

МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 618.616-002:616-093:636.2

Антибіотикорезистентність ізолятів *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, що спричиняють мастит на молочних фермах України

Шевченко М.В. , Андрійчук А.В. 

Білоцерківський національний аграрний університет

✉ E-mail: Шевченко М.В. maks.7991@gmail.com; Андрійчук А.В. andriichuk.av@gmail.com



Шевченко М.В., Андрійчук А.В. Антибіотикорезистентність ізолятів *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, що спричиняють мастит на молочних фермах України. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2023. № 1. С. 81–88.

Shevchenko M., Andriichuk A. Antibiotic resistance of isolates of *Staphylococcus spp.* and *Streptococcus spp.* causing mastitis on dairy farms in Ukraine. *Nauk. visn. vet. med.*, 2023. № 1. PP. 81–88.

Рукопис отримано: 15.05.2023 р.

Прийнято: 23.05.2023 р.

Затверджено до друку: 25.05.2023 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2023-180-1-81-88

Мастити – найбільш поширена патологія корів, що завдає значних економічних збитків молочним господарствам. Часто збудниками маститу слугує група інфекційно асоційованих збудників, що можуть передаватися між тваринами. Здебільшого патологічний процес у субклінічно та клінічно хворих тварин спричиняє кокова грампозитивна мікрофлора. Значною проблемою є механізми набуття мікроорганізмами стійкості до одного або декількох антибактеріальних засобів. У зв'язку з цим стандартні схеми лікування, що застосовують у господарстві, стають неієвими. В публікації наведені результати вивчення стійкості до антибіотиків 45 ізолятів *Staphylococcus spp.* та 22 ізолятів *Streptococcus spp.* У дослідженні були використані хромогенні середовища CHROMagar™ Mastitis, CHROMagar™ Orientation та CHROMagar™ MH Orientation, що допомогло прискорити ізоляцію та ідентифікацію культур. Фенотиповий профіль стійкості до антибіотиків визначали за допомогою методу дифузії в агар. *Staphylococcus aureus* та коагулазонегативні *Staphylococcus* (CoNS) виявляли високий рівень стійкості до беталактамів пеніцилінового класу бензилпеніциліну – 60 та 66,7 %. *Streptococcus disgalactiae* та *Streptococcus agalactiae* виявляли високу стійкість до тетрацикліну – 46,7 і 35,3 %. Зокрема *Streptococcus agalactiae* мав високу стійкість до кліндаміцину – 35,3 %, *Streptococcus disgalactiae* до бензилпеніциліну – 29,4 %, *Streptococcus uberis* до кліндаміцину – 75 %. Найменшу стійкість проявляли до антибіотика ванкоміцину – 6,7 % виділених стафілококів та 13,3 % стрептококів. MAR індекс більше 0,2 мали 75 % *Streptococcus uberis*, 60 % CoNS та 52,9 % *Streptococcus agalactiae*. Більше 50 % всіх досліджуваних ізолятів мали множинну стійкість до антибіотиків, що найчастіше застосовують у господарствах України.

Ключові слова: *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, антибіотикостійкість, мастити, інфекційні мастити, грампозитивні бактерії.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Мастити у корів – це запальні захворювання молочної залози, які можуть зумовлювати різні мікроорганізми та є однією з найпоширеніших хвороб у великої рогатої худоби. Стрептококи та стафілококи вважаються двома основними збудниками маститів у корів, їх наявність в молоці може призвести до втрати продуктивності у тварин та зниження якості молока, а також становлять загрозу для здоров'я людей, які споживають молочні продукти [1].

Залежно від джерела інфекції мастити можна умовно розділити на інфекційні та санітарні. Інфекційний мастит є результатом проникнення мікроорганізмів у вим'я тварини через діжки під час доїння. Ці мікроорганізми можуть бути присутніми на шкірі вимені тварини, на обладнанні для доїння та у навколишньому середовищі, і проникати до вимені через поранення, мікротріщини або за порушення гігієнічних норм під час доїння [2].

Інфекційний мастит може мати серйозні наслідки, такі як зменшення виробництва

молока, погіршення його якості та збільшення витрат на лікування. Бактерії, що спричиняють мастит, можуть зумовлювати важкі запалення вимені та призвести до переходу захворювання на хронічну стадію. Крім того, мастит може передаватися іншим тваринам під час доїння, що призводить до швидкого поширення захворювання в господарствах, та у зв'язку зі зниженням ефективності антибіотиків, лікування інфекційного маститу може бути складним та дороговартісним [3].

Залежно від типу інфекції, симптоми інфекційного маститу можуть варіюватись. У більшості випадків, уражені ділянки вимені стають набряклими, гарячими та болючими на дотик, можуть бути виділення з діжок із зміненним кольором та запахом, загальна молочна продуктивність може знизитися. Наявність маститу впливає на якість молока, знижуючи вміст жирів і білків та збільшуючи вміст клітковини [4].

Санітарні мастити у корів – це захворювання молочної залози, які виникають внаслідок неправильного догляду за тваринами та нестерильних умов виробництва молока. Однією з основних проблем, пов'язаних із санітарними маститами у корів, є відсутність ефективної профілактики та контролю цього захворювання [5].

Залежно від прояву клінічних симптомів мастити поділяють на субклінічні та клінічні. Субклінічний мастит характеризується відсутністю клінічних ознак захворювання, але збільшенням кількості бактерій в молоці тварини. Це може призвести до зменшення якості молока та збільшення ризику передачі інфекції від тварини до тварини. Клінічний мастит супроводжується ознаками захворювання, такими як збільшення температури тіла тварини, зміни у кольорі та консистенції молока, зниження апетиту та інші. У разі клінічного маститу необхідне негайне лікування тварини [6].

Однією з основних проблем, пов'язаних з інфекційними маститами у корів, є стійкість збудників до антибіотиків. Використання антибіотиків є ключовим аспектом лікування та контролю маститів у тварин, однак деякі збудники маститів можуть набути стійкості до певних класів антибіотиків через надмірне використання цих препаратів [7].

Це може призвести до проблеми антибіотикорезистентності, коли збудники маститів стають стійкими до більшості антибактеріальних речовин та їх ефективність в лікуванні маститів значно зменшується. Це може мати серйозні наслідки для здоров'я тварин та споживачів молочних продуктів, а також для економічної ефективності виробництва молока. На жаль, з роками збільшення використання

антибіотиків у виробництві молока призвело до збільшення ймовірності розвитку стійкості до них у бактеріальних популяціях, що спричиняють мастит [8, 9].

Дослідження стійкості мікроорганізмів до антимікробних засобів в молоці є важливим напрямом у вивченні епідеміології та профілактики маститів у ВРХ. Визначення рівня стійкості мікроорганізмів до антибіотиків дозволяє обрати ефективні терапевтичні схеми та зменшити ризик розвитку стійкості до антимікробних засобів [10, 11].

Отже, питання стійкості до антимікробних засобів є серйозною проблемою в лікуванні та профілактиці маститів у ВРХ. Дослідження, спрямовані на вивчення стійкості мікроорганізмів до антибіотиків, допоможуть у розробці ефективних стратегій лікування та профілактики цієї захворюваності у ВРХ.

Мета дослідження. Вивчити стійкість до антибіотиків ізолятів *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.*, що були виділені з молока від хворих на мастит корів.

Матеріал і методи дослідження. Молоко від хворих корів відбирали під час їх перебування в доїльному залі. Дійки обробляли стерильною серветкою, просякнутою дезінфікуючою речовиною. Пробу з кожної дійки відбирали в окремий стерильний стаканчик та направляли до лабораторії. Субклінічно хворих тварин ідентифікували за допомогою каліфорнійського маститого тесту.

Проби молока культивували на хромогенному середовищі CHROMagar™ Orientation та CHROMagar™ Mastitis протягом 24–48 год за 37 °С. Колонії, що мали характерне забарвлення пересівали на поживний агар для виділення чистої культури. Видову належність колоній визначали згідно з інструкцією до середовищ [13, 14].

Мікроорганізми фарбували за грамом та досліджували за допомогою біохімічних тестів на ферментацію каталазу, оксидазу, коагулазу, САМР-тесту та росту з NaCl в концентрації 4,5 %.

Стійкість до антибіотиків визначали методом дифузії в агар, з використанням Mueller–Hinton agar та CHROMagar™ MH Orientation. На середовищі MuellerHinton agar дослідження проводили з чистою культурою, під час дослідження за допомогою хромогенного середовища використовували культури після первинного посіву.

На поверхню агару засівали 1 мл суспензії культури в розведенні 0,5 за стандартом McFarland, та рівномірно розподіляли за допомогою шпателя. Залишки рідини відібрали. Чашку підсушували і на поверхню викладали

диски, просякнуті розчином антибіотика. Після цього чашку термостатували протягом 24 год за 35 °С [15].

Для дослідження використовували диски: канаміцин 30 мкг, бензилпеніцилін 1 МО, цефокситим 30 мкг, кліндаміцин 2 мкг, тетрациклін 30 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, цефтріаксон 30 мкг.

Ідентифікацію стійкості до антимікробних засобів визначали згідно з EUCAST. Методологія EUCAST не передбачає використання CHROMagar™ MN Orientation для визначення стійкості до антибіотиків.

MAR індекс. Індекс множинної антибіотикорезистентності (MAR) визначали для кожного ізоляту за формулою $MAR = a/b$, де a – кількість антибіотиків, до яких досліджуваний ізолят виявив стійкість; b – загальна кількість антибіотиків, до яких досліджуваний ізолят був оцінений на чутливість. MAR індекс вище 0,2 свідчить про походження ізолятів із середовища, де часто використовують антибактеріальні засоби [16].

Результати досліджень. Досліджено 115 проб молока від 90 корів. Виділено 30 ізолятів *Staphylococcus aureus*, 15 коагулазонегативних *Staphylococcus* (CoNS), 17 *Streptococcus agalactiae*, 15 *Streptococcus disgalactiae* та 4 ізоляти *Streptococcus uberis*. У 45 тварин було виявлено моноінфекцію грампозитивних кокових мікроорганізмів, у 22 тварин – асоціацію 2-х і більше збудників.

Стійкість до антибіотиків. Стійкість хоча б до 1 антибіотика проявили 86,7 % *S. aureus*, зокрема MAR індекс більше 0,2 був у 50,0 %,

для коагулазонегативних *Staphylococcus* (CoNS) ці показники 93,3 та 60,0 %, *Streptococcus agalactiae* – 70,6 та 52,9 %, *Streptococcus disgalactiae* – 66,7 та 40,0 %, *Streptococcus uberis* – 100 та 75 % відповідно. Один ізолят *S. aureus* проявив стійкість до 6-ти антибактеріальних сполук. Два ізоляти *Str. disgalactiae*, та по одному ізоляту *Str. agalactiae* і *Str. uberis* проявили стійкість до 3-х антибактеріальних препаратів (рис. 1).

28 ізолятів *Staphylococcus spp.* виявили стійкість до бензилпеніциліну, тетрацикліну – 13, цефокситину – 12, ципрофлоксацину – 10, кліндаміцину – 9, канаміцину – 8. Серед ізолятів *Streptococcus spp.* було 13 стійких до тетрацикліну, кліндаміцину – 11, бензилпеніциліну – 10, цефтріаксону – 9 (табл.1).

Бактерії *Staphylococcus spp.* найчастіше виявляли стійкість до β-лактамних антибіотиків групи пеніциліни: 66,7 % – до бензилпеніциліну та 33,3 % до цефокситину.

Представники родини *Streptococcus spp.* найчастіше проявляли стійкість до антибіотиків тетрацикліну – 36,1 % та кліндаміцину – 30 %.

Використання хромогенного середовища для вивчення стійкості до антибіотиків допомагає прискорити протокол дослідження на 1 добу. Суспензію готують з первинної змішаної культури, а діаметр зони затримки росту вимірюють для візуально різних колоній по краю зони просвітлення (рис. 2).

За дослідження деяких ізолятів мікроорганізмів в середині зони просвітлення відмічали ріст поодиноких колоній (рис. 3).

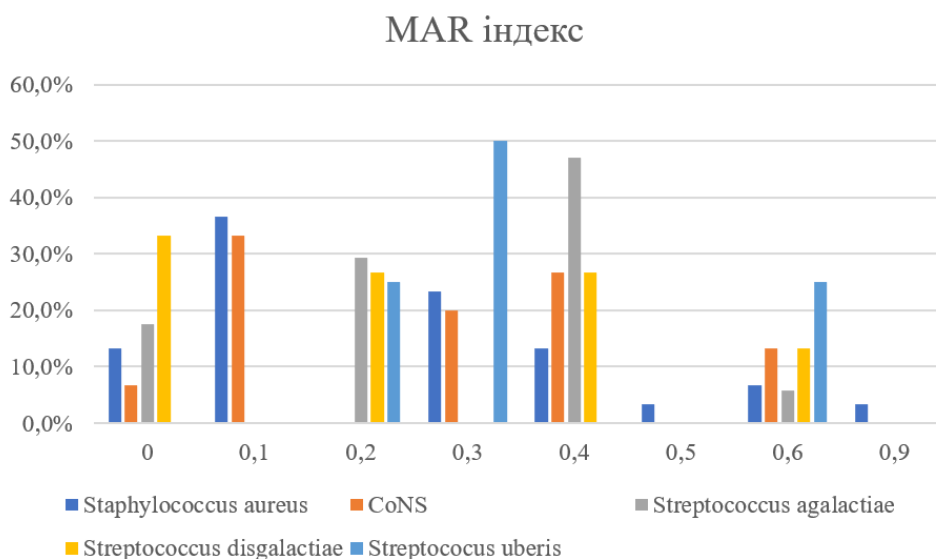


Рис. 1. MAR індекс досліджених ізолятів.

Таблиця 1 – Стійкість бактерій до кожного досліджуваного антибактеріального препарату

	ПЕН	ЦЕФ	КЛІ	ТЕТ	КАН	ЦИП	ЦФТ
<i>S. aureus</i>	60,0 %	23,3 %	20,0 %	23,3 %	16,7 %	20,0 %	–
CoNS	66,7 %	33,3 %	20,0 %	40,0 %	20,0 %	26,7 %	–
<i>Str. agalactiae</i>	29,4 %	–	35,3 %	35,3 %	–	–	29,4 %
<i>Str. disgalactiae</i>	26,7 %	–	20 %	46,7 %	–	–	13,3 %
<i>Str. uberis</i>	25,0 %	–	75 %	25,0 %	–	–	50,0 %

Примітка. ПЕН – Бензилпеніцилін, ЦЕФ – Цефокситин, КЛІ – Кліндаміцин, ТЕТ – Тетрациклін, КАН – Канаміцин, ЦИП – Ципрофлоксацин, ЦФТ – Цефтріаксон

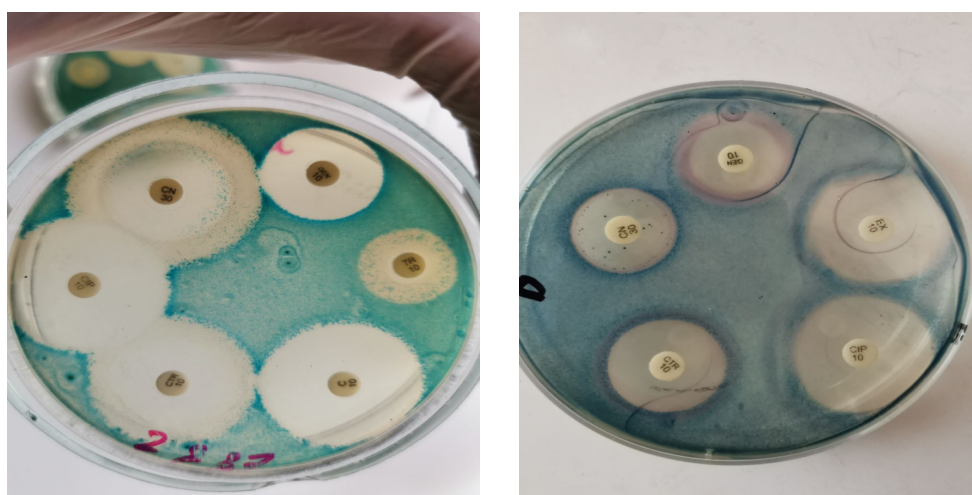


Рис. 2. Тестування стійкості до антибактеріальних агентів за допомогою методу дифузії в агар. 1. Ріст комбінації мікроорганізмів *Streptococcus agalactiae* (бірюзовий колір) та *Staphylococcus aureus* (жовтий колір). 2 Ріст комбінації мікроорганізмів *Streptococcus uberis* та CoNS.

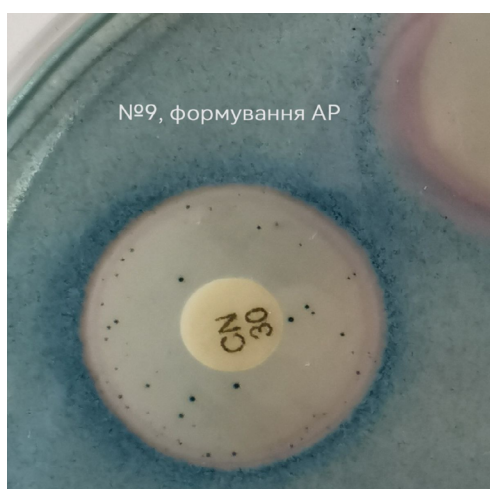


Рис. 3. Формування селекційної стійкості окремих колоній *Streptococcus spp.* до антибіотика класу цефалоспорини 1 покоління – цефалексин.

Обговорення. