

УДК 619:615.33:636

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>  
Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор<sup>1</sup>  
Кучвальский М.В., научный сотрудник<sup>2</sup>

<sup>1</sup>УП «Научно-исследовательский институт “БиоФарм”», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск, Республика Беларусь

## СКОРОСТЬ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ К ПРЕПАРАТАМ АНТИБИОТИКОВ, ПРИМЕНЯЕМЫМ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

### Резюме

Пасса́ж потенциально патогенных микроорганизмов в диффузионном тесте с разведениями антибиотиков позволяет определить количество контактов препарата с микроорганизмами, приводящее к возникновению резистентных штаммов, что дает возможность скорректировать схему их применения для снижения риска развития резистентности микрофлоры и обеспечения эффективности лечения.

Антимикробные препараты с одинаковыми активно действующими веществами, но разных производителей могут отличаться по спектру действия и скорости развития резистентности к ним микрофлоры, что вызывает необходимость определения этих показателей при регистрационных испытаниях и корректировки инструкции по применению.

**Ключевые слова:** микробная антибиотикорезистентность, диффузионный тест, состав антимикробных препаратов.

### Summary

The passage of potentially pathogenic microorganisms in a diffusion test with dilutions of antibiotics makes it possible to determine the number of contacts of the drug with microorganisms, leading to the emergence of resistant strains, which makes it possible to adjust the scheme of their use to reduce the risk of developing microflora resistance and ensure the effectiveness of treatment. Antimicrobials with the same active substances, but from different manufacturers, may differ in the spectrum of action and the rate of development of microflora resistance to them, which makes it necessary to determine these indicators during registration tests and adjust the instructions for use.

**Keywords:** microbial antibiotic resistance, diffusion test, composition of antimicrobial drugs.

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Основная масса продуктов питания животного происхождения производится в животноводческих комплексах с высокой концентрацией поголовья животных и птиц. В течение производственного цикла в животноводческих помещениях лавинообразно возрастает численность микрофлоры и усиливается ее патогенность из-за пассажа в условиях тесного контакта животных [1]. Организм животных и иммунная система оказываются под нарастающим давлением микробного стресса, что снижает продуктивность и приводит к развитию заболеваний. В связи с этим применение антибактериальных средств и антибиотиков в промышленном животноводстве стало рутинной практикой [2]. Мировой объем производства антибиотиков для животноводства превышает 160 000 т, что

почти в 4 раза больше, чем производится для нужд медицины [2].

Золотой век антибиотиков продолжался до начала 60-х годов XX века, когда заметили появление резистентных штаммов микроорганизмов и снижение эффективности ряда препаратов. В настоящее время «срок жизни подавляющего большинства новых антибиотиков колеблется в пределах 1–3 лет» [2].

Распространено мнение, что применение антибиотиков для сельскохозяйственных животных создает проблему антибиотикорезистентности при лечении инфекций у людей [3, 4], но, видимо, это не так однозначно. Для человека ВОЗ выделяет критически опасные виды бактерий:

- карбопенемрезистентные: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*;

- с высоким приоритетом: *Enterococcus faecium* (ванкомицинрезистентный), *Staphylococcus aureus* (метициллин-, ванкомицинрезистентный), *Helicobacter pylori* (кларитромицинрезистентный) *Campylobacter spp.* и *Salmonellae spp.* (резистентные к фторхинолонам), *Neisseria gonorrhoeae* (цефалоспоринонрезистентные).

В Республике Беларусь зарегистрирован высокий уровень резистентности у *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* к цефтазидиму, цiproфлоксацину, амикацину, имипенему, меропенему, ампициллину, цiproфлоксацину, гентамицину и хлорамфениколу [5]. Однако основная часть указанных проблемных антибиотиков не используется в ветеринарии, а перечисленные виды бактерий в основном актуальны только для людей. Тем не менее ВОЗ считает необходимым регулировать применение антимикробных препаратов и обеспечить их надлежащее использование в животноводстве.

