

УДК 636.09:57.017.4:57.063.8:579.84:615.33

ПІНЧУК Н.Г., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: pinchuk.2578@gmail.com

ЧУМАЧЕНКО В.В., д-р вет. наук, ст. наук. сп.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ВИВЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ МЕТОДОМ РОЗВЕДЕНЬ В АГАРІ

У даній статті представлені матеріали щодо розробки основних принципів до постановки методу послідовних розведень в агарі і вивчено чутливість 47 ізолятів *Er. rhusiopathiae* до АБП методом послідовних розведень в агарі. Встановлено, що найбільш придатним поживним середовищем для проведення тестування *Er. rhusiopathiae* методом послідовних розведень в агарі є ТСА з додаванням 0,1% Твін-80. Вивчено чутливість 47 ізолятів *Er. rhusiopathiae* до 17 АБП методом послідовних розведень в агарі.

Встановлено, що всі епізоотичні ізоляти *Er. rhusiopathiae* (47) були високо чутливими до PC-G, APC, EM та 100 % резистентними до KM, CZ, SZ, SDM. Виявлено фторхінолон-резистентні культури *Er. rhusiopathiae* до ENR, NX та LE.

Ключові слова: антибактеріальні препарати (АБП), антибіотикорезистентність, антибіотикочутливість, бешиха свиней, мінімальні пригнічуючі концентрації (МПК).

Вступ. Основною метою визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів (АБП) є прогнозування їх ефективності при лікуванні інфекційних захворювань тварин. Крім того, визначення чутливості мікроорганізмів набуває все більш важливого значення в зв'язку з появою і широким поширенням антибіотикорезистентності у бактерій [1].

На сьогодні теоретично найбільш обґрунтованим є комплекс підходів до оцінки чутливості і інтерпретації результатів, запропонований Європейським комітетом з визначення чутливості до антибактеріальних препаратів (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST*).

Основним параметром, що характеризує взаємовідношення між мікробом і антибактеріальним препаратом, є величина мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК) препарату. МПК визначають як мінімальну концентрацію, яка пригнічує видимий ріст мікроорганізму. В якості основного методу визначення МПК розглядають метод послідовних розведень. Референтним вважається метод послідовних мікророзведень, регламентований міжнародним стандартом ISO 20776-1: 2006 [2].

В останні роки в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) ведеться активна робота зі створення банку даних щодо резистентності бактерій до антибактеріальних препаратів. Аналіз літературних джерел показав [3–4], що в популяціях багатьох патогенних і непатогенних мікроорганізмів за останні десятиріччя спостерігається зростання рівня антибіотикорезистентності. Не є винятком і представники роду *Erysipelothrix*.

Поява штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae*, стійких до еритроміцину і окситетрацикліну, вперше було описано Takahashi і ін. [5]. На сьогодні в Україні відсутні дані щодо чутливості епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* до АБП і наявності / відсутності антибіотикорезистентності у цих бактерій.

Залежно від виду мікроорганізмів проводять дослідження їх чутливості до певних наборів антибіотиків: обов'язкового і додаткового.

Результати досліджень *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* [6] свідчать, що *Er. rhusiopathiae* є вибагливим мікроорганізмом до поживності середовища вирощування і умов культивування. В даний час керівні принципи з оцінки чутливості *Er. rhusiopathiae* до антибактеріальних препаратів відносяться до методу послідовних розведень в бульйоні і відсутні рекомендації до постановки методу послідовних розведень в агарі.

В більшості країн світу для тестування не вибагливих до поживних середовищ бактерій використовується Мюллера-Хінтон агар, для якого розроблені та постійно переглядаються критерії інтерпретації результатів визначення чутливості до великої кількості (>70) сучасних АБП та контрольні значення діаметрів зон затримки росту для референтних штамів [7]. Аналіз літературних джерел свідчить, що на результати визначення чутливості бактерій *in vitro* будь-яким методом впливають багато факторів, такі як склад, *pH* [8], товщина шару агару в чашці Петрі [9] та вологість поживного середовища, вміст в ньому двохвалентних катіонів Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} [10–11], тиміну і тимідину [12], умови культивування (температура, атмосфера), швидкість дифузії АБП в агар тощо [13]. Тому, при визначенні чутливості бактерій різних видів до АБП необхідно використовувати спеціальні, найбільш придатні для даного виду бактерій за ростовими властивостями та складом, поживні середовища, суворо дотримуватись умов тестування, проводити внутрішній контроль якості [1, 14].

