УДК: 636.7:636.09: 579.6
DOI: 10.31073/vet_biotech43-16

ТУЯХОВ М.Ф., email: vetmeddpss@ukr.net
Національний університет біоресурсів та природокористування України

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ СТАФІЛОКОКІВ ЗА ОТИТУ У СОБАК

У статті наведені результати вивчення чутливості ізолятів стафілококів, виділених від собак, до антибіотиків за отиту.

Як показали результати досліджень, серед мікроорганізмів кокової групи превалювали Staphylococcus aureus – 54,1% та Staphylococcus pseudintermedius (29,2%).

Під час дослідження чутливості до антибактеріальних препаратів представників S. aureus виявлено, що серед метицилін-резистентних ізолятів висока чутливість спостерігалася лише до ванкоміцину, офлоксацину, гентаміцину та марбофлоксацину. Ізоляти S. pseudintermedius виявилися чутливими до цефалоспорину першого покоління – цефазоліну, триметоприм-сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину, офлоксацину та менше – до норфлоксацину.

Високою резистентністю до більшості тестованих антибіотиків відзначилися представники S. epidermidis. Так, суттєво пригнічували ріст збудника лише ванкоміцин, іміпенем, офлоксацин, меропенем, ципрофлоксацин та норфлоксацин. До інших антибіотиків збудник був слабко- або нечутливим.

Ключові слова: *собаки, мікробіологічні дослідження, живильні середовища, мікрофлора шкіри, мікробні ізоляти, отит, стафілококи, чутливість.*

Вступ. Зовнішній отит є найпоширенішим захворюванням вух у собак, на нього страждає до 20% популяції собак. Це захворювання поліетіологічної природи, проте переважно це мікробна інфекція. Серед клінічних ознак відзначають еритему, набряк, ексудацію, неприємний запах і свербіж [1–4]. Мікроорганізми-представники нормальної мікробної флори вушного каналу можуть стати патогенними, коли навколишнє середовище і/або первинні умови сприяють експресії їх факторів вірулентності [5–7]. Серед типових мікроорганізмів, яких найчастіше виділяють при зовнішньому отиті і/або дерматитах, є *Malassezia pachydermatis*, а також представники родів *Staphylococcus, Pseudomonas, Escherichia* та *Proteu*s [8, 9].

Серед грампозитивних бактерій саме *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus* (коагулазопозитивні) та коагулазонегативні *Staphylococcus epidermidis* – стафілококи, що найчастіше виділяють за піодермії, зовнішнього отиту, інфекцій сечовивідних шляхів та опортуністичних інфекцій у собак [10]. Протягом останніх років надходить все

більше повідомлень про появу полірезистентних ізолятів від тварин, хворих на бактерійний отит, які, безсумнівно, створюють високий ризик щодо ефективності призначеного лікування [11–14]. Тому визначення чутливості мікробних ізолятів за отитів у собак, особливо таких розповсюджених як стафілококи, необхідне для раціонального планування антибіотикотерапії та запобіганню селекції резистентних штамів.

Мета роботи. Визначення чутливості ізолятів стафілококів за отитів у собак для подальшого раціонального планування антибіотикотерапії та запобігання селекції резистентних штамів мікроорганізмів.

Матеріали і методи досліджень. Дослідними тваринами були собаки віком від 6 місяців до 10 років. За період з грудня 2019 року до вересня 2020 було досліджено 20 собак різних порід масою 5–55 кг, обох статевих груп, із симптомами отиту. Тварини були вакцинованими проти інфекційних хвороб, як стерилізовані, так і нестерилізовані. Дослідження проводили у лабораторії Маріупольської державної районної клініки ветеринарної медицини, у ветеринарних клініках Київської області «Animal Health» та «5-й елемент».