Одной из мер рационального использования антимикробных препаратов в Республике Беларусь стало включение в законодательство [6] требования изучения антибактериальных ветеринарных препаратов в отношении «возможности возникновения устойчивых штаммов микроорганизмов, ... скорости возникновения устойчивых штаммов микроорганизмов». Получение таких данных и соответствующая коррекция инструкций по применению исследованных антимикробных препаратов должны повысить эффективность лечения, снизить риск появления резистентных микроорганизмов и их миграции для человека. С этой целью было начато исследование антимикробных препаратов, которые предполагалось применять в животноводстве республики, изучение скорости развития резистентности к ним у распространенных потенциально патогенных микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали действие 150 антимикробных препаратов разных производителей на *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Pasteurella multocida*, *Bacillus megaterium* из

коллекций микроорганизмов «КМИЭВ» и ОКК ОАО «БелВитунифарм». Указанные культуры ранее не использовались в опытах, в которых могли бы контактировать с антибиотиками. Для исследования лиофилизированные микроорганизмы растворяли в стерильном изотоническом растворе и высевали на питательную среду, после получения роста они периодически пересеивались. Пересевы хранились при температуре +2...+8 °С, перед опытом проводился пересев и инкубация посевов в течение 1-2 суток при температуре 37 °С.

В исследованиях использовали принцип диффузионного теста по Kirby–Bauer, но с применением стандартных лунок и объема растворов антибиотиков. Для обеспечения ровного слоя среды в чашки Петри диаметром 90,0 мм, установленные на строго горизонтальной поверхности, вносили 20,0 мл, а в чашки диаметром 100,0 мм – 25,0 мл расплавленного сердечно-мозгового агар (Brain Heart Infusion Agar). Чашки с готовой средой засеивали суспензиями культур, вырезали по 2 лунки, вмещающие по 85,0 мкл разведений исследуемого антимикробного препарата. Для первого разведения подбирали такую концентрацию препарата, чтобы зона задержки роста, в частности *Staphylococcus aureus*, была в пределах 35–45 мм. Для второго разведения концентрацию уменьшали в 5 раз.

При изучении разных препаратов с одинаковыми активно действующими веществами (АДВ) использовали разведения с примерно одинаковыми их концентрациями. Разведения препаратов готовили на воде для инъекций или на диметилсульфоксиде при необходимости растворения препаратов на масляной основе и стерилизовали фильтрацией через фильтр Millex® 0.22 мкм.

Через 20–22 ч инкубирования посевов при температуре 37 °С проводили учет роста культур и определение размеров зон его задержки. Последующий пассаж проводили на следующий день после учета зон задержки роста. Для последующего пассажа брали бактериальную массу с границы двух зон задержки роста.

Уменьшение зон задержки роста в каждом пассаже свидетельствовало о росте резистентности микроорганизмов к препарату. Считали, что выраженная резистент-

ность отмечается, если в очередном пассаже в первом разведении препарата формируется зона диаметром 14,0 мм и меньше. При этом, как правило, второе разведение препарата вообще не задерживало роста, или зона задержки не превышала 10,0–11,0 мм.

Результаты теста оценивали по шкале:

«+» – резистентность не развилась при проведении пассажей по числу, равному количеству введений препарата, рекомендованному в инструкции по его применению;

«±» – не обеспечивается заявленный спектр активности или быстро появляется резистентность у какого-либо рода микроорганизмов;

«-» – резистентность развивается к 2 и более родам микроорганизмов за меньшее количество пассажей, чем количество введений, предусмотренное в инструкции препарата.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что препараты с одинаковыми АДВ, но разных производителей могли отличаться по активности и скорости развития резистентности микрофлоры. Так, считается, что доксициклин активен в отношении аэробных грамотрицательных бактерий, в частности *Escherichia coli*. В таблице 1 и на рисунке 1 представлены результаты сравнения действия на *E. coli* препаратов с одинаковым содержанием доксициклина, но разных производителей. Как видно, препарат «Д-д» оказывал выраженное действие на этот вид бактерий до VII пассажа. Активность препарата «Д-о»

была как минимум в 2 раза ниже, чем у препарата «Д-д», причем полная резистентность к нему появилась у *E. coli* уже в III пассаже после 2 контактов. Препарат «Д-п» вообще не действовал на *E. coli*.