Виходячи із зазначеного вище, ці актуальні положення і визначили вибір напрямків наших досліджень і методи виконання роботи.

Метою даної роботи було розробка основних принципів до постановки методу послідовних розведень в агарі і вивчення чутливості епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* до АБП методом послідовних розведень в агарі.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для дослідження були 47 ізолятів збудника бешихи свиней, виділені з патологічного матеріалу загиблих свиней з різних регіонів України. Вивчення чутливості ізолятів *Er. rhusiopathiae* проводили до 17 антибактеріальних препаратів: пенициліну G (PC-G), ампіциліну (APC), канаміцину (KM), гентаміцину (GEN), неомицину (NEO), еритроміцину (EM), дигідрострептоміцину (DSM), окситетрацикліну (OTC), доксицикліну (DOX), цефазоліну (CZ), сульфадіазину (SZ), сульфадиметоксину (SDM), енрофлоксацину (ENR), норфлоксацину (NX), левофлоксацину (LE), лінкомицину (LCM), хлорамфеніколу (CP).

При проведенні досліджень методом послідовних розведень в агарі, нами були використані наступні дослідні поживні середовища: Мюллера-Хінтон (МХА), триптон-соевий (ТСА) та серцево-мозковий агар (СМА), м'ясопептонний агар Хоттінгера (МПА Хоттінгера) в різних варіантах (180-200 мг% амінного азоту): без додавань; з додаванням 5% дефібринованої крові барана; 0,1% Твін-80.

В якості референтних штамів при розробці основних принципів до постановки методу послідовних розведень в агарі були використані *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 19414.

Для визначення МПК певні концентрації АБП (найчастіше з 2-кратним кроком) вносять в поживне середовище, яке потім засівають культурою досліджуваного мікроорганізму і після інкубації оцінюють наявність або відсутність видимого росту. Відомі два основні варіанти

постановки методу послідовних розведень: в агарі і в бульйоні. Метод послідовних розведень в бульйоні, в свою чергу, може виконуватися в макро- і мікро-варіанті (в обсязі $\leq 0,2$ мл).

Метод серійних розведень в агарі дозволяє одночасно визначати МПК до 15-30 штамів мікроорганізмів.

Принцип методу полягає в посіві культур мікроорганізмів, що тестуються на чашки Петрі з агаром, що містить послідовні подвійні розведення антибіотиків. Одночасно проводиться тестування культур досліджуваних мікроорганізмів і відповідних референтних штамів, а також контроль росту мікроорганізмів на чашках без АБП і контроль чистоти культури шляхом висіву зразків інкулюму на неселективні поживні середовища.

Спочатку готували основні розчини антибіотиків з відомою активністю в концентрації $1000 \text{ мкг} / \text{см}^3$. Для цього робили наважку на електронних вагах і розчиняли в 1 см^3 розчинника. Для приготування робочих розчинів основні розчини розбавляли конкретним для кожної антибіотичної речовини розчинником. З робочих розчинів готували дворазові розведення. При розрахунках брали кінцеву концентрацію АБП в поживному середовищі, що дорівнювала $1 \text{ мкг} / \text{см}^3$ з урахуванням розбавлення розчинів в поживному середовищі. Дворазові розведення повинні бути вищі, ніж $1 \text{ мкг} / \text{см}^3$, тобто 2, 4, 8, 16 і т.д. $\text{мкг} / \text{см}^3$, і більш низькі – 0,5, 0,25, 0,125 і т.д. $\text{мкг} / \text{см}^3$.

