



МОНИТОРИНГ АНТИБИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ *AVIBACTERIUM (HAEMOPHILUS) PARAGALLINARUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2015 ГОДУ

В. А. Данилова¹, А. В. Потехин², И. А. Степанова³

¹ Ведущий ветеринарный врач, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: danilova@arriah.ru

² Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: potehin@arriah.ru

³ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: stepanova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Проведен мониторинг антибиореистентности 9 изолятов возбудителя инфекционного ринита (гемофилеза) кур, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь в 2015 г. Большинство изолятов оказались чувствительными к аминопенициллинам (55,5%), к цефалоспорином III–IV поколений (100%) и флорфениколу (100%). К гентамицину, эритромицину, хлортетрациклину и сульфаметоксазолу с триметопримом большая часть изолятов проявила резистентность. К тилмикозину, окситетрациклину, доксициклину, линкомицину и неомицину все изоляты оказались резистентными.

Ключевые слова: инфекционный ринит (гемофилез) кур, изоляты, антибактериальные препараты.

MONITORING OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *AVIBACTERIUM (HAEMOPHILUS)* *PARAGALLINARUM* ISOLATES RECOVERED IN THE TERRITORY OF THE RUSSIAN FEDERATION AND THE REPUBLIC OF BELARUS IN 2015

V. A. Danilova¹, A. V. Potekhin², I. A. Stepanova³

¹ Leading Veterinarian, PHD student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: danilova@arriah.ru

² Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: potehin@arriah.ru

³ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: stepanova@arriah.ru

SUMMARY

Monitoring of antibacterial resistance of 9 infectious Coryza (Haemophilus infection) isolates recovered in the territory of the Russian Federation and the Republic of Belarus in 2015 was performed. Most of the isolates were sensitive to aminopenicillins (55.5%), III–IV generation cephalosporins (100%), and florfenicol (100%). Most of the isolates were resistant to gentamycin, erythromycin, chlortetracycline and sulfamethoxazole with trimethoprim. All isolates demonstrated resistance to tilmicosin, oxytetracycline, doxycycline, lincomycin and neomycin.

Key words: infectious coryza (Haemophilus infection), isolates, antibacterial drugs.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время инфекционные болезни птиц, сопровождающиеся поражением респираторного тракта, остаются одной из наиболее актуальных и экономически значимых проблем ветеринарии. Посредством воздушно-капельной передачи возбудителя происходит быстрое распространение инфекции на значительное поголовье птицы. Большое значение приобретает лекарственная терапия, и в первую очередь использование химиотерапевтических средств, позволяющих значительно снизить ущерб, причиняемый заболеваниями бактериальной этиологии. Из комплекса респираторных болезней птиц особый интерес для ветеринарных специалистов представляет инфекционный ринит (гемофилез) кур.

Инфекционный ринит (гемофилез) – это острое инфекционное заболевание кур, вызываемое бактериями *Avibacterium paragallinarum*, ранее известными как *Haemophilus paragallinarum* [3, 12]. Заболевание характеризуется катаральным воспалением слизистых оболочек носовой полости, подглазничных синусов и конъюнктивы. Инфекционный ринит зарегистрирован во всех странах мира и наносит ощутимый экономический ущерб птицеводству. Наибольшие экономические потери связаны с отставанием в росте цыплят и снижением яйценоскости кур от 10 до 40%. Может наблюдаться гибель молодняка до 10%. Обычно смертность незначительная, гибель птицы происходит на фоне истощения и осложнений в органах дыхания [3, 5]. При появлении заболевания в хозяйстве возникает необходимость проведения неотложной антибактериальной терапии.

Несмотря на широкое использование различных антибиотиков и сульфаниламидных препаратов в птицеводстве, лечебные мероприятия при инфекционном рините не всегда дают положительные результаты. Эффективность применения антибактериальных препаратов (АБП) зачастую варьируется в различных хозяйствах [2, 4, 11]. Лекарственная терапия помогает несколько сгладить симптомы проявления заболевания, однако полного выздоровления птицы, как правило, не происходит. Рецидивы часто случаются после отмены антимикробных препаратов, так как возбудитель не элиминируется из организма птицы. Из большого перечня антибактериальных средств, применяемых для лечения инфекционного ринита кур, не обнаружено ни одного препарата или их комбинации, обеспечивающих высокий терапевтический эффект [5].

