



УДК 619:619:616.981.51:615.33:616-085

Визначення чутливості виробничого штаму *Bacillus anthracis* UA–07 до антибіотиків

І.О. Рубленко¹, В.Г. Скрипник²
rubs@ukr.net

¹Білоцерківський національний аграрний університет,
вул. Ставищанська, 126, м. Біла Церква, 09100, Україна;

²Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

Довготривале використання антибіотиків призводить до антибіотикорезистентності збудників. Окрім того, існує ймовірність постійних генетичних змін у штамів внаслідок впливу навколишнього середовища. Тому виникає необхідність у періодичному дослідженні вакцинних штамів на чутливість до антибіотиків із метою вивчення та контролювання їх паспортних характеристик. Метою наших досліджень було провести визначення чутливості штаму *Bacillus anthracis* UA–07 до антибіотиків. Наведено результати досліджень чутливості штаму *Bacillus anthracis* UA–07 до 50 антибіотиків, яку визначали за розміром діаметру зон затримки росту. Зону затримки росту до 15 мм вважали ознакою слабкої чутливості до антибіотика, зону 15–24 мм – ознакою чутливості і зону понад 24 мм – ознакою високої чутливості штаму до даного антибіотика. Відсутність зон затримки росту вказувала на нечутливість штаму до даного антибіотика.

Результати досліджень свідчать, що штаму *Bacillus anthracis* UA–07 є високочутливим до офлоксацину (Of^s), ампіцилін/сульбактаму ($A/S^{10/10}$), лінезоліду (LZ^{30}), амоксициліну (AMX^{30}), норфлораксацину (NX^{40}), цефалотину (CEP^{30}), тетрацикліну (TE^{30}). Не впливають на розвиток досліджуваного мікроорганізму антибіотики: цефепім ($CPM30$), ністатин (NS^{100U}), цефуросин (CXM^{30}), цефексим (CFM^s), сульфадіазин (SZ^{300}), метронідазол (MT^4), цефазолін (Cz^{30}).

Ключові слова: сибірка, чутливість, стійкість, резистентність, зони росту, *Bacillus anthracis* UA–07, антибіотики, концентрація, паперові диски, лікування.

Определение чувствительности производственных штаммов *Bacillus anthracis* UA–07 к антибиотикам

І.А. Рубленко¹, В. Скрипник²
rubs@ukr.net

¹Білоцерковський національний аграрний університет,
пл. Соборная 8/1, г. Белая Церковь, 09100, Україна;

²Государственный научно-исследовательский институт по лабораторной диагностике и ветеринарно-санитарной экспертизы, ул. Донецкая, 30, м. Киев, 03151, Україна

Длительное использование антибиотиков приводит к антибиотикорезистентности возбудителей. Кроме того, существует вероятность постоянных генетических изменений у штаммов вследствие воздействия окружающей среды. Поэтому возникает необходимость в периодическом исследовании вакцинных штаммов на чувствительность к антибиотикам с целью изучения и контроля их паспортных характеристик. Целью наших исследований было провести определение чувствительности штамма *Bacillus anthracis* UA–07 к антибиотикам. Приведены результаты исследований чувствительности штамма *Bacillus anthracis* UA–07 к 50 антибиотикам, которую определяли по размеру диаметра зон задержки

Citation:

Rublenko, I., Skripnik, V. (2017). Determination of sensitivity production strains *Bacillus anthracis* UA–07 to antibiotics. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(73), 84–88.

роста. Зону задержки росту до 15 мм считали признаком слабой чувствительности к антибиотику, зону 15–24 мм – признаком чувствительности и зону более 24 мм – признаком высокой чувствительности штамма к данному антибиотику. Отсутствие зон задержки роста указывало на нечувствительность штамма к данному антибиотику.

Результаты исследований свидетельствуют, что штамм *Bacillus anthracis* UA–07 является высокочувствительным к офлоксацину (Of^{δ}), ампициллин / сульбактаму ($A/S^{10/10}$), линезолиду (LZ^{30}), амоксициллину (AMX^{30}), норфлоксацину (NX^{10}), цефалотину (CEP^{30}), тетрациклина (TE^{30}). Не влияют на развитие исследуемого микроорганизма антибиотики: цефепим (SPM^{30}), нистатин (NS^{100U}), цефуроксин (CXM^{30}), цефексим (CFM^{δ}), сульфадиазин (SZ^{300}), метронидазол (MT^4), цефазолин (Cz^{30}).

