



Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC

Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs

Yu. V. Horiuk^{*}, M.D. Kukhtyn^{**}, Y.B. Perkiy^{***}, V.V. Horiuk^{*}

^{*}State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Ukraine

^{**}Ternopil Ivan Pului National Technical University, Ternopil, Ukraine

^{***}Ternopil Research Station of the Institute of Veterinary Medicine, NAAS, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 08.05.2018

Received in revised form

18.05.2018

Accepted 20.05.2018

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Shevchenko Str., 13, Kamianets-Podilskyi, 32300, Ukraine
Tel.: +38-097-661-79-64
E-mail: goruky@ukr.net

Ternopil Ivan Pului National Technical University, Ruska Str., 56, Ternopil, 46001, Ukraine
Tel.: +38-097-239-20-57
E-mail: kuchtynnic@gmail.com

Ternopil Research Station of the Institute of Veterinary Medicine, NAAS, Ternopil, 46001, Ukraine
Tel.: +38-067-290-92-92
E-mail: yperkiy@ukr.net

In the anti-mastitis control approach one of the leading places belongs to its treatment with the use of antibacterial substances. However, their incorrect and uncontrolled use leads to the emergence of antibiotic resistant strains of microorganisms. The purpose of the research is to determine the resistance of the main pathogens of mastitis in cows to modern antimicrobial drugs on dairy farms in the western region of Ukraine in order to implement effective therapeutic and prophylactic anti-mastitis measures. Experimental researches were carried out in the laboratories of Ternopil experimental station of the Institute of veterinary medicine of NAAS (National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine), State Agrarian and Engineering University in Podilya and on the farms of Ternopil, Khmelnytsky, Chernivtsi and Lviv regions. The determination of the resistance of microorganisms to antimicrobial drugs was carried out on meat-and-peptone agar (MPA) applying Kirby Bauer Disk Diffusion Method and using standard techniques. The preparation of microbial suspensions was performed according to optical turbidity standards of 1.0 units of McFarland scale using the Densi-LaMeter device (PLIVA-Lachema Diagnostika, Czech Republic). While conducting the research we used non-parametric methods of Wilcoxon and Mann-Whitney tests. It was found that 66.7–83.3% of *S. aureus* cultures were resistant to 33.3% of preparations and exhibited 100% resistance to 58.3% of preparations. A similar condition was observed in the resistance of *S. agalactiae* to antibacterial substances which were shedded on dairy farms. The results of studies of resistance of pathogenic microorganisms to anti-mastitis drugs showed that 27.3% of anti-mastitis preparations for cows during lactation showed bactericidal effects on all shedded cultures of *S. aureus* and *S. agalactiae*. Up to 22.7% of anti-mastitis drugs showed no effect on pathogens of mastitis. 14.3 to 83.3% of shedded pathogenic microorganisms were sensitive to the remaining drugs. Only one out of three anti-mastitis drugs for dry cows, Bioflok DC (enrofloxacin-based) affected 57.1% of *S. aureus* microorganisms and 66.7% of *S. agalactiae* cultures.

Key words: pathogens of mastitis; antibiotics; anti-mastitis drugs; resistance; antibioticogram

Чутливість основних збудників маститу корів до сучасних антимікробних препаратів

Ю. В. Горюк^{*}, М. Д. Кухтин^{**}, Ю. Б. Перкій^{***}, В. В. Горюк^{*}

^{*}Подільський державний аграрно-технічний університет, Кам'янець-Подільський, Україна

^{**}Тернопільський національний технічний університет імені І. Пулюя, Тернопіль, Україна

^{***}Тернопільська дослідна станція Інституту ветеринарної медицини, Тернопіль, Україна

У системі боротьби з маститом провідне місце належить його лікуванню із застосуванням антибактеріальних речовин. Проте неправильне та безконтрольне їх використання призводить до появи антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів. Мета роботи – визначити чутливість основних збудників маститу корів на молочних фермах західного регіону України до сучасних антимікробних препаратів для проведення ефективних лікувально-профілактичних протимаститних заходів. Експериментальні дослідження проводили в лабораторіях Тернопільської дослідної станції Інституту ветеринарної медицини НААН, Подільському державному аграрно-технічному університеті та господарствах Тернопільської, Хмельницької, Чернівецької і Львівської областей. Визначення чутливості мік-

Citation:

Horiuk, Yu. V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Y.B. & Horiuk, V.V. (2018). Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 6(2), 49–53.

