

Идентификация и изучение антибиотикорезистентности бактерий, выделенных из маститного молока

Л.С.Киреева, С.А.Макавчик

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель – выделение из молока при маститах коров чистой культуры возбудителей и их идентификация, а также изучение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам, выявление генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных (типы OXA-48 и OXA-162) и класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP, NDM методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Выделенная культура возбудителя – *Klebsiella pneumoniae* высокочувствительна только к цефотаксиму и чувствительна к другим препаратам из группы цефалоспоринов, а также к левомицетину, ципрофлоксацину. Малочувствительна к амикацину, фурадонину. К фосфомоцину, гентамицину, эритромицину, доксициклину резистентна. У изучаемых культур не выявлены гены приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных, а также класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM.

Ключевые слова: идентификация, антибиотикорезистентность, антибактериальные препараты, *Klebsiella pneumoniae*, гены, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Киреева Л.С., Макавчик С.А. Идентификация и изучение антибиотикорезистентности бактерий, выделенных из маститного молока. Бактериология. 2018; 3(1): 67–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-67-70

Identification and study of the antibiotic-resistance of bacteria from mastitide milk

L.S.Kireyeva, S.A.Makavchik

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

The purpose of the study was to isolate and to identify a pure culture of causative agent from milk of cows with mastitis, to study its sensitivity to antibacterial drugs and to detect carbapenemase genes of KPC and OXA-48-like groups (OXA-48 and OXA-162 types) and metal-β-lactamases class of the VIM, IMP, NDM groups by the Real-time polymerase chain reaction (PCR) method. The isolated culture of microorganisms – *Klebsiella pneumoniae*, is highly sensitive only to cefotaxime. It is sensitive to ceftazidime, cefuroxime, ceftriaxone, i.e. to all drugs from the group of cephalosporins, and to levomycetin, ciprofloxacin. It is insensitive to amikacin, furadonin. The isolated culture is resistant to phosphomycin, gentamicin, erythromycin, and doxycycline. The genes of carbapenemase of KPC and OXA-48-like groups and of metallo-β-lactamases class of VIM, IMP, NDM groups in studied cultures were not detected.

Klebsiella pneumoniae showed multiple antibiotic resistance. The genes of the acquired carbapenemases of the KPC and OXA-48-like groups (types OXA-48 and OXA-162) and of the class of metal-β-lactamases of the VIM, IMP, NDM groups were not detected in the isolated culture.

Keywords: identification, antibiotic resistance, antibacterial drugs, *Klebsiella pneumoniae*, genes, polymerase chain reaction

For citation: Kireyeva L.S., Makavchik S.A. Identification and study of the antibiotic-resistance of bacteria from mastitide milk. Bacteriology. 2018; 3(1): 67–70. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-67-70

Бактерии рода *Klebsiella* относятся к семейству *Enterobacteriaceae* и широко распространены в природе. Они являются представителями резидентной микрофлоры кишечника различных видов животных и человека и входят в состав условно-патогенной микрофлоры. При сниже-

нии иммунного статуса организма представители данного рода, в том числе *Klebsiella pneumoniae*, способны вызывать различные заболевания, в том числе и маститы у коров [1, 2]. Именно маститы являются одной из главных причин преждевременной выбраковки продуктивных

Для корреспонденции:

Киреева Лидия Сергеевна, студентка факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5

Телефон: (812) 388-3631

E-mail: lidia.kireeva@yandex.ru

Статья поступила 28.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018

For correspondence:

Lidia S. Kireyeva, student, faculty of veterinary medicine, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation

Phone: (812) 388-3631

E-mail: lidia.kireeva@yandex.ru

The article was received 28.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

животных и систематического недополучения молока за лактацию [3].

Под антибиотикорезистентностью понимают сохранение микроорганизмами способности к росту и размножению в присутствии концентрации антибактериальных препаратов, создаваемой при введении терапевтических доз препарата. Появление устойчивости к действию антибиотиков является частным примером микроэволюционных изменений, развивающихся в популяции любых микроорганизмов, испытывающих воздействие неблагоприятных факторов. Основная проблема антибиотикотерапии заключается в том, что ненадлежащее использование антибактериальных препаратов способствует появлению антибиотикорезистентных штаммов [4].

Антибиотикорезистентность всегда обусловлена генетически и возникает за счет изменения собственных или приобретения новых, а также изменения уровня экспрессии уже имеющихся генов [5]. Однажды возникшие гены резистентности в условиях продолжающейся селекции, в качестве которой выступает антибиотикотерапия, приобретают тенденцию к распространению в популяциях микроорганизмов, причем не ограниченную одним видом [6].