Ключевые слова: сибирская язва, чувствительность, устойчивость, резистентность, зоны роста, *Bacillus anthracis* UA–07 антибиотики, концентрация, бумажные диски, лечение.

Determination of sensitivity production strains *Bacillus anthracis* UA–07 to antibiotics

I. Rublenko, V. Skripnik
rubs@ukr.net

*Bila Tserkva National Agrarian University,
Soborna sq., 8/1, Bila Tserkva, Kievskaya obl., 09117, Ukraine;
The State Scientific Research Institute of Laboratory Diagnostic and Veterinary Sanitary Expertise,
Donetska Str., 30, Kyiv, 03151, Ukraine*

Long-term use of antibiotics leads to antibiotic resistance in pathogens. In addition, there is a possibility of permanent genetic changes in strains due to environmental influences. Therefore there is a need for periodic study vaccine strains for sensitivity to antibiotics in order to study and control of their passport characteristics. The aim of our research was necessary to determine the sensitivity of the strain of *Bacillus anthracis* UA–07 to antibiotics. The results of studies of sensitivity of strain *Bacillus anthracis* UA–07 to 50 antibiotics were determined by the size of the diameter of the zones of growth retardation. Zone growth delay of 15 mm was considered a sign of a weak antibiotic sensitivity, zone 15–24 mm – a sign of sensitivity and area of more than 24 mm – a sign of the high sensitivity of the strain to this antibiotic. Lack of stunted growth areas points to the insensitivity of the strain to this antibiotic.

The research results show that the strain of *Bacillus anthracis* UA–07 is highly sensitive to ofloxacin (Of^{δ}), ampicillin / sulbactam ($A/S^{10/10}$), linezolid (LZ^{30}), amoxicillin (AMX^{30}), norfloxacin (NX^{10}), cefalotin (CEP^{30}), tetracycline (TE^{30}). Not affect the development of the studied microorganism antibiotics, ceftazidime (SPM^{30}), nystatin (NS^{100U}) tsefuroksyn (CXM^{30}) tsefeksym (CFM^{δ}), sulfadiazine (SZ^{300}), metronidazole (MT^4), cefazolin (Cz^{30}).

Key words: anthrax, sensitivity, stability, resistance, growth zone, *Bacillus anthracis* UA–07 antibiotics concentration, paper disc treatment.

Вступ

Сибірка – це особливо небезпечне захворювання, яке реєструється серед тварин та людей майже у всіх країнах земної кулі, характеризується різними шляхами передачі інфекції та тривалим часом існування збудника у ґрунті (Devrishov et al., 2005). Як наслідок, кожна держава має велику кількість стаціонарно-неблагополучних пунктів. В Україні їх налічують понад 10000, Росії – 10000, Казахстані – 1293, Таджикистані – 1144, Узбекистані – 679, Молдові – 765 (Devrishov et al., 2005; Muminov et al., 2010; Muminov et al., 2012). В Україні для профілактичних та вимушених щеплень тварин проти сибірки застосовують спорові вакцини зі штамів *Sterne*, K79Z, UA–07 (Skripnik et al., 2011). Проте недотримання рекомендацій ветеринарної служби власниками чи певними керівниками господарств, призводить до виникнення захворювання. Для успішного лікування інфекційного захворювання тварин у ветеринарній практиці широко використовують антибіотики. З метою вибору найбільш ефективного антибіотика фахівці лабораторій проводять дослідження визначаючи ступінь чутливості культури збудника до препарату (Tihonov et al., 2004; Tekin et al., 2013). У ветеринарії та тваринництві широко використовуються десятки антибіотиків, які

випускає біологічна промисловість різних країн. Проте у світі існує велика проблема резистентності мікроорганізмів до антибіотиків і збудник сибірки не є винятком.

Також однією із основних загроз захворювання тварин і людей на сибірку є поширення збудника внаслідок дій біотерористів. На сьогодні існує проблема швидкого і якісного лікування людей хворих чи підозрілих у захворюванні. Раніше вважалося, що збудник сибірки високочутливий до пеніциліну, але, вже доведено, що існують штами зовсім не чутливі до нього (Esel et al., 2003). Тому вибір ефективного лікування безпосередньо залежить від вивчення антибіотикорезистентності відомих штамів *Bacillus anthracis* (Cavallo et al., 2002; Esel et al., 2003).

Choe et al. (Choe et al., 2004) проводили дослідження з вивчення причин резистентності *Bacillus anthracis* штаму *Sterne* до антибактеріальних *npenapamie*. Дослідники довели відсутність змін резистентності протягом 5 пасажів збудника, але при подальших дослідженнях виявлено наявність змін, які проявили себе через 18 пасажів.