роорганізмів до антимікробних препаратів проводили на середовищі МПА диско-дифузійним способом за методом Bauer-Kirby з використання стандартних методик. Визначення чутливості до протимаститних препаратів виконували луночковим методом. Приготування мікробних суспензій здійснювали відповідно до оптичного стандарту мутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland з використанням приладу Densi-LaMeter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія). Статистичну обробку результатів дослідження виконали за загальноновизнаними методами варіаційної статистики з використанням програми Statistic 6. Використовували непараметричні методи досліджень (критерій Уїлкоксона, Манна-Уїтні). Встановлено, що 66,7–83,3% культур *S. aureus* були резистентними до 33,3% препаратів і проявляли 100% резистентність – до 58,3% препаратів. Аналогічна ситуація спостерігалася щодо резистентності *S. agalactiae*, виділених на молочних фермах, до антибактеріальних речовин. Результати досліджень чутливості патогенних мікроорганізмів до протимаститних препаратів показали що 27,3% протимаститних препаратів для корів у період лактації проявляли бактерицидну дію до усіх виділених культур *S. aureus* і *S. agalactiae*. До 22,7% протимаститних препаратів патогенні бактерії виявилися взагалі не чутливі. До решти препаратів чутливими були від 14,3 до 83,3% виділених патогенних мікроорганізмів. Із трьох протимаститних препаратів для сухостійних корів лише до одного Біофлок ДС, на основі енрофлоксацину, 57,1% мікроорганізмів *S. aureus* і 66,7% культур *S. agalactiae* проявили чутливість. Для ефективного проведення лікувально-профілактичних протимаститних заходів у молочних господарствах необхідне щорічне дослідження антибіотикограми до збудників маститу.

Ключові слова: збудники маститу; антибіотики; протимаститні препарати; резистентність; антибіотикограма

Вступ

Одним із головних чинників, які гальмують зростання молочної продуктивності корів і гігієнічної якості молока, є захворювання на мастит. Для лікування корів хворих на мастит найчастіше використовують антибіотики, асортимент яких весь час розширюється. Тому їх використання призводить до появи антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів і неефективності застосування антимікробних препаратів (De Oliveira et al., 2000; Makovec and Ruegg, 2003; Goni et al., 2004; Botrel et al., 2010; Santos et al., 2017).

Проблема застосування антибіотиків та формування мікроорганізмами резистентності до них є однією з найсерйозніших загроз глобальної охорони здоров'я, адже стійкість до антибіотиків зростає з кожним роком (Kukhtyn et al., 2017). Нині в тваринництві майже не проводиться моніторинг чутливості основних збудників маститу корів до сучасних антимікробних протимаститних препаратів наявних на ринку України. Надмірне та нераціональне застосування антибіотиків вважається однією з основних причин поширення бактерій резистентних до протимікробних препаратів. Негативним наслідком застосування антибіотиків для лікування маститу корів є наявність їх залишків у збірному молоці (Mathew et al., 2007; Kukhtyn et al., 2016). Також, проведення неефективного лікування захворювання сприяє надходженню мікроорганізмів у продукти харчування та передачі генів антибіотикорезистентності від збудників до нормо мікрофлори людей (Lüthje and Schwarz, 2006; Umaru et al., 2017).

Отже, нині проблема антибіотикорезистентності виходить за рамки суто ветеринарної та має важливе соціально-економічне значення у сферах

охорони здоров'я, охорони здоров'я тварин та сільському господарстві.

Мета роботи – встановити чутливість основних збудників маститу корів на молочних фермах до сучасних антимікробних препаратів для проведення ефективних лікувально-профілактичних протимаститних заходів.

Матеріал і методи досліджень

Експериментальні дослідження проводили в лабораторіях Тернопільської дослідної станції Інституту ветеринарної медицини НААН, Подільському державному аграрно-технічному університеті та господарствах Тернопільської, Хмельницької, Чернівецької та Львівської областей. За період 2004–2005 та 2016–2017 роки було досліджено 237 культур мікроорганізмів.