Под приобретенной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов [7].

β -лактамазы – группа бактериальных ферментов, направленных на борьбу с β -лактамными антибиотиками, одними из самых часто применяемых препаратов для лечения инфекционных заболеваний [8]. Именно поэтому для исследования были выбраны следующие классы β -лактамаз: KPC и OXA-48-подобные (типы OXA-48 и OXA-162) и класс металло- β -лактамаз групп VIM, IMP, NDM [9, 10].

Целью исследования является оценка антибиотикорезистентности бактериальных агентов, содержащихся в пробах молока. В соответствии с целью были поставлены задачи: выделение и идентификация возбудителей мастита, анализ их антибиотикорезистентности.

Материалы и методы

В промышленном животноводческом комплексе Ленинградской области были отобраны пробы молока коров со скрытыми и клинически проявляющимися маститами. Пробы молока (30–50 мл) брали в стерильные пластиковые емкости после тщательной обработки вымени мыльным раствором, дезинфекции сосков 70% этиловым спиртом и сдаивания первой порции молока в отдельную посуду.

Первичные посева делали на мясо-пептонный агар и бульон (МПА и МПБ), на кровяной агар, среды Эндо. Для идентификации возбудителя изучали культурально-биохимические свойства чистых культур бактерий. Идентификацию также проводили при помощи тест-систем API 20E («Bio Merieux», Франция), предназначенных для биохимической идентификации энтеробактерий в течение 18–24 ч. Для исследования использовали изолированную колонию со среды

первичного посева, суспендировали и вносили в микропробирки по 100 мкл. Затем добавляли по 50 мкл вазелинового масла в микропробирки с тестами на уреазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, аргининдигидролазу, сероводород. Посевы инкубировали при 36°C в течение 24 ч, после чего добавляли реактивы на ацетоин, индол, триптофандеаминазу, нитриты.

Результаты учитывали визуально, заполняли бланки с кодами цифрового профиля. Идентификацию проводили по идентификационной таблице, поставляемой в комплекте с тест-системой.

Определение чувствительности бактериальной культуры к антибактериальным препаратам проводили методом диффузии антибиотиков в агар с применением дисков (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

Выявление генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных (типы OXA-48 и OXA-162) и класса металло- β -лактамаз групп VIM, IMP, NDM проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Результаты и обсуждение

В результате идентификации, путем изучения морфологических, культурально-биохимических свойств и использования тест-системы API 20E (рис. 1), выделенный возбудитель отнесли к роду *Klebsiella*, виду *Klebsiella pneumoniae* (таблица).

Клебсиеллы представляли собой мелкие, граммотрицательные палочки. При микроскопии у возбудителей выявляли капсулу, которая при окраске метиленовым синим Леффлера по Михину приобретала розовый цвет, бактериальные клетки имели синий цвет.

Таблица. Результаты использования тест-системы API 20E

Название ячейки (микропробирки) и реакции/фермента	Результат
OPNG (β -галактозидаза)	– (в идентификационной таблице в 99% случаев +)
ADH (аргининдигидролаза)	+ (в идентификационной таблице в 99% случаев –)
LDC (лизиндекарбоксилаза)	+ +
ODC (орнитиндекарбоксилаза)	– (в идентификационной таблице в 99% случаев –)
CIT (утилизация цитратов)	– (в идентификационной таблице в 86% случаев +)
H ₂ S (продукция H ₂ S)	–
URE (уреаза)	–
TDA (триптофандеаминаза)	–
IND (продукция индола)	–
VP (продукция ацетоина)	–
GEL (желатиназа)	–
GLU (сбраживание/окисление глюкозы)	+ (на 55%)
MAN (сбраживание/окисление маннита)	+
INO (сбраживание/окисление инозита)	+
SOR (сбраживание/окисление сорбита)	+
RHA (сбраживание/окисление рамнозы)	+
SAC (сбраживание/окисление сахарозы)	+
MEL (сбраживание/окисление мелибиозы)	+
AMY (сбраживание/окисление амигдалина)	+
ARA (сбраживание/окисление арабинозы)	+

Культуры клебсиелл хорошо росли на простых средах. При росте на МПБ вызвали равномерное помутнение, на поверхности образовывалась слизистая пленка. На МПА через 18–24 ч вырастали серо-белые, слизистые колонии. Консистенцию определяли прикосновением бактериологической петли в процессе отщипывания части микробов из колонии.

На среде Эндо после культивирования при 37–38°C в течение 18–24 ч изучаемые культуры образовывали бледно-розовые, слизистые, сливающиеся, приподнимающиеся над поверхностью среды колонии (рис. 2).