В основном большинство изученных препаратов с доксициклином при первом применении эффективно действовали на стафилококки, стрептококки, кишечную палочку, бордетеллы, сальмонеллы, но их чувствительность уже после первого контакта с препаратами, как правило, снижалась, хотя они еще оказывали достаточно эффективное действие. Чувствительность сальмонелл после первого контакта с препаратами почти не уменьшилась (таблица 2).

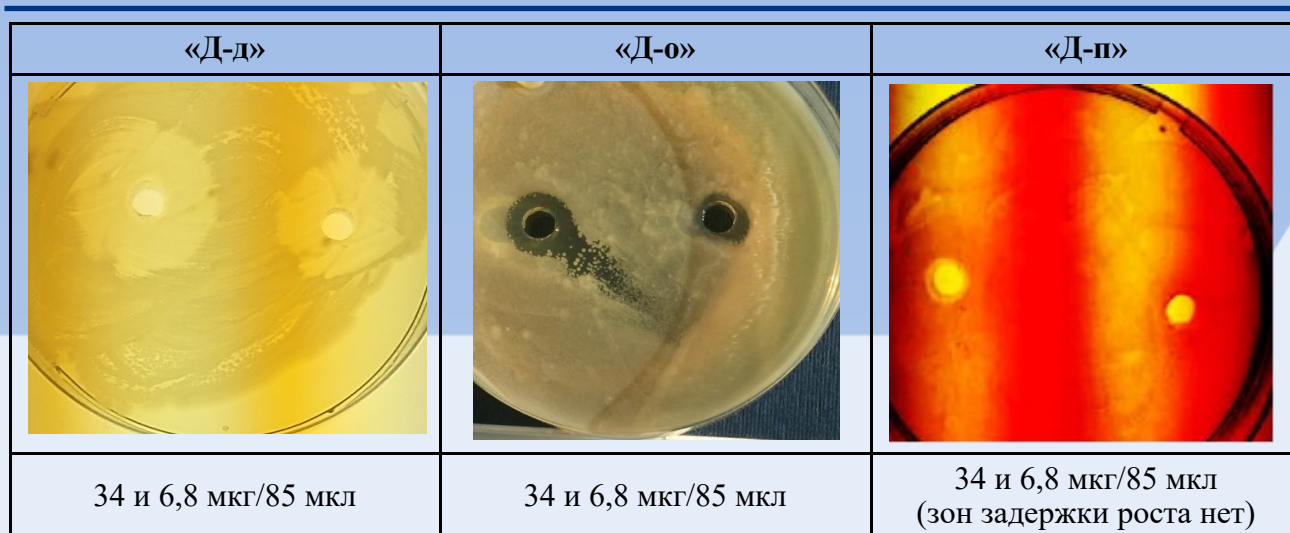
Вместе с тем важно то, что в III пассаже после двух контактов у стафилококков, кишечной палочки, бордетелл, сальмонелл развивалась выраженная резистентность к препаратам доксициклина, проявлявшаяся отсутствием зон задержки роста или их значительным уменьшением (таблица 2).

При исследовании 20 препаратов группы пенициллина и полусинтетических препаратов широкого спектра группы пенициллинов (таблица 3) установлено, что ко всем препаратам феноксиметилпенициллина резистентность могла развиваться при проведении курсов лечения, рекомендованных инструкциями по их применению (таблица 3). Комбинация бензилпенициллина со стрептомицином не решала проблему развития резистентности микроорганизмов. При исследовании 3 таких препаратов во всех случаях резистентность развивалась к обоим компонентам.