Собак включали в дослідження, якщо у них було діагностовано односторонній або двосторонній клінічний зовнішній отит, обґрунтований наявністю більш ніж одного з наступних клінічних ознак: дискомфорт, еритема вушного каналу, набряк чи наявність ексудату, спричиненого бактеріальною або грибковою інфекцією. У дослідження не включали тварин, якщо впродовж попередніх 5 днів вони отримували кортикостероїди короткотривалої або помірно короткотривалої дії, антибіотики і/або протигрибкові препарати, будь-який довготривалий системний кортикостероїд протягом попередніх 4 тижнів, або будь-який системний антибіотик чи протигрибковий препарат протягом попередніх 7 днів. Іншими причинами для виключення було: наявність новоутворень або інших мас, які закупорювали вушний канал, або розрив барабанної перетинки.

Діагноз (попередній та остаточний) ставили на підставі вивченого симптомокомплексу та результатів лабораторних аналізів.

Відбір проб для досліджень проводили за допомогою стерильного тампону – з уражених ділянок шкіри відбирали матеріал у спеціальні мікробіологічні контейнери із транспортним середовищем AMIES. Також відбирали ексудат у стерильні шприци. Десквамований епітелій у вигляді кірочок і лусочок, волосся відбирали у стерильні сухі культуральні пробірки. Також виготовляли мазки-відбитки із ексудату та зіскоби шкіри.

Після фіксації мазків, їх фарбували за Грамом та Романовського-Гімза, досліджували з використанням імерсійної системи світлового мікроскопу Vetscan HD microscope. Мікроскопічне дослідження зіскобів шкіри проводили

за стандартною методикою, препарати проглядали під малим та середнім збільшенням мікроскопа.

Висіви проводили за допомогою стерильних пастерівських піпеток, бактеріологічних петель чи тампонів із контейнерів з біоматеріалом на тверді та рідкі живильні середовища: МПА, кров'яний МПА, МПБ, МПЖ, агар Ендо і агар Сабуро у стерильні пластикові чашки Петрі та культуральні пробірки. Крім того, застосовували селективні середовища (кров'яний МПА із 8–10% хлористого натрію і 3,5% МПА із кристалічним фіолетовим). Культивування проводили за різних температурних режимів (25–37ºС) у термостаті. Культури проглядали через 12, 24, 48 годин. У разі появи колоній виготовляли мазки, які фарбували вказаними вище методами.

Визначення чутливості ізолятів до антибіотиків і протигрибкових препаратів здійснювали методом дифузії в агар (методом дисків). Для цього у стерильні бактеріологічні чашки наливали по 15–20 мл МПА. Після його затвердіння вносили 1 мл змиву агарової дводобової мікробної культури досліджуваного мікроорганізму, рівномірно розподіляючи рідину по поверхні. Після підсушування чашок з вмістом у термостаті протягом 15–20 хв. на поверхні агару стерильним пінцетом розкладали стандартні, просочені антибіотиками диски на відстані 2 см від краю чашки і 1 см один від одного. Чашки на 16–18 год. ставили догори дном у термостат і враховували результат. Для цього за допомогою міліметрової шкали вимірювали діаметр зон пригнічення росту мікробної культури. Оцінку чутливості мікроорганізму до антибіотика робили залежно від розміру зони пригнічення відповідно до стандартної шкали: якщо зона пригнічення росту не перевищувала 15 мм, мікроорганізм вважали слабко чутливим; 15–24 мм – чутливим; 25 і більше – високочутливим; за умови відсутності зони пригнічення росту мікроорганізм вважали нечутливим до цього антибіотика.

Результати досліджень та їх обговорення. Серед досліджуваних тварин двосторонній отит був виявлений у 8, односторонній – у 12 собак.

Як показали результати досліджень (табл. 1), серед мікроорганізмів кокової групи превалювали *Staphylococcus aureus* – 54,1% та *Staphylococcus pseudintermedius* – 29,2%.