Попередньо ізоляти *Er. rhusiopathiae* вирощували на м'ясопептонному агарі Хоттінгера з додаванням 10% інактивованої сироватки крові коня і 1% 40% глюкози протягом 24-48 годин. Петлею відбирали матеріал з верхньої частини декількох колоній (не менше 8-10), переносили в стерильний фізіологічний розчин і доводили щільність мікробної суспензії до $(1,5 \times 10^8) \text{ КУО} / \text{см}^3$, використовуючи стандарт 0,5 по МакФарланду.

Кінцева посівна доза досліджуваного мікроорганізму на поверхні поживного середовища складала 10^4 КУО. Оскільки стандартна бактеріологічна петля діаметром 3 мм переносить 1-2 мкл рідини, концентрація мікроорганізмів у вихідній суспензії становила 10^7 КУО/ см^3 . Таку концентрацію було отримано при розведенні стандартної мікробної суспензії, що відповідала стандарту 0,5 по МакФарланду, в 10 раз. Після приготування цю суспензію, яку називають інкулюмом, інкулювали на поверхню агару впродовж 15хвилин після приготування, при цьому утворювалася пляма діаметром 5-8 мм.

АБП додавали в різних робочих розведеннях до розплавленого і охолодженого до 48-50° С дослідного агару в співвідношенні 1:9. Середовище з препаратом ретельно перемішували і розливали в чашки Петрі, товщина шару дослідного поживного середовища становила 3-4 мм. Стандартну мікробну суспензію бактеріологічною петлею діаметром 3 мм переносили у вигляді плями на агар з усіма концентраціями АБП. Засіяні таким чином чашки Петрі поміщали в термостат на 24-48 годин за температури $(35 \pm 0,2)^\circ \text{C}$. Облік проводили, поміщаючи чашку на темну поверхню. За мінімальну концентрацію брали ту, яка викликала повне пригнічення видимого росту.

Результати досліджень та їх обговорення. Враховуючи вимогливість бактерій *Erysipelothrix rhusiopathiae* до поживних середовищ [6, 15], першочерговим завданням при виконанні досліджень було порівняльне вивчення інтенсивності росту епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* і референтних штамів на різних за складом поживних середовищах з метою використання їх в подальшому для розробки основних принципів до постановки методу послідовних розведень в агарі і вивчення чутливості епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* до АБП методом послідовних розведень в агарі.

Результати порівняльного вивчення інтенсивності росту епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* і референтних штамів (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 19414) на досліджуваних нами середовищах представлені в таблиці 1.

Результати досліджень, представлені в таблиці 1, дають підстави для використання як найбільш придатних за ростовими властивостями при тестуванні чутливості бактерій *Er. rhusiopathiae* до АБП методом послідовних розведень в агарі наступні середовища: **триптон-соєвий агар з додаванням 5% дефібринованої крові барана та триптон-соєвий агар з додаванням 0,1% Твін-80** за температури (35 ± 0,2)° С впродовж 24 годин.

Таблиця 1

Результати дослідження інтенсивності росту епізоотичних ізолятів *Erysipelothrix rhusiopathiae* контрольних штамів мікроорганізмів на різних поживних середовищах

Штами	Дослідні поживні середовища											
	Мюллера-Хінтон агар (МХА)			Триптон-соєвий Агар (ТСА)			Серцево-мозковий агар (СМА)			Мясопептонний агар Хоттінгера (МПА Хоттінгера)		
	Без домішок	ДКБ*	Твін-80	Без домішок	ДКБ*	Твін-80	Без домішок	ДКБ*	Твін-80	Без домішок	ДКБ*	Твін-80
<i>Er. Rhusiopathiae</i>	слабкий ріст	слабкий ріст	ріст відсутній	слабкий ріст	інтенсивний ріст	інтенсивний ріст	слабкий ріст	слабкий ріст	слабкий ріст	слабкий ріст	слабкий ріст	слабкий ріст
Контрольні штам	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка: ДКБ* - з додаванням 5% дефібринованої крові барана; «+» - інтенсивний ріст

Наступним етапом наших досліджень було вивчення чутливості епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* до АБП методом послідовних розведень в агарі на ТСА з додаванням 5% дефібринованої крові барана та ТСА з додаванням 0,1% Твін-80 (табл. 2).

При розробці основних принципів до постановки методу послідовних розведень в агарі і вивченні чутливості *Er. rhusiopathiae* до АБП методом послідовних розведень в агарі нами було взято до уваги чіткість зон затримки росту дослідних культур. Встановлено, що на ТСА з додаванням 0,1% Твін-80 зони затримки росту більш чіткі та добре виражені в порівнянні з зонами, отриманими на ТСА з додаванням 5% дефібринованої крові барана. В подальшому при вивченні чутливості епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* до АБП методом послідовних

розведень в агарі нами було використано ТСА з додаванням 0,1% Твін-80 за температури $(35 \pm 0,2)^\circ \text{C}$ впродовж 24 годин.

Результати досліджень, представлені в таблиці 2, свідчать, що всі епізоотичні ізоляти *Er. rhusiopathiae* (47) були високо чутливими до *PC-G*, *APC* (МПК $\leq 0,0625$ мкг/см³), *EM* (МПК $\leq 0,125$ мкг/см³) та 100 % резистентними до *KM*, *CZ*, *SZ*, *SDM* (МПК > 128 мкг/см³). Кількість ізолятів, резистентних до *GEN*, *NEO*, *DSM*, *OTC*, *DOX*, *LCM* та *CP* становили 46 (97,9 %), 43 (91,5 %), 31 (66,0 %), 27 (57,4 %), 18 (38,1 %), 36 (76,6 %) та 42 (89,4 %) відповідно.

Паралельно нами було проведено визначення МПК 47 ізолятів *Er. rhusiopathiae* до 17 АБП методом послідовних мікророзведень в бульйоні згідно рекомендацій *CLSI* та отримано аналогічні результати МПК з методом послідовних розведень в агарі.

Не дивлячись на те, що згідно літературних даних [4, 15] культури *Er. rhusiopathiae* є високочутливими до фторхінолонів, нами у деяких з досліджуваних ізолятів, виділених з різних регіонів України, все ж було виявлено резистентність до *ENR*, *NX* та *LE*: 3 (6,4 %), 34 (72,3 %) та 32 (68,1 %) відповідно. Поява фторхінолон-резистентних культур *Er. rhusiopathiae* дають підстави стверджувати про надмірне та неконтрольоване використання АБП групи фторхінолонів у ветеринарній медицині.

Висновки.

1. Встановлено, що найбільш придатним поживним середовищем для проведення тестування *Er. rhusiopathiae* методом послідовних розведень в агарі є триптон-соевий агар (ТСА) з додаванням 0,1% Твін-80 за температури $(35 \pm 0,2)^\circ \text{C}$ впродовж 24 годин та розроблено основні принципи до постановки методу послідовних розведень в агарі.

2. Встановлено, що метод послідовних розведень в агарі може бути використаний для визначення антибіотикочутливості *Er. rhusiopathiae* і дозволяє одночасно визначати МПК до 15-30 штамів мікроорганізмів.

3. Вивчено чутливість 47 епізоотичних ізолятів *Er. rhusiopathiae* до 17 АБП методом послідовних розведень в агарі.

4. Встановлено, що всі епізоотичні ізоляти *Er. rhusiopathiae* (47) були високо чутливими до *PC-G*, *APC* (МПК $\leq 0,0625$ мкг/см³), *EM* (МПК $\leq 0,125$ мкг/см³) та 100 % резистентними до *KM*, *CZ*, *SZ*, *SDM* (МПК > 128 мкг/см³). Кількість ізолятів, резистентних до *GEN*, *NEO*, *DSM*, *OTC*, *DOX*, *LCM* та *CP* становили 46 (97,9 %), 43 (91,5 %), 31 (66,0 %), 27 (57,4 %), 18 (38,1 %), 36 (76,6 %) та 42 (89,4 %) відповідно.

5. Виявлено фторхінолон-резистентні епізоотичні ізоляти *Er. rhusiopathiae* до *ENR*, *NX* та *LE*: 3 (6,4 %), 34 (72,3 %) та 32 (68,1 %) відповідно.

