



УДК 582.284:619:616.33/34

Антимикробная активность препаратов нового поколения – продуктов биотехнологии на основе грибов-ксилотрофов в отношении энтерогеморрагической кишечной палочки

В. А. Чхенкели, А. Е. Калинович

Иркутская государственная сельскохозяйственная академия, Иркутск
E-mail: chkhenkeli@rambler.ru

Аннотация. Представлены данные мониторинговых исследований по диагностике энтерогеморрагической кишечной палочки (ЭГКП) серотипа O157:H7 у крупного рогатого скота в хозяйствах Иркутской области. Впервые авторами использовался иммунохроматографический метод исследования с применением тест-систем. Установлено, что ЭГКП серотипа O157:H7 выявляются во всех возрастных группах животных. В работе представлены данные по изучению чувствительности/устойчивости 35 изолятов к антимикробным препаратам. Установлено, что штаммы ЭГКП, выделенные от больных телят, обладают множественной резистентностью к современным лекарственным средствам, используемым для лечения колибактериоза в хозяйствах региона. Наибольшей чувствительностью выделенные изоляты обладают к антибиотикам цефалоспориновой группы различных поколений (I-IV). Экспериментально *in vitro* впервые показано, что 62,9 % штаммов являются чувствительными к новому ветеринарному препарату траметин, получаемому с использованием методов биотехнологии на основе гриба-ксилотрофа *Trametes pubescens* (Shumach.:Fr.) Pilat.

Ключевые слова: энтерогеморрагическая кишечная палочка, антимикробная активность, чувствительность, устойчивость.

Введение

Одним из приоритетных направлений развития микологии и биотехнологии является сегодня разработка технологий с использованием грибов-ксилотрофов для получения биологически активных соединений, в том числе и антимикробных. Многие из них являются фармакологически высокоактивными, а также менее токсичными и более эффективными для применения в медицинской и ветеринарной практике по сравнению с продуктами химического синтеза [10].

С другой стороны, мощнейшими экологическими факторами биотического характера, влияющими на организм животных, являются патогенные микроорганизмы, которые в свою очередь являются и факторами этиологическими, т. е. вызывающими инфекционные болезни [3]. Так, острые же-

лудочно-кишечные заболевания новорожденных телят наносят большой экономический ущерб в хозяйствах России, в том числе в Иркутской области [8; 12–15]. Этиология же этих заболеваний в различных хозяйствах неоднозначна. Задача усложняется тем, что наряду с хорошо изученными возбудителями получили распространение энтерогеморрагические серотипы эшерихий, выявление и диагностика которых в настоящее время в ветеринарии, как и в медицине, не получила широкого распространения [11]. Наиболее распространённым и значимым для здравоохранения серологическим вариантом энтерогеморрагической кишечной палочки (ЭГКП) является серовар O157:H7.

Цель настоящей работы состояла в проведении мониторинговых исследований по диагностике ЭГКП серотипа O157:H7 у крупного рогатого скота в хозяйствах Иркутской области, изучении возможности использования ветеринарного препарата траметин, получаемого на основе гриба-ксилотрофа *Trametes pubescens*, в системе борьбы с колибактериозом.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись коровы различных возрастных групп: 93 животных с молочно-товарной фермы производственного отдела НИИСХ Россельхозакадемии, 105 животных с МТФ СХ ОАО «Белореченское». Для проведения мониторинговых исследований для экспресс-оценки антигена ЭГКП O157:H7 в фекалиях крупного рогатого скота разного возраста на молочно-товарных фермах использовали тест-системы «*E. coli* O157:H7 Тест» производства Novated Ltd (Израиль) [7].

Определение чувствительности/устойчивости выделенных культур ЭГКП к антимикробным препаратам проводили общепринятым методом диффузии в агар с использованием наборов для определения чувствительности/устойчивости энтеробактерий к антимикробным препаратам производства НИЦФ (Санкт-Петербург). В эксперименте определяли также чувствительность/устойчивость выделенных штаммов к получаемому методом жидкофазной ферментации на основе гриба-ксилотрофа *T. pubescens* (штамм 0663) препарату траметин, разработанному в Иркутском филиале Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии в лаборатории биотехнологии и болезней молодняка.