Учитывая глобальную угрозу распространения антибиорезистентных штаммов в животноводстве и прямую связь этого явления с чрезмерным использованием антибактериальных препаратов, Всемирная организация здравоохранения животных призывает к принятию Национальной стратегии ограничительной политики применения антибиотиков в ветеринарии, как реальной меры сдерживания резистентности. Основная цель данной концепции заключается в ограничении неоправданного назначения АБП [6].

Одним из действенных способов ограничения использования антибиотиков, очевидно, является специфическая профилактика инфекционного ринита кур. С теоретических позиций применение вакцин против данного заболевания, приводящее к снижению заболеваемости, должно способствовать ограничению применения АБП.

Учитывая то, что традиционные противобактериальные препараты не всегда удовлетворяют современным требованиям из-за недостаточной эффективности, становится актуальным вопрос мониторинга структуры и уровня лекарственной устойчивости возбудителя инфекционного ринита (гемофилеза) кур.

Целью работы являлось определение антибиорезистентности изолятов *Avibacterium paragallinarum*, выделенных в Российской Федерации и Республике Беларусь в 2015 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для бактериологической диагностики инфекционного ринита кур в лабораторию поступала живая птица разного возраста с признаками поражения респираторного тракта. Клинические признаки заболевания обычно проявлялись в виде водянистого истечения из носовых отверстий. У некоторых птиц, вследствие закупорки носовых отверстий, наблюдали ротовое дыхание с хрипами. Иногда у птиц наблюдали опухшие подглазничные синусы и конъюнктивальные мешки.

Для выделения *A. paragallinarum* из патологического материала использовали кровяной агар Колумбия (Becton, Dickinson and Co.), содержащий 5% дефибрированной крови барана с дополнительным посевом культуры негемолитического штамма *Staphylococcus aureus*. Чистые культуры возбудителя выращивали на шоколадном агаре или сывороточном агаре, содержащем 20 мкг/мл НАД (AppliChem) и 5% сыворотки крови лошади. Культивирование бактерий проводили в течение 24–48 ч при температуре 37 °С в атмосфере с 5% углекислого газа. Идентификацию возбудителя заболевания проводили с учетом культурально-морфологических и основных биохимических признаков.

Чувствительность изолятов *A. paragallinarum* к АБП тестировали диско-диффузионным методом по рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI) с некоторыми изменениями [8]. В работе использовали диски АБП различных производителей (Oxoid, KRKA, Bio-Rad, BD BBL, HiMedia, Huvepharma): пенициллин, ампициллин, амоксициллин, амоксициллин-клавулановая кислота, цефтриаксон, цефепим, цефотаксим, гентамицин, энрофлоксацин, ципрофлоксацин, флюмеквин, эритромицин, тилмиколин, тетрациклин, хлортетрациклин, окситетрациклин, доксициклин, ко-тримоксазол, триметоприм и флорфеникол.

Определение чувствительности изолятов к АБП проводили на питательном агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia) с добавлением сыворотки крови лошади и раствора НАД. Бактериальные суспензии изолятов готовили на фосфатно-буферном растворе из суточных агаровых культур. Оптическая плотность каждого инокулюма перед использованием составляла 0,5 ед. по шкале МакФарланда, что соответствовало концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/см³. Инкубацию посевов с дисками АБП проводили в течение 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере с 5% углекислого газа. Диаметр зоны ингибирования роста культур измеряли с помощью штангенциркуля и выражали в миллиметрах. Категории чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный) определяли путем сравнения зоны задержки роста каждого изолята с рекомендациями CLSI, за исключением результатов на доксициклин, окситетрациклин, хлортетрациклин,

Таблица 1
Локализация возбудителя инфекционного ринита кур

№ изолята	Возраст птицы, сут.	Патологический материал			
		Экссудат из носовой полости	Содержимое подглазничных синусов	Содержимое конъюнктивального мешка	Легкие
1	53	+	+	-	-
2	68	-	-	+	-
3	190	+	+	-	-
4	170	-	-	-	+
5	211	+	+	-	-
6	38	-	+	+	-
7	76	+	+	-	-
8	164	-	+	-	-
9	114	-	+	-	+

амоксациллин и тилмикозин. Оценку результатов действия производных тетрациклина проводили по критериям для природного тетрациклина. Для оценки результатов действия амоксициллина и тилмикозина использовали критерии, предоставляемые компаниями, поставляющими соответствующие диски (Huverpharma и Oxoid).