На жаль, довготривале зберігання збудника, пасажування, використання антибіотиків призводить до певної резистентності мікроорганізму до різних речовин. Тому виникає необхідність у дослідженні вак-

цинних штамів на чутливість до антибіотиків із метою підтвердження їх паспортних характеристик.

Метою даних досліджень було визначення чутливості штаму *Bacillus anthracis* UA-07 до антибіотиків методом паперових дисків. Було поставлено завдання провести оцінку резистентності штаму, виходячи з розміру зон пригнічення росту: визначити не чутливість, слабку чутливість, чутливість та високу чутливість вакцинного штаму до антибактеріальних препаратів, які існують на ринку України.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проводилися на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ) та Білоцерківського національного аграрного університету.

Досліджували виробничий штам *Bacillus anthracis* UA-07, отриманий із Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).

За дослідження були використані стандартні паперові диски діаметром 7 мм, насичені антибіотиками, виробництва HIMedia Laboratories Pvt. Limited.

Для оцінки чутливості використовували поживне середовище агар Хоттінгера, яке готували із сухого середовища промислового виробництва, відповідно до інструкції виробника. Після стерилізації його розливали у стерильні бактеріологічні чашки. Товщина агару у чашках була не менше 4 мм (на чашку діаметром 100 мм було використано 25 см³ середовища). Чашки залишали у боксі за кімнатної температури для застигання. Перед інокуляцією чашки підсушували у термостаті за 35 °С з привідкритою кришкою протягом 10–20 хв. Конденсату рідини на внутрішній поверхні кришок не було.

Мікробну суспензію досліджуваного мікроорганізму використовували в концентрації 1x10⁹ мікробних клітин у 1 см³. Інокулюм був використаний протягом 15 хв із моменту приготування. Його наносили піпеткою на поверхню поживного середовища в об'ємі 1 см³, рівномірно розподіляючи по поверхні.

Через 20 хвилин на поверхню поживного середовища розклали диски з антибіотиками. Аплікацію дисків проводили за допомогою стерильного пінцета.

Відстань від диска до краю чашки і між дисками була 15–20 мм. Для кращої дифузії антибіотиків в агар, бактеріологічні чашки з дисками витримували за кімнатної температури протягом 1,5 год.

Відразу після аплікації дисків чашки поміщали у термостат догори дном і культивували за температури 37 °С протягом 24 год. Після інкубації чашки поміщали догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45 °.

За діаметру зон затримки росту до 15 мм штам *Bacillus anthracis* UA-07 вважали слабкочутливим до антибіотика, за зон затримки у 15–24 мм – чутливим і понад 24 мм – високочутливим. Відсутність зон затримки росту вказувала на нечутливість *Bac. anthracis* до даного антибіотика.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень наведені у таблиці 1. Аналіз матеріалів досліджень свідчить, що штам *Bacillus anthracis* UA-07 чутливий до більшості досліджених антибіотиків, що підтверджується діаметрами зон затримки росту. При порівнянні розмірів зон затримки росту виявлено, що до 14 % антибіотиків (цефуроксину, сульфадіазину, метронідазолу, цефазоліну та ін.) штам не чутливий (рис. 1).

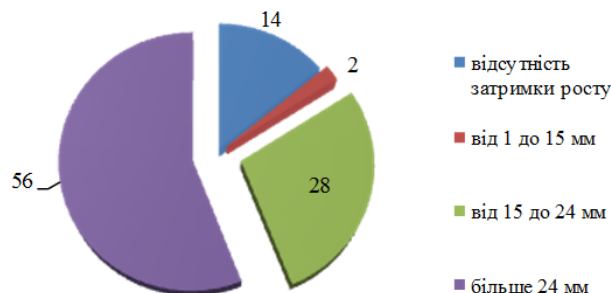


Рис. 1. Чутливість штаму *Bacillus anthracis* UA-07 у відсотках

Лише 2% антибіотиків (олеандоміцин, метицилін, метронідазол) проявляють слабку дію на *Bacillus anthracis* UA-07. Штам UA-07 виявився високочутливим до багатьох антибіотиків.