Таблица 1 – Результаты пассажа в диффузионном тесте *E. coli* с разведениями препаратов доксициклина (34 и 6,8 мкг/85 мкл) разных производителей (диаметры зон задержки роста в мм)

Пассаж	«Д-д»		«Д-о»		«Д-п»	
	34 мкг/ 85 мкл	6,8мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл
I	28	22	14	9	0	0
II	21	18	12	8	-	-
III	21	17	0	0	-	-
IV	21	17	-	-	-	-
V	23	20	-	-	-	-
VI	25	13	-	-	-	-
VII	0	0	-	-	-	-

Примечание – красным цветом обозначены размеры зон задержки роста, указывающие на резистентность микроорганизма к данному разведению препарата



**Рисунок 1 – Сравнение результатов I пассажа *E. coli* с разведениями препаратов доксициклина разных производителей (уменьшение зон задержки роста разных препаратов с одинаковой концентрацией АДВ)**

Из 9 исследованных препаратов амоксициллина только к 2 (22,2 %) резистентность не развивалась при числе пассажей, равном рекомендуемому количеству введений препарата (таблица 3). В из-

вестной степени проблему решало добавление к амоксициллину клавулановой кислоты. Из 4 таких препаратов только в 1 случае (25 %) отмечено быстрое появление резистентных микроорганизмов (таблица 3).

**Таблица 2 – Диаметры зон задержки роста культур микроорганизмов в диффузионном тесте с разведениями препаратов на основе доксициклина (в мм)**

Вид бактерий	Пассажи/разведения препаратов					
	I		II		III	
	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл	34 мкг/ 85 мкл	6,8 мкг/ 85 мкл
<i>Staphylococcus aureus</i>	43	35	26	24	17	0
<i>Streptococcus epidermidis</i>	29	24	22	18	15	10
<i>Escherichia coli</i>	34	23	18	11	0	0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	29	23	21	16	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	21	18	21	15	15	11

Примечание – красным цветом обозначены размеры зон задержки роста, указывающие на резистентность микроорганизма к данному разведению препарата

**Таблица 3 – Результаты исследования препаратов различных классов антибиотиков**

Действующие вещества или их комбинации	Количество наименований препаратов	+	±	-
1	2	3	4	5
<b>Пенициллины</b>				
Феноксиметилпенициллин	2	-	-	2
Амоксициллин	9	2	5	2
Амоксициллин, клавулановая кислота	4	3	-	1
Бензилпенициллин+стрептомицин	3	-	-	3
Амоксициллин+колистин	2	1	-	1

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
Макролиды				
Азитромицин	5	2	3	-
Азитромицин+левофлоксацин	2	2	-	-
Тилдипирозин	1	1	-	-
Тилмикозин	4	1	2	1
Тулатромицин	5	4	1	-
Тилозин	6	1	3	2
Тилмикозин+энрофлоксацин+триметоприм	1	1	-	-
Гамитромицин	1	1	-	-
Тетрациклины				
Окситетрациклин	5	5	-	-
Доксициллин	10	1	6	3
Доксициклин+тилозин	1	-	1	-
Хлортетрациклин+тиамулин	1	-	-	1
Доксициклин+колистин	2	-	1	1
Доксициклин+гентамицин	1	-	1	-
Хлортетрациклин	1	1	-	-
Окситетрациклин+эритромицин+стрептомицин+ колистин	1	-	1	-
Линкозамиды				
Линкомицин	3	-	1	2
Линкомицин+спектиномицин	3	1	-	2
Флорфеникол+линкомицин	1	1	-	-
Клиндамицин+спектиномицин	1	-	-	1
Фторхинолоны				
Марбофлоксацин	4	2	-	2
Норфлоксацин+колистин	1	-	-	1
Энрофлоксацин	10	5	-	5
Энрофлоксацин+колистин	2	2	-	-
Энрофлоксацин+триметоприм	1	1	-	-
Энрофлоксацин+колистин+триметоприм	3	2	-	1
Энрофлоксацин+амоксициллин	1	1	-	-
Левифлоксацин	2	-	-	2
Ципрофлоксацин	1	1	-	-
Офлоксацин	2	-	-	2
Сульфаниламиды				
Фосфомицин+триметоприм	2	-	-	2
Сульфадиазин+триметоприм	3	-	-	3
Сульфадиметоксин+триметоприм	1	-	1	-
Сульфаметоксазол	1	-	-	1
Линкозамиды				
Линкомицин	3	-	1	2
Линкомицин+спектиномицин	3	1	-	2
Флорфеникол+линкомицин	1	1	-	-
Клиндамицин+спектиномицин	1	-	-	1