Для оценки воспроизводимости и точности процедуры определения чувствительности к АБП параллельно с испытуемыми изолятами в качестве эталона использовали референтный штамм *Haemophilus parasuis* № 19417 Американской коллекции типовых культур (ATCC).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на обилие противомикробных препаратов, респираторные инфекции бактериальной этиологии чрезвычайно распространены на птицефабриках промышленного типа.

В 2015 г. бактериологическим методом исследовано 84 пробы патологического материала от птиц различного возраста с респираторным синдромом. Для исследований были отобраны следующие пробы: экссудат из носовой полости, содержимое подглазничных синусов и конъюнктивального мешка, легкие.

Из патологического материала от птиц в возрасте от 38 до 211 сут., доставленных из Владимирской, Московской, Костромской, Ярославской и Оренбургской областей, а также Республик Мордовия и Татарстан, выделено 8 изолятов *A. paragallinarum*. Кроме того, 1 изолят выделили от больных кур, присланных из Республики Беларусь. Общее количество изолятов составило 10,7% от числа исследованных проб. Возбудителя удалось изолировать из 4 проб экссудата со слизистой оболочки носовой полости экссудата со слизистой оболочки носовой полости, 7 проб экссудата из подглазничных синусов, 2 проб содержимого конъюнктивального мешка и из 2 проб легких (табл. 1). На высокую частоту выделения *A. paragallinarum* из содержимого подглазничных синусов указывают результаты других исследователей [3, 5].

В большинстве случаев выделение *A. paragallinarum* было затруднено из-за наличия в пробах значительного количества других видов микроорганизмов, таких как *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Proteus* spp. и апатогенных видов гемофильных бактерий – *Avibacterium avium* и *A. volantium*. О сложности выделения возбудителя инфекционного ринита кур из патологического материала из-за контаминации другими бактериальными агентами свидетельствуют результаты исследований ряда авторов [2, 3, 5].

Результаты определения чувствительности изолятов *A. paragallinarum* к АБП представлены в таблице 2. Большинство исследуемых изолятов оказались чувствительными к полусинтетическим пенициллинам, включая ингибиторозащищенные. Резистентность к пенициллину была выявлена только у 2 изолятов. О чувствительности возбудителя инфекционного ринита кур к природному и полусинтетическим пенициллинам сообщают и другие исследователи [4, 9, 13]. Однако в литературе имеются сообщения о резистентности изолятов к ампициллину и амоксициллину [2, 9]. В данных исследованиях все исследуемые изоляты оказались чувствительными к цефалоспорином III–IV поколений, однако использование данных препаратов в ветеринарии в настоящее время ограничено из-за их высокой стоимости. К азитромицину также не обнаружено резистентных изолятов. К гентамицину только 3 изолята (30%) проявили чувствительность, остальные – резистентность. О высокой резистентности штаммов *A. paragallinarum* к гентамицину сообщают и другие исследователи [2, 10].

Для лечения и профилактики бактериальных заболеваний птиц, в том числе и инфекционного ринита кур, на птицефабриках Российской Федерации наиболее часто используют эритромицин, производные тетрациклина и сульфаниламидные препараты. Однако результаты проведенных исследований показывают, что использование данных препаратов не даст положительного эффекта. Все исследуемые изоляты проявили устойчивость к макролидам, производным те-