Таблиця 1

Перелік використаних антибіотиків і їх позначень

№з/п	Назва антибіотиків	Концентрація, мкг/диск	Позначення на диску	Діаметр зони затримки росту, мм
1	Ofloxacin (офлоксацин)	5 мкг/диск	Of ⁵	35
2	Furazolidone (фуразолідон)	50 мкг/диск	Fr ⁵⁰	16
3	Spiramycin (спіраміцин)	30 мкг/диск	SR ³⁰	25
4	Vancomycin (ванкоміцин)	30 мкг/диск	VA ³⁰	15
5	Azithromycin (азітроміцин)	15 мкг/диск	AZM ¹⁵	22
6	Norfloxacin (норфлоксацин)	10 мкг/диск	NX ¹⁰	27
7	Vancomycin (ванкоміцин)	5 мкг/диск	VA ⁵	14
8	Nitroxoline (нітроксолін)	30 мкг/диск	NO ³⁰	21
9	Novobiocin (новобіоцин)	30 мкг/диск	NV ³⁰	23
10	Chloramphenicol (хлорамфенікол)	25 мкг/диск	C ²⁵	24
11	Cefepime (цефепім)	30 мкг/диск	CPM ³⁰	0
12	Linezolid (лінезолід)	30 мкг/диск	LZ ³⁰	31

13	Cefamandole (цефамандол)	30 мкг/диск	FAM ³⁰	23
14	Sulfasomidine (сульфазомідин)	300 мкг/диск	SO ³⁰⁰	21
15	Kanamycin (канаміцин)	30 мкг/диск	K ³⁰	25
16	Cefoperazone (цефоперазон)	75 мкг/диск	CPZ ⁷⁵	20
17	Vacitracin (бацитрацин)	10U мкг/диск	B ^{10U}	13
18	Ampicilin/Sulbactam (ампіцелін/сульбактам)	10/10 мкг/диск	A/S ^{10/10}	33
19	Teicoplanin (тейкопланін)	30 мкг/диск	TEI ³⁰	21
20	Nystatin (ністатин)	100U мкг/диск	NS ^{100U}	0
21	Oleandomycin (олеандоміцин)	15 мкг/диск	OL ¹⁵	14
22	Cefuroxime (цефуроксин)	30 мкг/диск	CXM ³⁰	0
23	Methicillin (метицилін)	10 мкг/диск	MET ¹⁰	13
24	Tetracycline (тетрациклін)	30 мкг/диск	TE ³⁰	27
25	Doxycycline Hydrochloride (доксциліна гідрохлориду)	30 мкг/диск	DO ³⁰	25
26	Cefixime (цефиксим)	5 мкг/диск	CFM ⁵	0
27	Cephalothin (цефалотін)	30 мкг/диск	CEP ³⁰	27
28	Clindamycin (кліндаміцин)	2 мкг/диск	CD ²	19
29	Tobramycin (тобраміцин)	30 мкг/диск	TOB ³⁰	23
30	Rifampicin (ріфампіцин)	30 мкг/диск	RIF ³⁰	16
31	Methicillin (метицилін)	5 мкг/диск	MET ⁵	13
32	Amoxicillin (амоксицилін)	30 мкг/диск	AMX ³⁰	30
33	Tobramycin (тобраміцин)	10 мкг/диск	TOB ¹⁰	20
34	Lincomycin (лінкоміцин)	2 мкг/диск	L ²	25
35	Ticarcillin/Clavulanic (тікарцилін/клавулонова кислота)	75/10 мкг/диск	TCC ^{75/10}	25
36	Ceftazidime (цефтазидін)	30 мкг/диск	CAZ ³⁰	21
37	Netillin (нетілміцин)	30 мкг/диск	NET ³⁰	23
38	Ticarcillin (тікарцилін)	75 мкг/диск	TI ⁷⁵	26
39	Oxacillin (оксацилін)	5 мкг/диск	OX ⁵	21
40	Sulphadiazine (сульфадіазін)	300 мкг/диск	SZ ³⁰⁰	0
41	Streptomycin (стрептоміцин)	10 мкг/диск	S ¹⁰	20
42	Metronidazole (метронідазол)	5 мкг/диск	MT ⁵	9
43	Metronidazole (метронідазол)	4 мкг/диск	MT ⁴	0
44	Cefazolin (цефазолін)	30 мкг/диск	Cz ³⁰	0
45	Levomicytin Левоміцетін	30 мкг/диск	L ³⁰	22
46	Neomicin (неоміцин)	30 мкг/диск	N ³⁰	18
47	Amikacin (амікацин)	30 мкг/диск	AK ³⁰	26
48	Fusidic acid (фузидін)	10мкг/диск	Fc ¹⁰	16
49	Gentamicin (гентаміцин)	10 мкг/диск	G ¹⁰	23
50	Erythromycin (еритроміцин)	15 мкг/диск	E ¹⁵	15

Особливо слід відмітити найбільшу чутливість (зони затримки росту 35–30 мм) до офлоксацину, ампіцелін/сульбактаму, лінезоліду, амоксициліну. Деяко менший діаметр затримки росту (24–29 мм) виявили до норфлоксацину, цефалотіну, тетрацикліну та ін.