У мазках з біоматеріалу *S. aureus* розміщувалися у вигляді типових невеликих скупчень, рідше поодиноко, за Грамом забарвлювалися позитивно. На МПА через 24 год. збудник формував випуклі середні колонії із слабким золотистим відтінком, на кров'яному МПА із 8–10% хлористого натрію навколо колоній відзначалася світла зона гемолізу, а на МПБ зумовлював помутніння та виразне випадіння осаду. Збудник виявляв виразну

плазмокоагулазну активність, розріджував желатину, ферментував глюкозу і лактозу з утворенням кислоти.

Таблиця 1

Мікробні ізоляти, виділені від собак різних вікових груп

Вік собак	Кількість випадків	Виділені мікроорганізми							
		Staphylococcus pseudintermedius	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus aureus	Proteus spp.	Pseudomonas aeruginosa	Malassezia pachydermatis	Candida spp.	Escherichia coli
До 2-х р.	8	7	–	3	2	2	2	–	–
2–4 р.	18	8	–	2	3	2	3	–	1
4–6 р.	11	3	2	4	–	2	1	–	2
6–8 р.	4	2	2	2	–	–	–	1	–
8–10 р.	4	3	–	3	3	1	1	–	–
> 10 р.	5	3	3		1	1	2	–	–
Всього	**48**	**26**	**7**	**14**	**9**	**8**	**9**	**1**	**3**
%	**100**	**54,1**	**14,6**	**29,2**	**18,8**	**16,7**	**18,8**	**2,1**	**6,3**

Серед коагулазо-позитивних коків також відзначено *S. pseudintermedius* (29,2%). На МПА на 18–20 год. ці мікроорганізми формували невеликі округлі непрозорі колонії з жовтуватим відтінком, на кров'яному МПА – блискучі колонії із зонами β-гемолізу.

У мазках відзначалося як поодиноке, так і парне розміщення Грам-позитивних мікробних клітин, а також у вигляді скупчень чи коротких ланцюжків. Збудник виявляв плазмо-коагулазну активність, розріджував желатину, ферментував глюкозу з утворенням кислоти.

Коагулазо-негативні стафілококи були представлені *S. epidermidis*, який на кров'яному МПА утворював невеликі випуклі округлі колонії жовтуватого кольору із зонами α-гемолізу. У мазках з культури збудник забарвлювався за Грамом позитивно, розміщувався у вигляді характерних невеликих скупчень (14,6%).

Результати вивчення дослідженні чутливості до антибактеріальних препаратів представників S. aureus.

Під час дослідження чутливості до антибактеріальних препаратів представників *S. aureus* виявлено, що серед 61 ізоляту 10 (16,4%) були метицилін-резистентними (табл. 2). Серед метицилін-резистентних ізолятів висока чутливість спостерігалася лише до ванкоміцину – зона пригнічення росту становила 31,6±3,05 мм, офлоксацину – 28,9±1,67 мм, гентаміцину –

29,0±4,12 мм, марбофлоксацину – 28,7±0,88 мм та ріфампіцину – зона пригнічення росту відповідно становила 25,8±1,76 мм.

Таблиця 2

Чутливість ізолятів *S. aureus* до антибіотиків

Антибіотик	Діаметр зони затримки росту, мм M±m, n = 10	
	метицилін-резистентні	метицилін-чутливі
Ванкоміцин	31,6±3,05	35,7±2,89
Гентаміцин	29,0±4,12	28,1±2,31
Офлоксацин	28,9±1,67	33,6±2,67
Марбофлоксацин	28,7±0,88	30,3±3,02
Ріфампіцин	25,8±1,76	25,9±3,20
Тікарцилін-клавуланат	12,87±2,11	31,3±4,11
Норфлоксацин	19,16±2,06	29,0±3,94
Ципрофлоксацин	18,6±3,15	27,6±3,79
Тетрациклін	–	–
Хлорамфенікол	–	12,4±2,05
Меропенем	–	21,4±2,15
Карбеніцилін	12,4±3,17	19,8±3,45
Цефтріаксон	–	18,1±1,30
Цефоперазон	–	18,2±4,04
Енрофлоксацин	22,1±3,05	25,6±3,07
Оксацилін	–	14±4,73
Цефотаксим	–	12,7±2,55
Ампіцилін	–	11,7±2,07
Цефазолін	–	25,18±4,56
Триметоприм+ сульфаметоксазол	–	22,6±1,77