При росте на трехсахарном агаре с мочевиной по Олькиницкому происходило пожелтение столбика среды, что указывало на расщепление глюкозы, а красная скошенная часть среды – на отсутствие ферментации сахарозы и лактозы (рис. 3).

Проводили определение чувствительности выделенной культуры возбудителя к антибактериальным препаратам методом диффузии антибиотиков в агар с применением дис-

ков. Учет результатов проводили после 24-часовой инкубации в термостате при температуре 37°C по наличию зон задержки роста, образующихся под воздействием антибактериальных препаратов.

Установлено, что выделенная культура микроорганизмов *Klebsiella pneumoniae* высокочувствительна только к цефотаксиму (рис. 4). Чувствительна также к цефтазидиму, цефуроксиму, цефтриаксону, т.е. ко всем использованным препаратам из группы цефалоспоринов. Была также выявлена чувствительность к левомицетину, ципрофлоксацину (группа фторхинолонов). Данный микроб малочувствителен к амикацину, фурадонину. Отметим, что к фосфомицину, гентамицину, эритромицину, доксициклину выделенная культура резистентна.

В результате проведения ПЦР-РВ генов приобретенных карбапенемаз группы KPC и OXA-48-подобных и класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM у выделенной культуры обнаружено не было (рис. 5, 6).



Рис. 1. Результаты исследований на тест-системе API 20e.



Рис. 2. Рост *Klebsiella pneumoniae* на среде Эндо.

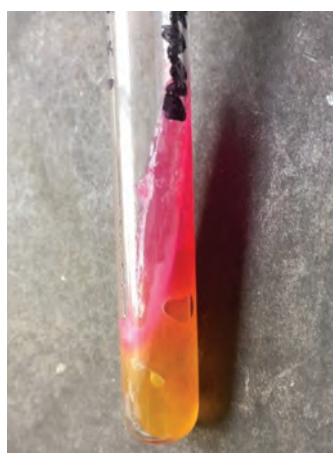
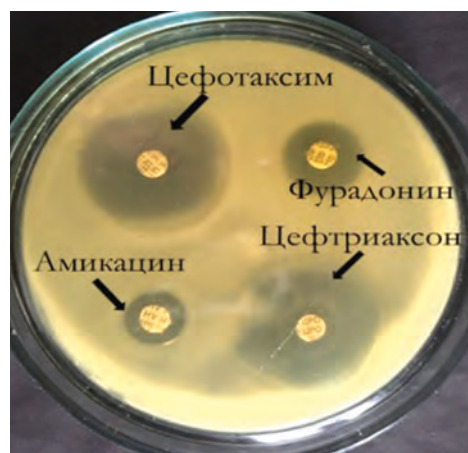


Рис. 3. Рост *Klebsiella pneumoniae* на трехсахарном агаре Олькиницкого.



- Цефотаксим – 27 мм
- Фурадонин – 16 мм
- Цефтриаксон – 23 мм
- Амикацин – 11 мм

Рис. 4. Зоны задержки роста возбудителя под воздействием антибиотиков.

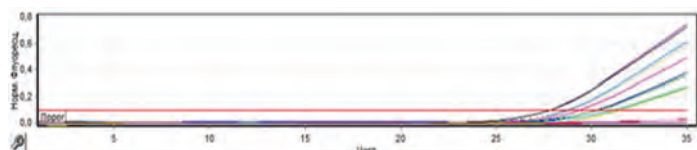


Рис. 5. График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени свидетельствует о накоплении продуктов амплификации внутренних контролей.

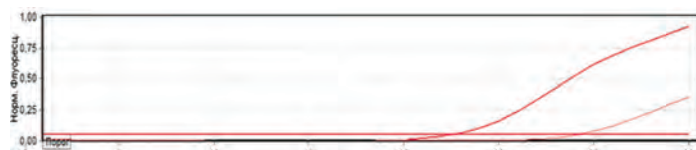


Рис. 6. График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени свидетельствует о накоплении продуктов амплификации фрагментов генов MBL группы VIM и генов группы OXA-48-подобных.

Выводы

Выделенные и идентифицированные микроорганизмы *Klebsiella spp.* проявили множественную антибиотикорезистентность. Гены приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных и класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM у выделенной культуры не обнаружены.

