофеева, Л.П.Пульчеровская, Б.М.Коритняк, Е.А.Булькинова // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных. Материалы международной научно-практической конференции. Ульяновск - 2006. -С. 233-236.
8. Золотухин, Сергей Николаевич Бактериофаги *Morganella morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят / С.Н.Золотухин : автореф. дис. ... канд. ветеринарных наук. – М., 1994. – 16 с.
9. Ленёв, С.В. Бактериофаги для лечения и профилактики сальмонеллеза птиц / С.В. Ленёв, Н.А. Дрогалина, С.А. Бугаев // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для человека и животных. Материалы Международной научно- практической конференции. 21-23 июня 2006 года. – Ульяновск, 2006. – С. 417.
10. Фагопрофилактика смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов, вызываемой патогенными энтеробактериями / А.С. Мелехин, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Д.С. Золотухин, Г.А.Шевалаев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы международной научной конференции. – Ульяновск , 2012. -Том 1. -С. 262-267.
11. Пименов, Н.В. Бивалентный бактериофаг против сальмонеллеза птиц / Н.В. Пименов // Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии: Сборник научных трудов молодых ученых. -М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2011. – Выпуск 7. – С. 168-174.
12. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. - М.: Федеральный центр россанэпиднадзора Минздрава России, 2004. - 91 с.
13. Методические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».- Москва, 2014 - 154 с.
14. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я Ганюшкин. – Ульяновск, 1988. – 45с.