Серед метицилін-резистентних ізолятів висока чутливість спостерігалася лише щодо ванкоміцину – зона пригнічення росту становила 31,6±3,05 мм, офлоксацину – 28,9±1,67 мм, гентаміцину – 29,0±4,12 мм, марбофлоксацину – 28,7±0,88 мм та ріфампіцину – зона пригнічення росту відповідно становила 25,8±1,76 мм.

Метицилін-чутливі стафілококи характеризувалися вираженою чутливістю до протимікробних препаратів. Так, препарати ванкоміцину, офлоксацину, марбофлоксацину, тікарцилін-клавуланату, норфлоксацину і ряду інших зумовлювали суттєве пригнічення росту *in vitro* – зони пригнічення відповідно становили 25,18±4,56 – 35,7±2,89 мм.

До ванкоміцину, гентаміцину, оксациліну, марбофлоксацину та тікарциліну-клавуланату були високочутливими практично 100% ізолятів метицилін-чутливих *S. aureus*. До цефазоліну, ципрофлоксацину та енрофлоксацину – 85, 92 та 95 % штамів відповідно. Резистентність до

хлорамфеніколу виявлено у 39,5% досліджуваних штамів стафілококів, і ще 40,8% штамів були слабко чутливими до цього препарату. Від 46 до 74,8% ізолятів були резистентними до дії канаміцину, лінкоміцину і тетрацикліну.

Результати вивчення дослідженні чутливості до антибактеріальних препаратів представників S. pseudintermedius.

Ізоляти *S. pseudintermedius* виявилися чутливими до цефалоспорину першого покоління – цефазоліну – зона пригнічення росту становила 34,5±3,21 мм; триметоприм-сульфаметоксазолу – зона пригнічення росту становила 28,6±2,14 мм; ципрофлоксацину – 26,9±4,16 мм; офлоксацину – 26,0±2,45 мм та менше – до норфлоксацину – 24,5±1,24 мм (табл. 3).

Цефалоспорини другого та третього покоління – цефотетан і цефтриаксон не так виразно пригнічували ріст збудника *in vitro* – зони пригнічення росту становили 19,7±2,34 та 20,1±1,12 мм відповідно, гентаміцин – 19,7±3,14 мм. Антибіотики доксициклін, ампіцилін та оксацилін не впливали на ріст мікроорганізму *in vitro*.

Таблиця 3

Чутливість ізолятів *S. pseudintermedius* до антибіотиків

Антибіотик	Діаметр зони затримки росту, мм M±m, n = 20
Цефазолін	34,5±3,21
Гентаміцин	19,7±3,14
Офлоксацин	26,0±2,45
Норфлоксацин	24,5±1,24
Ципрофлоксацин	26,9±4,16
Тетрациклін	–
Хлорамфенікол	–
Доксициклін	–
Цефтриаксон	20,1±1,12
Цефотетан	19,7±2,34
Енрофлоксацин	16,1±2,0
Оксацилін	–
Цефотаксим	–
Ампіцилін	–
Триметоприм+сульфаметоксазол	28,6±2,14

Результати вивчення дослідженні чутливості до антибактеріальних препаратів представників S. epidermidis.

Високою резистентністю до більшості тестованих антибіотиків відзначалися представники *S. epidermidis*. Так, суттєво пригнічували ріст збудника лише ванкоміцин: зона пригнічення росту відповідно становила 35,2±3,85 мм, іміпенем – 31,7±2,67 мм, офлоксацин – 30,8±3,45 мм, меропенем – 27,6±3,16 мм, ципрофлоксацин – 24,3±1,45 мм, норфлоксацин –

25,0±2,46 мм. До інших антибіотиків збудник був слабко- або нечутливим (табл. 4).

Таблиця 4

Чутливість ізолятів *S. epidermidis* до антибіотиків

Антибіотик	Діаметр зони затримки росту, мм, M±m, n = 20
Ванкоміцин	35,2±3,85
Цефтазидим	–
Тікарцилін	–
Норфлоксацин	25,0±2,46
Гентаміцин	14,1±1,65
Офлоксацин	30,8±3,45
Іміпенем	31,7± 2,67
Меропенем	27,6±3,16
Енрофлоксацин	14,8±2,34
Стрептоміцин	14±4,73
Ципрофлоксацин	24,3±1,45
Ампіцилін	–
Триметоприм+сульфаметоксазол	–

Як видно з табл. 5, серед досліджених ізолятів збудника до офлоксацину та ванкоміцину були чутливими 95,5–100% ізолятів, до імепенему та меропенему – 90,0–93,4%, до ципрофлоксацину, гентаміцину та енрофлоксацину – 65,2–71,5%.

Таблиця 5

Розподіл ізолятів *S. epidermidis in vitro* за чутливістю, %

Препарат	Високочутливих	Чутливих	Резистентних
Ванкоміцин	100	–	–
Офлоксацин	95,5	4,5	–
Імепенем	93,4	1,6	5,0
Меропенем	90,0	4,3	5,7
Ципрофлоксацин	71,5	18,5	20,0
Гентаміцин	66,7	10,3	23,0
Енрофлоксацин	65,2	7,8	27,0

Висновки та перспективи подальших досліджень. Як показали результати досліджень, серед мікроорганізмів кокової групи превалювали *Staphylococcus aureus* – 54,1% та *Staphylococcus pseudintermedius* – 29,2%.

Під час дослідження чутливості до антибактеріальних препаратів представників *S. aureus* виявлено, що серед метицилін-резистентних ізолятів висока чутливість спостерігалася лише щодо ванкоміцину, офлоксацину, гентаміцину та марбофлоксацину.

Ізоляти *S. pseudintermedius* виявилися чутливими до цефалоспорину першого покоління – цефазоліну, триметоприм-сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину, офлоксацину та менше – до норфлоксацину.

Високою резистентністю до більшості тестованих антибіотиків відзначалися представники *S. epidermidis*. Так, суттєво пригнічували ріст збудника лише ванкоміцин, іміпенем, офлоксацин, меропенем, ципрофлоксацин та норфлоксацин. До інших антибіотиків збудник був слабко- або нечутливим.

На підставі отриманих даних планується подальше вивчення чутливості мікробних ізолятів шкіри до антибіотиків, зокрема збудників групи коків, з подальшим удосконаленням антибіотикотерапії тварин, хворих на отити, особливо із превалюванням метицилін-резистентних стафілококів.

INVESTIGATION OF THE SENSITIVITY OF STAPHYLOCOCUS ISOLATES IN DOGS WITH OTITIS / Tuyakhov M.F.

Introduction. *Otitis externa is the most common ear disease in dogs, affecting up to 20% of the dog population. This disease is polyetiological in nature, but it is mainly a microbial infection.*

Malassezia pachydermatis, as well as representatives of the genera Staphylococcus, Pseudomonas, Escherichia and Proteus are the most typical causative agents most often isolated from dogs with otitis externa and/or pyoderma.

The goal of the work. *Determination of sensitivity of staphylococcal isolates for otitis in dogs for further rational planning of antibiotic therapy and prevention of selection of resistant strains of microorganisms.*

Materials and methods. *Experimental animals were dogs from 6 months to 10 years. During the period from December to September 2020, 20 dogs of various breeds weighing 5–55 kg of both sexes with otitis symptoms were examined.*

Determination of the sensitivity of isolates to antibiotics and antifungal drugs was carried out by the method of diffusion in agar (disc method).