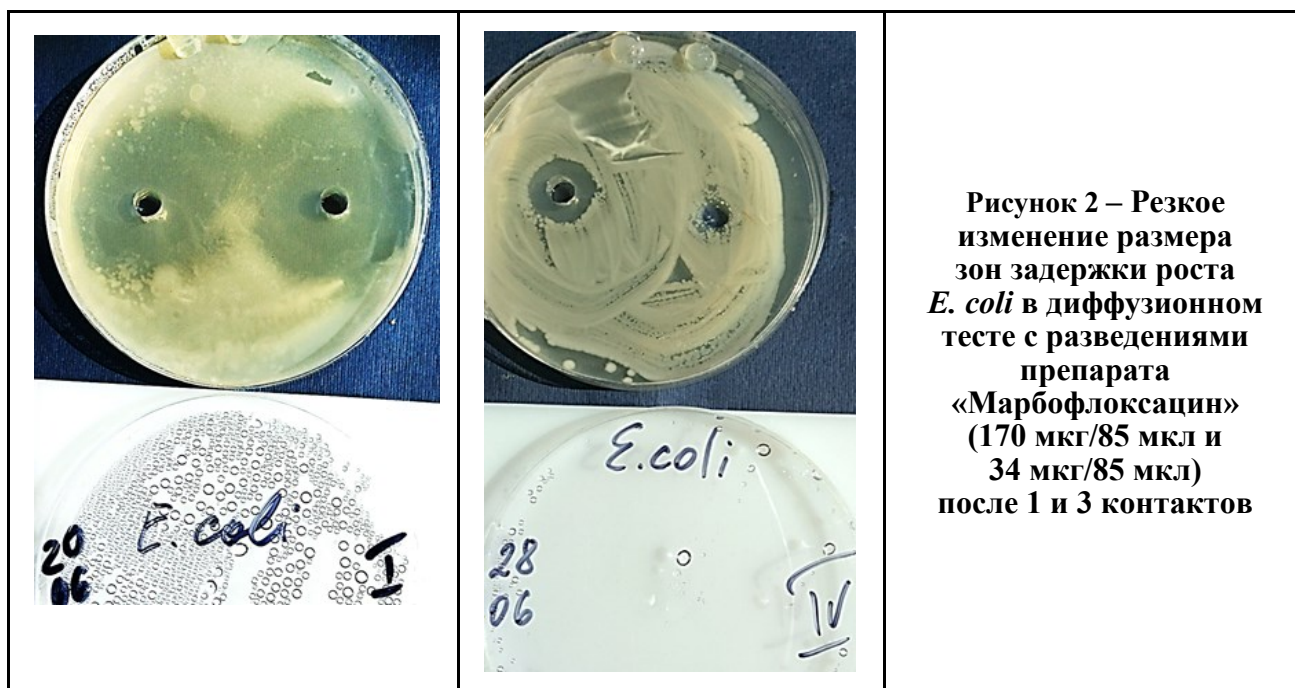
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
Иные группы антибиотиков				
Меквиндокс (хиноксолины)	1	-	-	1
Цефтиофур (цефалоспорины)	10	2	4	4
Вирджиниамицин (стрептограминовые антибиотики)	1	-	-	1
Флорфеникол (фторированный синтетический аналог тиамфеникола)	11	3	-	8
Фосфомицин+тилозин (производные фосфоновой кислоты)	1	-	1	-
Тиамулин (полусинтетические дериваты дитерпенового антибиотика плевромутилина)	7	1	3	3
Тиамулин+тилозин	1	-	1	-
Колистин (циклические полипептидные антибиотики)	6	-	4	2

При исследовании 25 препаратов макролидов и подкласса азалидов (таблица 3) установлено, что только к 13 (52 %) не развивалась резистентность при соответствии количества пассажей и рекомендуемых введений препаратов.