Чутливість ізолятів до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузійним методом, використовуючи диски з антибіотиками (HiMedia, Індія). При постановці методу використовували Mueller Hinton Agar (HiMedia, Індія). Визначення чутливості до протимаститних препаратів проводили луночковим методом.

Приготування мікробних суспензій проводили відповідно до оптичного стандарту мутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland з використанням приладу Densi-LaMeter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія).

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали за загальноновизнаними методами варіаційної статистики з використанням програми Statistic 6. Використовували непараметричні методи досліджень (критерій Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Визначали середнє арифметичне – \bar{x} , стандартну похибку середньої величини – SE . Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень чутливості патогенних збудників маститу корів до антибактеріальних

речовин найбільш поширених у ветеринарній медицині наведено у табл. 1 та 2.

Таблиця 1

Чутливість *S. aureus* до антибіотиків, % ($x \pm SE$; $n = 148$)

Назва антибіотику, вміст діючої речовини в одному диску	Кількість досліджених культур	
	2004–2005 роки, $n=67$	2016–2017 роки, $n=81$
Бензилпеніцилін, 10 ОД	72,0 ± 3,11	0
Ампіцилін, 10 мкг	72,0 ± 2,95	0
Еритроміцин, 15 мкг	100	0
Неоміцин, 30 мкг	88,0 ± 2,56	0
Стрептоміцин, 30 мкг	100	16,7 ± 1,94*
Енрофлоксацин, 10 мкг	80,2 ± 3,30	33,3 ± 1,64*
Тетрациклін, 30 мкг	100	0
Гентаміцин, 30 мкг	88,1 ± 4,02	0
Амоксицилін, 30 мкг	100	16,7 ± 1,56
Лінкоміцин, 10 мкг	100	16,7 ± 1,82
Цефтріаксон, 30 мкг	–	0
Доксициклін, 30 мкг	–	100

Примітка: «–» – не досліджували; * – $p \leq 0,05$ – по відношенню до 2004–2005 років

Таблиця 2

Чутливість *S. agalactiae* до антибіотиків, % ($x \pm SE$; $n = 89$)

Назва антибіотику, вміст діючої речовини в одному диску	Кількість досліджених культур	
	2004–2005 роки, $n=36$	2016–2017 роки, $n=53$
Бензилпеніцилін, 10 ОД	100	0
Ампіцилін, 10 мкг	100	0
Еритроміцин, 15 мкг	100	0
Неоміцин, 30 мкг	26,7 ± 0,72	0
Стрептоміцин, 30 мкг	100	16,7 ± 0,74*
Енрофлоксацин, 10 мкг	100	86,6 ± 1,61*
Тетрациклін, 30 мкг	86,6 ± 1,59	0
Гентаміцин, 30 мкг	50,0 ± 1,62	13,3 ± 0,53*
Амоксицилін, 30 мкг	100	30,0 ± 1,80*
Лінкоміцин, 10 мкг	100	16,7 ± 1,05*
Цефтріаксон, 30 мкг	100	0
Доксициклін, 30 мкг	–	100

Примітка: «–» – не досліджували; * – $p \leq 0,05$ – по відношенню до 2004–2005 років

Безконтрольне застосування антибактеріальних речовин протягом 10–12 років на молочних фермах призвело до резистентності у 66,7–83,3% культур *S. aureus* до 33,3% препаратів та 100% резистентність – до 58,3% препаратів. Лише один антибіотик доксициклін проявляв згубну дію на усі культури золотистого стафілококу. Це пояснюється нещодавною появою даної антибактеріальної речовини у ветеринарній практиці.

Аналогічна ситуація щодо резистентності до антибактеріальних речовин спостерігалася і у *S. agalactiae*, які виділені на молочних фермах.

Результати досліджень чутливості патогенних мікроорганізмів до протимаститних препаратів наведено в табл. 3.

Як видно, лише 27,3% протимаститних препаратів для корів у період лактації проявляли бактерицидну дію до усіх виділених культур *S. aureus* і *S. agalactiae*. До 22,7% протимаститних препаратів патогенні бактерії виявилися взагалі не чутливі. До решти препаратів чутливими були від 14,3 до 83,3% виділених патогенних мікроорганізмів.