Results of research and discussion. *As the research results showed, Staphylococcus aureus – 54.1% and Staphylococcus pseudintermedius (29.2%) prevailed among the microorganisms of the coccal group.*

Among methicillin-resistant isolates of S. aureus, high sensitivity was observed only to vancomycin, ofloxacin, gentamicin and marbofloxacin. Isolates of S. pseudintermedius were sensitive to first-generation cephalosporins – cefazolin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin, ofloxacin, and lesser extent – to norfloxacin.

Representatives of S. epidermidis were highly resistant to most of the tested antibiotics. Thus, only vancomycin, imipenem, ofloxacin, meropenem, ciprofloxacin and norfloxacin significantly inhibited the growth of the pathogen. The isolates were slightly sensitive or resistant to other antibiotics.

Conclusions and prospects for further research. *Based on the obtained data, it is planned to investigate the sensitivity of microbial isolates of the skin to antibiotics, especially microorganisms of cocci group, with further improvement of antibiotic therapy of animals affected with otitis, especially with the prevalence of methicillin-resistant staphylococci.*

Keywords: *dogs, microbiological research, nutrient media, skin microflora, microbial isolates, otitis, staphylococci, antibiotics sensitivity.*

REFERENCES

1. Perry, L.R., MacLennan, B., Korven, R., & Rawlings, T.A. (2017). Epidemiological study of dogs with otitis externa in Cape Breton, Nova Scotia. *The Canadian Veterinary Journal,* 58(2), 168.

2. Malayeri, H.Z., Jamshidi, S., & Salehi, T.Z. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Veterinary Research Communication*, 34, 435-444.

3. Bajwa, J. (2019). Canine otitis externa-Treatment and complications. *The Canadian Veterinary Journal,* 60(1), 97.

4. Bond, R. (2012). Self assessment test: Selecting ear drops for dogs with otitis externa. *In Practice,* 34(7), 392-399.

5. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. et al. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases.* 1st Edn, Blackwell Science, London.

6. De Martino, L., Nocera, F.P., Mallardo, K., Nizza, S. et al. (2016). An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* 6(5), 384-389.

7. Kumar A, Singh K, Sharma A. (2002). Prevalence of Malassezia pachydermatis and other organisms in healthy and infected dogs ears. *Israel Journal of Veterinary Medicine,* 57(4), 145-148.

8. Narayanan, A., Gowri, B., Kavitha, S., Subapriya, S. (2015). Comparative study of ear microflora in clinically healthy and dogs with dermatitis. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences,* 2(5), 1-6.

9. Oliveira, L.C., Leite, C.A., Brilhante, R.S., Carvalho, C.B. (2008). Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Canadian Veterinary Journal,* 49(8), 785.

10. Karnad, V.V., Jeyaraja, K., Vijayarani, K., Vairamuthu, S., Subapriya, S., & Ronald, B.S.M. (2020). Cytological and Microbiological Analysis of Canine Otitis Externa. *Indian Journal of Animal Research,* 54(10), 1309-1313. doi: 10.18805/ijar.B-3882.

11. Subapriya, S., Senthil, N.R., Vairamuthu, S., Nagarajan, B., Kavitha, S., George, R.S. (2015). A study on Microbial Profile and Trends in Antimicrobial Susceptibility in canine otitis. *International Journal of Livestock Research,* 5(2), 43-48.

12. Petrov, V., Mihaylov, G., Tsachev, I., Zhelev, G., Marutsov, P., & Koev, K. (2013). Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. *Revue de Medecine Veterinaire,* 164(1), 18-22.

13. Jones, M.E., Boenink, N.M., Verhoef, J., Kohrer, K. et al. (2000). Multiple mutations conferring ciprofloxacin resistance in Staphylococcus aureus demonstrate long-term stability in an antibiotic-free environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 45(3), 353-356.

14. Niculae, M., Spinu, M., Șandru, C.D., Brudasca, F. et al. (2009). Antibiotic resistance level in Staphylococcus spp. strains isolated from dogs with otitis externa. *Veterinara,* 42(1), 176-180.