Из 22 препаратов тетрациклина, полусинтетических антибиотиков группы тетрациклинов широкого спектра, только к

7 (31,8 %) не развивалась резистентность микроорганизмов при соответствии количестве пассажей рекомендуемому числу введений препаратов (таблица 3). При этом комбинация, в частности, доксициклина с колистином, гентамицином и тилозином не решала проблемы спектра активности и скорости развития резистентности.



**Рисунок 2 – Резкое изменение размера зон задержки роста *E. coli* в диффузионном тесте с разведениями препарата «Марбофлоксацин» (170 мкг/85 мкл и 34 мкг/85 мкл) после 1 и 3 контактов**

Из 27 препаратов фторхинолонов только 14 (51,9 %) не создавали риска появления резистентных штаммов в процессе применения (таблица 3). Тем не менее даже повторяющийся контакт микроорганизмов с одним из наиболее эффективных

АДВ – марбофлоксацином – мог быстро способствовать развитию резистентности (рисунок 2). Ко всем 7 исследованным препаратам сульфаниламидов резистентность микроорганизмов развивалась после 1-2 контактов (таблица 3).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что анти-микробные препараты с одинаковыми активно действующими веществами, но разных производителей могут существенно отличаться друг от друга по спектру действия и скорости развития резистентности к ним микрофлоры. Это подтверждает необходимость определения этих показателей при регистрационных испытаниях и проведения дополнительных исследований, если при производстве зарегистрированного препарата начинают использовать активно действующее вещество иного происхождения.

Необходимо отметить, что в большинстве случаев, независимо от природы и качества антибиотика, каждый его контакт с микроорганизмами вызывает рост их устойчивости. В связи с этим, особенно при групповом применении антибиотиков путем выпойки или в смеси с кормом, для предупреждения миграции микрофлоры с возрастающей резистентностью целесообразно проводить профилактическую дезинфекцию.

Результаты диффузионного теста, возможно, в полной мере не отражают сложных процессов воздействия антибиотиков на бактерии *in vivo* и развития у них резистентности, но формально показывают количество контактов препарата с микроорганизмом, приводящее к возникновению резистентности. Это позволяет оценить качество препарата, скорректировать схему его применения для снижения риска развития резистентности микрофлоры и обеспечения эффективности лечения. Только 32 % исследованных препаратов антибиотиков при заявленном числе введений не вызывали выраженной резистентности. К 42 % препаратов резистентность микрофлоры развивалась уже после 1–3 контактов при рекомендованном курсе 4–7-кратного применения, а 26 % препаратов не обеспечивали заявленный спектр активности или вызывали быстрое развитие резистентности у микроорганизмов 1–2 родов. То есть применение таких препаратов согласно инструкции обязательно приводило бы к появлению резистентных штаммов. Но, исходя из этих результатов, были даны рекомендации по сокращению продолжительности лечения и количеству введений препаратов.

Исходя из полученных результатов, нужно отметить, что пенициллины можно применять только однократно, причем их сочетание со стрептомицином не решает проблем эффективности и быстрого появления резистентных микроорганизмов. Альтернативой может быть применение амоксициллина, особенно с клавулановой кислотой.

Проблематично использование для лечения бактериальных инфекций сульфаниламидов, в том числе в сочетании с препаратами других групп.

В целом из «проблемных» антибиотиков необходимо выделить тилозин, тилмикозин, доксициклин, флорфеникол, линкомицин, тиамулин, цефтиофур, колистин, эффективность которых очень зависела от производителя.