Результаты и обсуждение

Предлагаемые сегодня молекулярно-генетические методы исследования (ПЦР), метод иммуноферментного анализа (ИФА) являются современными и высокоточными для выявления ЭГКП [1; 2; 4–6]. Однако они могут использоваться весьма ограниченно: только в крупных диагностических центрах ветеринарного профиля. В регионе эти методы используются для ветеринарных исследований только в ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория».

Анализ литературы и собственные экспериментальные данные позволили констатировать, что наиболее приемлемым в ветеринарной практике

является усовершенствованный метод выделения и идентификации *E. coli* O157:H7 из биологического материала от сельскохозяйственных, домашних животных и птицы, предложенный И. С. Онищенко с соавторами [11]. Предложенная схема позволяет в течение 56 ч исследовать биологический и патологический материал от животных-бактерионосителей *E. coli* O157:H7. Однако такие сроки исследования представляются длительными.

В медицине для выделения и идентификации ЭГКП серотипа O157:H7 используется метод, разработанный Федеральным центром Госсанэпиднадзора Минздрава России [9], сущность которого заключается в использовании биохимических особенностей этого микроорганизма. Основным недостатком данного метода, затрудняющим его применение в ветеринарии, является различие микробного состава нормофлоры кишечника животных и человека, что не позволяет в качестве первичной среды использовать сорбитол-агар.

Сегодня альтернативой ИФА является использование быстрых иммунохроматографических тестов. Их чувствительность и специфичность близки к соответствующим показателям наборов для ИФА. При этом экспресс-тесты выполняются быстро (как правило, не более чем за 15 мин). Проведение анализа и интерпретация результата очень просты. Для проведения анализа не требуется специальное оборудование. Очень важно, что анализ может быть проведён непосредственно в очаге инфекции, что позволяет избежать потери времени на транспортировку образца в лабораторию. В результате проведённых нами исследований было выделено 35 штаммов ЭГКП O157:H7.

Таким образом, наиболее оптимальным для практики является использование и внедрение иммунохроматографического метода идентификации ЭГКП с использованием современных тест-систем, что позволит быстро, качественно и экономично провести мониторинг на циркуляцию ЭГКП на молочно-товарных фермах в хозяйствах Иркутской области. При этом стоимость одного анализа составляет всего 150 руб., что в 4 раза дешевле, чем при использовании тест-систем производства R-Biopharm (Германия). Так, при проведении мониторинговых исследований на МТФ с поголовьем в 800 голов, затраты составят от 9 000 до 10 500 руб. из расчёта, что поголовье телят составляет 60–70 голов.

В таблицах 1 и 2 представлены результаты исследований по определению чувствительности/устойчивости штаммов, выделенных от животных. Полученные данные свидетельствуют о том, что изоляты являются устойчивыми к большинству используемых антимикробных препаратов, относящихся к различным группам химических соединений, в том числе и к наиболее часто используемым для лечения в хозяйствах области. Этот факт, вероятно, объясняет многолетнее циркулирование кишечной инфекции на МТФ производственного отдела НИИСХ Россельхозакадемии.

Таблица 1

Устойчивость/чувствительность клинических штаммов серотипа O157:H7, выделенных от животных, содержащихся на МТФ производственного отдела НИИСХ Россельхозакадемии

Антимикробные препараты	№ выделенных культур ЭГКП серотипа O157:H7															
	6	13	28	30	42	46	53	55	64	70	72	73	77	80	82	89
Ампициллин	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Цефазолин	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Цефалотин	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Цефуроксим	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Цефотаксим	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Цефтриаксон	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Цефтазидим	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Цефалексин	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Цефепим	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Тетрациклин	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Левомецетин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Канамицин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Гентамицин	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Тобрамицин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Амикацин	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Карбенициллин 25 мкг	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Полимиксин	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Фурадонин	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Офлоксацин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ципрофлоксацин	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Траметин	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+

Примечание: «+» – чувствительность; «-» – резистентность.