Таблица 2
Чувствительность изолятов *A. paragallinarum* к АБП

№ п/п	Наименование АБП, концентрация (мг)	Диаметр зоны, мм		Кол-во изолятов по категориям			% чувствительных
		S	R	S	I	R	
1	Пенициллин (10)	≥ 22	≤ 11	3	4	2	33,3
2	Ампициллин (10)	≥ 17	≤ 13	5	4	0	55,5
3	Амоксициллин (10)	≥ 18	≤ 13	5	4	0	55,5
4	Амоксициллин/клавуланат (20/10)	≥ 18	≤ 13	9	0	0	100
5	Цефтриаксон (30)	≥ 21	≤ 17	9	0	0	100
6	Цефтиофур (30)	≥ 21	≤ 17	9	0	0	100
7	Цефотаксим (30)	≥ 21	≤ 17	9	0	0	100
8	Азитромицин (15)	≥ 18	≤ 14	7	2	0	77,7
9	Гентамицин (10)	≥ 16	≤ 12	3	0	6	33,3
10	Энрофлоксацин (5)	≥ 23	≤ 16	3	2	4	33,3
11	Эритромицин (15)	≥ 23	≤ 13	0	2	7	0
12	Тилмикозин (15)	≥ 26	≤ 22	0	0	9	0
13	Хлортетрациклин (30)	≥ 19	≤ 14	0	2	7	0
14	Окситетрациклин (30)	≥ 19	≤ 14	0	0	9	0
15	Доксициклин (30)	≥ 19	≤ 14	0	0	9	0
16	Линкомицин (2)	≥ 21	≤ 14	0	0	9	0
17	Спектиномицин (100)	≥ 14	≤ 10	4	2	3	44,4
18	Неомицин (30)	≥ 17	≤ 12	0	0	9	0
19	Сульфаметоксазол-триметоприм (23,75/1,25)	≥ 16	≤ 10	1	2	6	11,1
20	Флорфеникол (30)	≥ 28	≤ 22	9	0	0	100

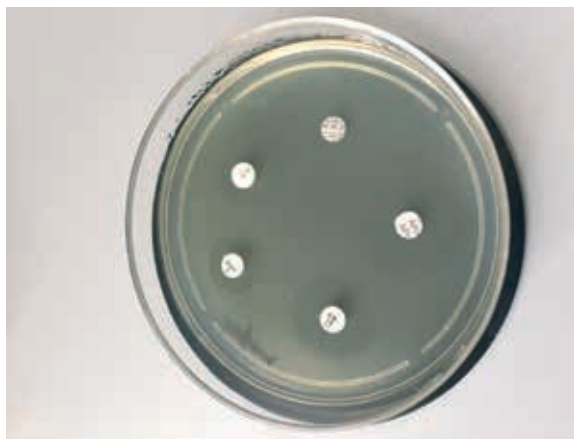
Категории изолятов: S – чувствительные, I – промежуточные, R – резистентные.

трациклина, линкомицину и неомицину. В литературе имеются сообщения о высоком уровне резистентности (> 75%) к неомицину, хлортетрациклину, стрептомицину и эритромицину [4, 7, 9–11]. По данным зарубежных исследователей, растущий уровень устойчивости *A. paragallinarum* к эритромицину и производным тетрациклина обусловлен наличием плазмиды с множественной лекарственной резистентностью [2].

В данных исследованиях более половины изолятов проявили резистентность к сульфаниламидным препаратам. Это может свидетельствовать о повсеместном использовании АБП с кормом не только для лечения, но и для профилактики различных инфекционных заболеваний бактериальной этиологии. Сульфаниламиды обладают бактериостатическим эффектом. Являясь по химической структуре аналогами парааминобензойной кислоты, они конкурентно ингибируют бактериальный фермент, ответственный за синтез дигидрофолиевой кислоты – предшественника фолиевой кислоты, которая является важнейшим фактором жизнедеятельности микроорганизмов. О выделении штаммов *A. paragallinarum*, резистентных к сульфаниламидным препаратам, сообщают и другие исследователи [4, 7].