Перспективи подальших досліджень. Результати антибіотирезистентності культур *Er. rhusiopathiae*, виділених з патологічного матеріалу загиблих свиней з різних регіонів України дають підстави для конструювання селективного поживного середовища, призначеного для виділення бактерій збудника бешихи свиней з об'єктів довкілля, біологічного та патологічного матеріалів, а також, враховуючи їх резистентність, правильно та раціонально підбирати та використовувати АБП для лікування свиней, хворих на бешиху.

**МПК антимікробних препаратів для 47 ізолятів *Erysipelothrix rhusiopathiae*
Визначення**

Назва АБП	МПК (мкг/см ³) для епізоотичних ізолятів <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>													
	<0,0625	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Пеніцилін G (PC-G)	6	40	1											
Ампіцилін (APC)	6	39	2											
Канаміцин (KM)														47
Гентаміцин (GEN)											1	22	15	9
Неоміцин (NEO)										1	3	5		38
Еритроміцин (EM)		16	23	8										
Дигідрострептоміцин (DSM)									16	5	3	2		21
Окситетрациклін (OTC)					1	3	16			6	19	2		
Доксициклін (DOX)				3	4	1	1	2	18	5	13			
Цефазолін (CZ)														47
Сульфадіазін (SZ)														47
Сульфадиметоксин (SDM)														47
Енрофлоксацин (ENR)		4	37	3					2	1				
Норфлоксацин (NX)								2	11	17	13	4		
Левовфлоксацин (LE)						2	13	24	5	2	1			
Лінкоміцин (LCM)				3	4	2	1	1	2	21	11	2		
Хлорамфенікол (CP)								5	39	3				

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. – 2001. – № 21 (1).
2. ISO 20776-1:2006 CLINICAL LABORATORY TESTING AND IN VITRO DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS – SUSCEPTIBILITY TESTING OF INFECTIOUS AGENTS AND EVALUATION OF PERFORMANCE OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST DEVICES – PART 1: REFERENCE METHOD FOR TESTING THE IN VITRO ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL AGENTS AGAINST RAPIDLY GROWING AEROBIC BACTERIA INVOLVED IN INFECTIOUS DISEASES
3. Association of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food-producing animals with antimicrobial use in farms / Asai T., Harada K., Ishihara K., Kojima A., Sameshima T., Tamura Y. and Takahashi T. // Jpn. J. Infect. Dis. – 2007. – № 60. – P. 290-294.
4. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan 1988-1998 / Yamamoto K., Kijima M., Yoshimura H. and Takahashi T. // J. Vet. Med. 2001. – В 48. – P. 115-126.

5. Antibiotic resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with chronic swine erysipelas / Takahashi T., Sawada T., Ohmae K., Terakado N., Muramatsu M., Seto K., Maruyama T. and Kanzaki M. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1984. – № 25. – P. 385-386.
6. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline CLSI document M45-A // Clinical and laboratory Standards Institute. – 2006. – Wayne, PA.
7. Mueller J.H., Hinton J. A protein-free medium for isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus* // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1941. – № 48. – P. 330–333.
8. Houang E.T., Hince C., Howard A.J. The effect of composition of culture media on MIC values of antibiotics. In: Russel A.D., Quesnel L.B., editors. Antibiotics: assessment of antimicrobial activity and resistance // The Society of Applied Bacteriology Technical. – 1983. – № 18. – P. 31-48.
9. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method / Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. Turck M. // Am. J. Clin. Pathol. – 1966. – № 45. – P. 493-496.
10. D'Amato R.F., Thornsberry C., Baker C.N. Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracycline, gentamicin, polymixin B and carbenicillin // Antimicrob. Agents Chemother. – 1975. – № 7. – P. 596-600.
11. Чайковская С.М., Навашин С.М., Точеная Н.П. Изменения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам под влиянием ионов двухвалентных металлов // Антибиотики. – 1978. – № 2. – С. 118-122.
12. Bushby S.R.M. Trimethoprim-Sulfamethoxazole: *in vitro* microbiological aspects // J. Infect. Dis. – 1973. – № 128. – P. 442-462.
13. Cooper K.E. The theory of antibiotic inhibition zones. In: Kavanagh F., editor // Analytical microbiology. New York: Academic Press. – 1964. – P. 1-86.
14. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology / Vandepitte J., Engbaek K., Piot P., Heuck C.C. // Geneva: World Health Organization. – 1991.
15. Antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs in Southern Japan with a modified agar dilution method / Chuma T., Kawamoto T., Shahada F., Fujimoto H. and Okamoto K. // J. Vet. Med. Sci. – 2010. – № 72 (5). – P. 643-645.