Можно согласиться с необходимостью государственного регулирования использования в животноводстве критически важных для медицины антибиотиков (фторхинолоны и цефалоспорины третьего и четвертого поколений) и их применения у животных только в случаях крайней необходимости [7]. В известной степени появлению резистентных микроорганизмов может способствовать использование субстанций низкого качества. В частности, только 51,9 % исследованных препаратов фторхинолонов не создавали риска появления резистентных штаммов в процессе применения.

В целом необходимо:

- отказаться от нерегулируемого применения антибиотиков;
- продолжать осуществлять контроль качества антимикробных препаратов, применяемых в животноводстве;
- постоянно проводить контроль чувствительности потенциально патогенной микрофлоры и использовать антибиотики согласно полученным данным;
- сокращать продолжительность применения препаратов и проводить их ротацию;
- исключить применение критически важных для медицины антибиотиков;
- снижать объемы применения антибиотиков за счет регулярного проведения дезинфекции и улучшения условий содержания животных.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Высоцкий, А. Э. Изменение видового состава микрофлоры воздуха свиноводческих помещений за технологический цикл / А. Э. Высоцкий // Ветеринарная наука – производству : сб. науч. тр. / РУП «ИЭВ». – Минск, 2007. – Вып. 39. – С. 71–79.
2. Маляян, Э. С. Проблема использования антибиотиков в животноводстве и пути контроля микробной антибиотикорезистентности (МАР) [Электронный ресурс] / Э. С. Маляян // НПК «Фарминдустрия». – 2020. – Режим доступа: <https://pharmindustria.com/projects/poleznye-stati-po-veterinariii/problema-ispolzovaniya-antibiotikov-v-zhivotnovodstve-puti-kontrolya-mikrobnoj-antibiotikorezistentnosti/>. – Дата доступа: 02.05.2024.
3. Руководящие принципы ВОЗ по применению важных в медицинском отношении противомикробных препаратов в продовольственном животноводстве: исполнительное резюме [Электронный ресурс] // ВОЗ, Институциональное хранилище для обмена информацией. – 2017. – Режим доступа: <https://iris.who.int/handle/10665/259245>. – Дата доступа: 02.05.2024.
4. Прунтова, О. В. Современное представление о механизмах антимикробной резистентности бактерий (аналитический обзор) / О. В. Прунтова, В. С. Русалеев, Н. Б. Шадрова // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 7–13.
5. Антибиотикорезистентность, новые возможности антибактериального воздействия / А. Н. Косинец [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 70–76.
6. Положение о порядке государственной регистрации ветеринарных препаратов, ведения Государственного реестра ветеринарных препаратов, порядке и условиях выдачи регистрационного свидетельства ветеринарного препарата [Электронный ресурс]: утв. постановлением Совета Министров Респ. Беларусь 29.04.2017 г. № 317 // КонсультантПлюс. Беларусь / ООО «ЮрСпектр», Нац. центр правовой информ. Респ. Беларусь. – Минск, 2024.
7. Забровская, А. В. Чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства / А. В. Забровская // VetPharma. – 2012. – № 5. – С. 20–24.

**БЕЛРАБОРАЛ**

приманка антирабическая для  
пероральной иммунизации  
плотоядных животных  
против бешенства

- ▶ содержит вакцину из штамма вируса бешенства «КМИЭВ-94»;
- ▶ применяется в осенне-зимний и зимне-весенний периоды и раскладывается в местах обитания животных, поедаемость 100%-ная;
- ▶ иммунологическая эффективность – 93 %; иммунитет к бешенству вырабатывается в течение 21–30 суток и сохраняется до 1 года и более;
- ▶ для обеспечения стойкого благополучия местности по бешенству оральную вакцинацию необходимо проводить ежегодно двукратно в течение 3 лет после последнего случая заболевания;
- ▶ биоразлагаемая



**НОВИНКА!**

[WWW.BIEVM.BY](http://WWW.BIEVM.BY)