Висновки

За результатами досліджень встановлено, що штам *Bacillus anthracis* UA-07 є високочутливим до офлоксацину (OF⁵), ампіцелін/сульбактаму (A/S^{10/10}), лінезоліду (LZ³⁰), амоксициліну (AMX³⁰), норфлоксацину (NX¹⁰), цефалотіну (CEP³⁰), тетрацикліну (TE³⁰). Не впливають на ріст досліджуваного штаму антибіотики: цефепім (CPM30), ністатин (NS^{100U}), цефуроксин (CXM³⁰), цефексим (CFM⁵), сульфадіазін (SZ³⁰⁰), метронідазол (MT⁴), цефазолін (Cz³⁰).

У перспективі подальших досліджень планується вивчення чутливості до антибіотиків у польових культур збудника сибірки. Вивчення впливу антибіотиків на виділені польові культури дозволить удосконалити знання щодо змін у антибіотикорезистентності

Bacillus anthracis, допоможе при необхідності проводити ефективне лікування тварин та людей.

Бібліографічні посилання

- Devrishov, D.A., Navruzshoeva, G.S., Anojatbekov, M.A. (2005). Jepiootologicheskie dannye po sibirskoj jazve zhivotnyh v Tadjhikistane. Veterinarnaja medicina. 1, 27–28 (in Russian).
- Devrishov, D.A., Navruzshoeva, G.S., Anojatbekov, M.A. (2005). Jeksperimental'nye ispetanija antraks-vakcin. Veterinarnaja medicina. 1, 25–27 (in Russian).
- Muminov, A.A., Devrishov, D.S. (2012). Geograficheskoe raspostranenie i osnovnye cherty jepizootologii sibirskoj jazvy v Tadjhikistane. Veterinarnaja medicina. 2, 57–61 (in Russian).
- Muminov, A.A., Anojatbekov, M., Jarbaev, N., Rezbonov, R. (2010). Sovremennaja jepizooticheskaja situacija severnogo Tadjhikistana po sibirskoj jazve Veterinarnaja medicina. 5–6, 78–80 (in Russian).
- Skipnik, V.G., Kovalenko, V. (2011) Sibirskaja jazva. The Ukrainian farmer. <http://www.agrotimes.net/magazines>. (in Russian).

- Tihonov, I.V., Mirzoev, M.N., Cherkashina, N.V., Vasil'ev, P.G., Galiullin, A.N., Mahortov, V.L., Litusov, N.V., Rogozhin, A.Z., Zabokrickij, A.N., Demina, L.V., Il'jasova, O.I. (2004). Sovremennye podhody k primeneniju antibiotikov v veterinarii. Veterinarnaja medicina. 4, 38–40 (in Russian).
- Tekin, M.Z., Ari, S., Dal, T., Kaya, S., Kortak, B. Dursun, S., Dayan, R. (2013) Evaluation of cutaneous palpebral anthrax Cutaneous Ocular Toxicology. 32(4), 294–298. doi:10.3109/15569527.2013.781620.
- Esel, D., Doganay, M., Sumerkan, B. (2003) Antimicrobial susceptibilities of 40 isolates of *Bacillus anthracis* isolated in Turkey Int. J. Antimicrob Agents. 22(1), 70–72.
- Cavallo, J., Savallo, J., Ramisse, F., Girardet, M., Vaissaire, J., Mock, M., Hernandez, E. (2002). Antibiotic Susceptibilities of 96 isolates of *Bacillus anthracis* Isolated in France between 1994 and 2000. Antimicrob Agents Chemother. 46(7), 2307–2309. doi:10.1128/AAC.46.7.2307–2309.2002.
- Choe, C.H., Bouhaouala, S.S., Brook, I., Elliot, T.B., Knudson, G.B. (2004). In vitro development of resistance to ofloxacin and doxycycline in *Bacillus anthracis* Sterne. J. Antimicrobial agents and chemotherapy. 44(6), 1766–1766. PMID:10896651.

Стаття надійшла до редакції 24.02.2017