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИЗОЛЯТОВ *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ МЕТОДОМ РАЗВЕДЕНИЙ В АГАРЕ / Н.Г. Пинчук, В.В. Чумаченко

*В данной статье представлены материалы по разработке основных принципов к постановке метода последовательных разведений в агаре и изучено чувствительность 47 изолятов *Er. rhusiopathiae* к АБП методом последовательных разведений в агаре. Установлено, что наиболее подходящей питательной средой для проведения тестирования *Er. rhusiopathiae* методом последовательных разведений в агаре является ТСА с добавлением 0,1% Твин-80. Изучено чувствительность 47 изолятов *Er. rhusiopathiae* к 17 АБП методом последовательных разведений в агаре.*

*Установлено, что все эпизоотические изоляты *Er. rhusiopathiae* (47) были высоко чувствительными к РС-G, АРС, ЕМ и 100% резистентными к КМ, СЗ, SZ, SDM. Выявлено фторхинолон-резистентные культуры *Er. rhusiopathiae* к ENR, NX и LE.*

Ключевые слова: *антибактериальные препараты (АБП), антибиотикорезистентность, антибиотикоустойчивость, рожа свиней, минимальные подавляющие концентрации (МПК).*

STUDY OF THE SUSCEPTIBILITY OF *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* ISOLATED TO ANTIBACTERIAL DRUGS BY THE AGAR DILUTION METHOD / N.G. Pinchuk, V.V. Chumachenko

Introduction. *The main purpose of determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs (ADP) is to predict their efficiency in the treatment of infectious diseases of animals. Currently, data on*

the sensitivity of epizootic isolated *Er. rhusiopathiae* are not available in Ukraine to ABP and the presence / absence of antibiotic resistance in these bacteria.

The goal of the work was the development of basic principles of agar successive dilution method and the study of the sensitivity of epizootic isolated *Er. rhusiopathiae* to ABP by agar successive dilution method.

Materials and methods. Materials for the study were 47 isolated of the pathogens of pigs, isolated from the pathological material of dead pigs from different regions of Ukraine. Studying the sensitivity of isolated *Er. rhusiopathiae* was administered to 17 ABP: PC-G, APC, KM, GEN, NEO, EM, DSM, OTC, DOX, CZ, SZ, SDM, ENR, NX, LE, LCM, CP.

The following experimental nutrient media: MHA, TCA, HBA and Hottinger meat-pepton agar (180-200 mg% of amine nitrogen) were used in various experiments using agar successive dilution method in variants: without additives; with the addition of 5% of the DHB; 0.1% Tween 80

Results of research and discussion. It has been established that the TSA with a 0.1% Tween-80 increase in growth retardation zones is more distinct and well expressed compared to those obtained on the TSA with the addition of 5% of the DHB. In the future, in studying the sensitivity of epizootic isolated *Er. rhusiopathiae* to ABP by agar successive dilution method, we used TSA with 0.1% Tween-80 at a temperature of $(35 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ for 24 hours.

The results of the studies indicate that all epizootic isolated *Er. rhusiopathiae* (47) were highly sensitive to PC-G, APC, EM and 100% resistant to KM, CZ, SZ, SDM. The number of isolated resistant to GEN, NEO, DSM, OTC, DOX, LCM and CP was 46 (97.9%), 43 (91.5%), 31 (66.0%), 27 (57.4%), 18 (38.1%), 36 (76.6%) and 42 (89.4%) respectively. In some of the isolated from different regions of Ukraine, we found resistance to ENR, NX and LE: 3 (6.4%), 34 (72.3%) and 32 (68.1%), respectively.