Литература

1. Сиволодский ЕП. Систематика и идентификация энтеробактерий. СПб.: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Отдел новых технологий, 2011, 21 с.
2. Смирнова ЛИ, Забровская АВ, Приходько ЕИ, Ярикова ВЭ, Гегирова ДМ. Роль бактерий рода *Klebsiella* при ассоциированных инфекциях коров и телят в условиях промышленного комплекса. Международный вестник ветеринарии. 2014;2:7-12.
3. Багманов МА. Болезни репродуктивных органов и молочной железы у сельскохозяйственных животных. Методическое пособие для студентов факультета ветеринарной медицины. Ульяновск, 2001, с. 47-56.
4. Беляева ЕВ, Борискина ЕВ, Ермолина ГБ, Кичикова ВВ, Любавина НА, Макарова ЕВ, и др. Биологическая характеристика бактерий, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, при хронических заболеваниях. Медицинский альманах. 2009;2(7):114-7.
5. Сухинин АА, Макавчик СА, Прасолова ОВ, Виноходова МВ. Применение полимеразной цепной реакции в молекулярной диагностике инфекционных болезней животных. Учебное пособие. СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017, 96 с.
6. Митрофанова НН, Мельников ВЛ, Миронова ЕН, Ковешникова ТМ. Динамический анализ особенностей структуры и антибиотикорезистентности микрофлоры многопрофильных лечебно-профилактических учреждений. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2008;4:3-10.
7. Сухинин АА, Смирнова ЛИ, Тулева НП, и др. Практикум по диагностике бактериальных болезней животных. СПб.: Издательство ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2015, 90 с.
8. Арутюнова ИП, Швец МИ. Микрофлора молока коров при маститах. В кн.: Актуальные проблемы повышения эффективности агропромышленного комплекса. Курск: Курская государственная сельскохозяйственная академия им. профессора И.И.Иванова, 2008, с. 196-8.
9. Islam MR, Ahamed MS, Alam MS. Identification and antibiotic sensitivity of the causative organisms of subclinical mastitis in sheep and goats. Pak Vet. 2012;2(32):179-82.
10. Kumar R, Gupta DK, Bansal BK. Prevalence, current antibiogram and risk factors associated with mastitis in dairy goats in Punjab. International Journal of Science, Environment and Technology. 2016;6(5).

References

1. Sivolodskii EP. Sistematika i identifikatsiya enterobakterii. St. Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute, 2011, 21 p. (In Russian).
2. Smirnova L, Zabrovskaya A, Prikhodko E, Yarikova V, Gegirova D. The role of bacteria *Klebsiella* when associated infections cows and calves in the conditions of an industrial complex. International bulletin of Veterinary Medicine. 2014;2: 7-12. (In Russian).
3. Bagmanov MA. Bolezni reproduktivnykh organov i molochnoi zhelezy u sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh.. Ul'yanovsk, 2001, pp. 47-56. (In Russian).
4. Beliaeva EV, Borisikina EV, Ermolina GB, Kichikova VV, Lubavina NA, Makarova EV, et al. Biological characteristic of bacteria colonizing mucous coat of breathing passages in case of chronic diseases. Medical Almanac. 2009;2(7):114-7. (In Russian).
5. Sukhinin AA, Makavchik SA, Prasolova OV, Vinokhodova MV. Primenenie polimeraznoi tsepoi reaktsii v molekulyarnoi diagnostike infektsionnykh boleznei zhivotnykh. St. Petersburg, 2017, 96 p. (In Russian).
6. Mitrofanova NN, Mel'nikov VL, Mironova EN, Koveshnikova TM. Dinamicheskii analiz osobennostei struktury i antibiotikorezistentnosti mikroflory mnogoprofil'nykh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdenii. University proceedings. Volga region. Medical sciences. 2008;4:3-10. (In Russian).
7. Sukhinin AA, Smirnova LI, Tuleva NP, et al. Praktikum po diagnostike bakterial'nykh boleznei zhivotnykh. St. Petersburg, 2015, 90 p. (In Russian).
8. Arutyunova IP, Shvets MI. Mikroflora moloka korov pri mastitakh. In: Aktual'nye problemy povysheniya effektivnosti agropromyshlennogo kompleksa. Kursk, 2008, pp. 196-8. (In Russian).
9. Islam MR, Ahamed MS, Alam MS. Identification and antibiotic sensitivity of the causative organisms of subclinical mastitis in sheep and goats. Pak Vet. 2012; 2(32):179-82.
10. Kumar R, Gupta DK, Bansal BK. Prevalence, current antibiogram and risk factors associated with mastitis in dairy goats in Punjab. International Journal of Science, Environment and Technology. 2016;6(5).

Информация о соавторе:

Макавчик Светлана Анатольевна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины» Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5 Телефон: (812) 388-2086 E-mail: groza81@mail.ru

Information about co-author:

Svetlana A. Makavchik, PhD (Vet.), associate professor of the department of microbiology, virology and immunology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation Phone: (812) 388-2086 E-mail: groza81@mail.ru