Одним из последних антибиотиков, введенных в ветеринарную практику, является флорфеникол. На российском ветеринарном рынке он появился как заменитель широко распространенного левомицетина, который запрещен к применению в ряде стран Европы и в США. Механизм антимикробного действия флорфеникола связан с нарушением синтеза белков микроорганизмов. Препарат является производным тиамфеникола, в молекуле которого гидроксильная группа заменена атомом фтора. Обладает бактериостатическим действием, связываясь с рибосомальной субъединицей 50S в протоплазме бактериальной клетки, блокирует фермент пептидилтрансферазу, что приводит к торможению синтеза белка у чувствительных микроорганизмов на уровне рибосом. Лекарственная устойчивость к препарату развивается относительно медленно, при этом, как правило, перекрестной устойчивости к другим химиотерапевтическим средствам не возникает [1]. В данных исследованиях все изоляты *A. paragallinarum* показали высокую чувствительность к флорфениколу.

При использовании АБП следует помнить, что длительное бесконтрольное применение противомикробных средств снижает их терапевтическую



а



б

Рис. Зоны задержки роста изолята *A. paragallinarum* препаратами:

а) азитромицин, гентамицин, энрофлоксацин, эритромицин, тилмикозин;

б) тетрациклиновая группа, ко-тримоксазол, неомицин

эффективность и приводит к появлению устойчивых к ним форм микроорганизмов. Любые АБП, вне зависимости от их химико-фармакологической характеристики, всегда должны назначаться по результатам определения чувствительности возбудителя и использоваться согласно действующим инструкциям по их применению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большой арсенал АБП, разработанных и внедренных в ветеринарную практику, лечение бактериальных заболеваний птиц продолжает оставаться одной из актуальных проблем ветеринарии. Одной из причин недостаточной эффективности антибактериальной терапии является то, что широкое использование антибиотиков способствует росту резистентности возбудителя к традиционным препаратам, используемым в ветеринарии.

Высокий уровень резистентности изолятов *A. paragallinarum* к эритромицину, антибиотикам тетрациклиновой группы и сульфаниламидным препаратам ограничивает возможность их применения для эффективного лечения заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисенкова А., Новикова О., Оконецкий П. Флорфеникол в птицеводстве // Птицеводство. – 2012. – № 3. – С. 43–45.
2. Blackall P. J. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum* // Avian Dis. – 1988. – Vol. 32. – P. 742–747.
3. Blackall P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 12. – P. 627–632.
4. Detection of *Avibacterium paragallinarum* in commercial poultry and their antibiogram / R. Durairajan,

M. Sharma, M. S. Murugan // Tamil Nadu J. Vet. Animal Sci. – 2013. – Vol. 9, № 5. – P. 332–337.

5. Diseases of Poultry / B. W. Calnek [et al.]. – 9th ed. – Ames, Iowa, 1991. – P. 186–192.

6. Harmonisation of National Antimicrobial Resistance Surveillance and Monitoring Programmes // OIE. Terrestrial Animal Health Code. – 2015. – Vol. 1, Chap. 6.7. – P. 253–258.

7. Isolation and characterization of *Avibacterium paragallinarum* from ornamental birds in Thrissur, Kerala / P. M. Priya, S. V. Krishna, V. Dineshkumar, M. Mini // Intern. J. Life Sci. – 2012. – Vol. 1, № 3. – P. 87–88.

8. Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard / CLSI. – 3th ed. – Waine, PA, 2008. – M31-A3. – Vol. 28, № 8.

9. Poernomo S., Sutarma, Rafiee M., Blackall P. J. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia // Austral. Vet. J. – 2000. – Vol. 78. – P. 759–762.

10. Prabhakar T. G., Dorairajan R. S., Sivakumar S. Antibiotic sensitivity pattern of *Haemophilus* specie from infectious coryza in Namakkal // Indian J. Animal Sci. – 1998. – Vol. 68, № 9. – P. 888–889.

11. Prasad V., Krishnamurthy K., Murthy R. Antibiotic sensitivity of *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens // Indian Vet. J. – 1999. – Vol. 76. – P. 253–254.

12. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. / P. J. Blackall, H. Christensen, T. Beckenham [et al.] // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – Vol. 55. – P. 353–362.

13. Takahashi I., Honma Y., Saito E. Comparison of the susceptibility of *Haemophilus paragallinarum* to ofloxacin and other existing antimicrobial agents // J. Japan Vet. Med. Assoc. – 1990. – Vol. 43, № 3. – P. 187–191.