Conclusions and prospects for further research. Sensitivity of 47 epizootic isolated *Er. rhusiopathiae* was studied to 17 ABP by agar successive dilution method. Fluoroquinolone-resistant epizootic isolated *Er. rhusiopathiae* detected to ENR, NX and LE.

Keywords: antibacterial drugs (ABP), antibiotic resistance, antibiotic susceptibility, swine erysipelas, minimal inhibitory concentrations (MIC).

REFERENCES

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement (2001) 21 (1) [in English].
2. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases (2006) *ISO 20776-1:2006* [in English].
3. Asai T., Harada K., Ishihara K., Kojima A., Sameshima T., Tamura Y. et al. (2007) Association of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food-producing animals with antimicrobial use in farms. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60, 290-294 [in English].
4. Yamamoto K., Kijima M., Yoshimura H. and Takahashi T. (2001) Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan 1988-1998. *J. Vet. Med.*, 48., 15-126 [in English].
5. Takahashi T., Sawada T., Ohmae K., Terakado N., Muramatsu M., Seto K. et al. (1984) Antibiotic resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with chronic swine erysipelas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 385-386 [in English].
6. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline CLSI document M45-A (2006). *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, PA. [in English].
7. Mueller J.H., Hinton J. (1941) A protein-free medium for isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 48., 330-333 [in English].

8. Houang E.T., Hince C., Howard A.J. (1983) The effect of composition of culture media on MIC values of antibiotics. *Antibiotics: assessment of antimicrobial activity and resistance* Russel A.D., Quesnel L.B., editors. The Society of Applied Bacteriology Technical., 18, 31-48 [in English].
9. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-496 [in English].
10. D'Amato R.F., Thornsberry C., Baker C.N. (1975) Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of Pseudomonas species to tetracycline, gentamicin, polymixin B and carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 596-600 [in English].
11. Chajkovskaja S.M., Navashin S.M., Tochenaja N.P. Izmenenija chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibiotikam pod vlijaniem ionov dvuhvalentnyh metallov // Antibiotiki. – 1978. – № 2. – S. 118-122.
12. Bushby S.R.M. (1973) Trimethoprim-Sulfamethoxazole: in vitro microbiological aspects. *J. Infect. Dis.* 128, 442-462 [in English].
13. Cooper K.E. (1964) The theory of antibiotic inhibition zones. *Analytical microbiology* Kavanagh F., editor. New York: Academic Press. P. 1-86 [in English].
14. Vandepitte J., Engbaek K., Piot P., Heuck C.C. (1991) Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. *Geneva: World Health Organization* [in English].
15. Chuma T., Kawamoto T., Shahada F., Fujimoto H. and Okamoto K. (2010) Antimicrobial susceptibility of Erysipelothrix rhusiopathiae isolated from pigs in Southern Japan with a modified agar dilution method. *J. Vet. Med. Sci.* 72 (5), 643-645 [in English].

УДК 619:616-03:616.9:57.083.3

ПОЛЯКОВ И., e-mail: iv.pol@binomed.de

ИВАНОВА Л.

БИНОМЕД ГмбХ, Германия (BINOMED GmbH, Ulm, Germany)

НОВЫЕ ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ В СОЗДАНИИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

В статье приведены результаты испытания лечебной и профилактической эффективности нового иммунобиологического препарата – аналога фракции клеточной стенки грибов для лечения и профилактики дерматита пальцев, межпальцевого свода, кожного некробактериоза крупного рогатого скота. Впервые при помощи синтетического аналога клеточной стенки грибов (Биновак® IDD) удалось не только лечить инфекционные болезни конечностей крупного рогатого скота, но и предотвращать проявление этих болезней в течение 150 дней. Механизм создания такой невосприимчивости еще предстоит изучить.

Ключевые слова: коллоидный полисахарид; профилактика, лечение болезней копытца.

Введение. Исследованиями в области инфекционной патологии было показано, что элиминация патогенных микроорганизмов невозможна без стимуляции клеточного иммунитета. Без воспаления невозможно предотвратить проникновение патогена в организм, но с другой стороны, повышенная воспалительная реакция ведет к разрушению тканей организма, нарушению функций органов и другой необратимой патологии, включая возникновение аллергии и аутоиммунных процессов.