Із трьох протимаститних препаратів для сухостійних корів лише до одного Біофлок DC, на основі енрофлоксацину, 57,1% мікроорганізмів *S. aureus* і 66,7% культур *S. agalactiae* проявляли чутливість.

Дані результати підтверджують те, що для ефективного проведення лікувально-профілактичних протимаститних заходів необ-

хідне щорічне дослідження антибіотикограми до подарства.
збудників маститу конкретного молочного гос-

Таблиця 3

Чутливість мікроорганізмів *S. aureus* і *S. agalactiae* до протимаститних препаратів, % ($x \pm SE$; $n = 56$)

Назва препарату	Кількість досліджених культур	
	<i>S. aureus</i> , n=32	<i>S. agalactiae</i> , n=24
Біофлок LC	100	100
Біофлок DC	57,1 ± 2,62	66,7 ± 2,93
Бровамаст 1 Д	57,1 ± 2,11	50,0 ± 2,33
Бровамаст 2 Д	0	0
Мастисан-А форте	14,3 ± 0,71	16,7 ± 1,02
МАСТИвет ПЛЮС	57,1 ± 2,62	50,0 ± 1,80
Мастьет форте	71,4 ± 3,07	66,7 ± 2,93
Амоклокс DC	0	0
Тетра-Дельта	100	100
Мастидев-Форте	100	100
Мастопред	100	100
Дипромаст	14,3 ± 1,30	0
Мастидев-Біо	57,1 ± 3,05	50,0 ± 1,84
Пенікан П	42,8 ± 1,65	33,3 ± 1,40
Мультиджект IMM	42,9 ± 1,32	33,3 ± 1,03
Мастилонг Форте	71,4 ± 3,44	83,3 ± 2,90
Декамаст	0	0
Мультимаст	57,1 ± 2,62	66,7 ± 2,02
Маст БСН	0	0
Маст НКС	0	16,7 ± 1,28
Профімаст	100	100
Мультибайт	100	100
Клоксадев DC	0	0
Мастомокс	0	0
Гамарет	28,6 ± 0,89	33,3 ± 1,01

Висновки

Безконтрольне застосування антибактеріальних речовин протягом 10–12 років на молочних фермах призвело до резистентності у 66,7–83,3% культур *S. aureus* до 33,3 % препаратів і 100 % резистентність – до 58,3% препаратів.

27,3 % протимаститних препаратів для корів у період лактації проявляли бактерицидну дію до у сіх виділених культур *S. aureus* і *S. agalactiae*. Патогенні бактерії виявилися не чутливі до 22,7%, а до 50% препаратів чутливими були від 43 до 83,3%.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідження патогенних властивостей збудників маститів корів на молочних фермах західного регіону України.

References

Botrel, M.-A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J.-Y. & Calavas, D. (2010). Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in

- Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5), 479–487.
- De Oliveira, A. P., Watts, J. L., Salmon, S. A., & Aarestrup, F. M. (2000). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 855–862.
- Goñi, P., Vergara, Y., Ruiz, J., Albizu, I., Vila, J., & Gómez-Lus, R. (2004). Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23(3), 268–272.
- Kukhtyn, M. D., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., Yaroshenko, T. Y., Vichko, O. I., & Pokotylo, O. S. (2017). Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(3), 384–388.
- Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V. & Stravskyy, Y. S. (2016). Bacterial biofilms formation of Cattle mastitis pathogens. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*, 2(4), 30–32.

- Lüthje, P., & Schwarz, S. (2006). Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 966–969.
- Makovec, J. A. & Ruegg, D. P. L. (2003). Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(11), 1582–1589.
- Mathew, A. G., Cissell, R., & Liamthong, S. (2007). Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(2), 115–133.
- Santos, R. I. de los, Zunino, P. M., Gil, A. D., Laport, A., & Hirigoyen, D. J. (2017). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-year period. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 49(3), 191–194.
- Umaru, G. A., Kwaga, J. K. P., Bello, M., Raji, M. A., & Maitala, Y. S. (2017). Occurrence of bovine mastitis and isolation of *Staphylococcus* species from fresh cow milk in settled Fulani herds in Kaduna State, Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 10(1), 259.
-