Таблица 2

Устойчивость/чувствительность клинических штаммов серотипа O157:H7, выделенных от животных, содержащихся на МТФ СХ ОАО «Белореченское»

Антимикробные препараты	№ выделенных культур ЭГКП серотипа O157:H7																		
	4	5	27	32	34	39	46	48	49	51	52	59	60	61	65	66	71	72	73
Ампициллин	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Цефазолин	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Цефалотин	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Цефуроксим	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Цефотаксим	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Цефтриаксон	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Цефтазидим	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Цефалексин	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Цефепим	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Тетрациклин	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Левомецетин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Канамицин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Гентамицин	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Тобрамицин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Амикацин	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Карбенициллин 25 мг	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Полимиксин	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Фурадонин	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Офлоксацин	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ципрофлоксацин	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Траметин	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-

Примечание: «+» – чувствительность; «-» – резистентность.

Установлено, что наибольшей чувствительностью штаммы обладают к антибиотикам цефалоспориновой группы различных поколений (I–IV). Впервые экспериментально *in vitro* результаты получены и при использовании препарата траметин. Так, чувствительность к этому препарату проявили 22 штамма из 35 (62,9 %). Чувствительность к β -лактамам антибиотикам проявили 28 штаммов (80,0 %), к цефалоспорином – 31 штамм (88,6 %), к антибиотикам тетрациклиновой группы – 16 штаммов (45,7 %), к аминогликозидам – 11 штаммов (31,4 %), к полипептидам – 4 штамма (11,4 %), к фторхинолонам – 11 штаммов (31,4 %), к нитрофуранам – 21 штамм (60 %). Показано, что чувствительными к траметину являются 22 штамма (62,9 %).

Таким образом, использование препарата траметин целесообразно для лечения колибактериоза, этиологическим фактором которого является ЭГКП серотипа O157:H7. Курс лечения при этом составляет 165 руб., что несравненно дешевле, чем при использовании других препаратов. Профилактика приводит к 100%-ной сохранности поголовья телят, экономическая эффективность составляет 10,3 руб. на 1 руб. затрат.

Заключение

ЭГКП серотипа O157:H7 выявляются практически во всех возрастных группах животных, содержащихся на МТФ. У телят, у которых были выделены ЭГКП, проявлялись симптомы проявления острых кишечных инфекций. Экспериментально от животных разных возрастных групп было выделено 35 штаммов ЭГКП. Изоляты являются полирезистентными к антимикробным препаратам, применяемым в хозяйствах Иркутской области. Является актуальным использование эффективных полифункциональных препаратов, разработанных и производимых в регионе, в том числе и траметина, получаемого на основе гриба *T. pubescens*.

Список литературы

1. Брюсова М. Б. Разработка ПЦР тест-системы для выявления и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli* и *E. coli* O157:H7 / М. Б. Брюсова, И. Л. Обухов // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – 2007. – Т. 68. – С. 162–168.
2. Брюсова М. Б. Идентификация и дифференциация энтерогеморрагических *E. coli* методом ПЦР / М. Б. Брюсова, И. Л. Обухов, О. А. Тугаринов // Ветеринария. – 2008. – № 12. – С. 45–48.
3. Ветеринарная экология / А. Н. Ахмадеев [и др.]. – М. : Колос, 2002. – 240 с.
4. Идентификация и дифференциация энтерогеморрагических *E. coli* и *E. coli* O157:H7 методом полимеразной цепной реакции / М. Б. Брюсова [и др.] // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – 2005. – Т. 66. – С. 161–166.
5. Идентификация и дифференциация энтерогеморрагических *E. coli* и *E. coli* O157:H7 методом полимеразной цепной реакции / М. Б. Брюсова [и др.] // Сб. тр. 6-й Всерос. науч.-практ. конф. «Молекулярная диагностика». – М., 2007. – Т. 1. – С. 224–226.
6. Идентификация энтерогеморрагических *E. coli* и дифференциация *E. coli* O157:H7 методом полимеразной цепной реакции / М. Б. Брюсова [и др.] // Ветеринария. – 2008. – № 12. – С. 42–49.

7. Калинович А. Е. Методические рекомендации по индикации и диагностике энтерогеморрагической кишечной палочки / А. Е. Калинович, В. А. Чхенкели. – Иркутск : ИрГСХА, 2012. – 16 с.

8. Колибактериоз телят в современных экологических условиях Сибири (Особенности эпизоотологии, клинического проявления, патогенез, диагностика, меры профилактики и борьбы) : метод. рекомендации / А. С. Кашин [и др.] – Барнаул : АзБука, 2003. – 79 с.

9. МУК 4.2.002–00. Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157 : H7. – М., 2000. – 19 с.

10. Некоторые аспекты изучения антимикробной активности грибов-ксилотрофов рода *Trametes* / В. А. Чхенкели [и др.] // Сиб. мед. журн. – 2011. – №2. – С. 82–86.

11. Онищенко И. С. Распространение, биологические свойства и эпидемиологическое значение кишечной палочки серотипа O157:H7 циркулирующей среди сельскохозяйственных и мелких домашних животных / И. С. Онищенко, Н. А. Шкиль, В. Ю. Коптев // Материалы междунар. конф., посвящ. 80-летию Самар. НИВС Россельхозакадемии. – Самара, 2009. – С. 308–313.

12. Роль вирусных агентов в этиологическом многообразии желудочно-кишечных заболеваний телят в Иркутской области / В. А. Чхенкели [и др.] // Вестн. ИрГСХА. – 2012. – № 51. – С. 94–103.

13. Чхенкели В. А. Методические рекомендации по применению современных лекарственных средств для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний новорождённых телят / В. А. Чхенкели, В. Л. Тихонов, Н. А. Шкиль. – Иркутск : РАСХН, Сиб. отд-ние, ИФ ИЭВС и ДВ, 2006. – 40 с.

14. Чхенкели В. А. Система мероприятий по лечению и профилактике желудочно-кишечных заболеваний телят в Иркутской области : метод. рекомендации / В. А. Чхенкели, Н. А. Шкиль, В. Л. Тихонов. – Иркутск : РАСХН, Сиб. отд-ние, ИФ ИЭВС и ДВ, 2010. – 62 с.

15. Чхенкели В. А. Эпизоотологический мониторинг по колибактериозу телят в Иркутской области / В. А. Чхенкели, Т. В. Глушенкова // Актуальные вопросы аграрной науки. – 2012. – Вып. 2. – С. 30–37.

Antimicrobial Activity of the New Generation Preparations – Products of Biotechnology on the Basis of Xylotrophe Fungi Against Enterohaemorrhagic *E. coli*

V. A. Chkhenkeli, A. E. Kalinovich
Irkutsk State Agricultural Academy, Irkutsk

Abstract. The work shows the data of monitoring research on diagnosis of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 among the cattle on the farms of Irkutsk region. For the first time the authors have used immunochromatographic method of research with the use of test-systems “*E. coli* O157:H7 Test” produced by Novated Ltd (Israel). It was established that EHEC O157:H7 can be revealed among the animals of different age groups. The work shows the results of research of susceptibility/resistance of 35 isolates. As it was established, strains of EHEC received from ill calves bear strong resistance against modern medication used nowadays to treat colibacteriosis at the farms of the region. The separated isolates possess the highest susceptibility to antibiotics of the

cephalosporin group of various generations (I-IV). Experiments *in vitro* have shown for the first time that 62,9 % of strains are susceptible to the new veterinary medication trametin received with the use of biotechnological methods on the basis of xylophore fungus *Trametes pubescens* (Shumach.:Fr.) Pilat.

Keywords: enterohaemorrhagic *E. coli*, antimicrobial activity, susceptibility, resistance.

Чхенкели Вера Александровна
доктор биологических наук, профессор
заведующий кафедрой
Иркутская государственная
сельскохозяйственная академия
664007, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 59
тел.: (3952) 29-09-75
e-mail: chkhenkeli@rambler.ru

Chkhenkeli Vera Aleksandrovna
Doctor of Sciences (Biology), Professor
Head of Department
Irkutsk State Agricultural Academy
59, Timiryazev st., Irkutsk, 664007
tel.: (3952) 29-09-75
e-mail: chkhenkeli@rambler.ru

Калинович Арсений Евгеньевич
аспирант
Иркутская государственная
сельскохозяйственная академия
664007, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 59
тел.: (3952) 29-09-75
e-mail: chkhenkeli@rambler.ru

Kalinovich Arseniy Evgenyevich
Postgraduate
Irkutsk State Agricultural Academy
59, Timiryazev st., Irkutsk, 664007
tel.: (3952) 29-09-75
e-mail: chkhenkeli@rambler.ru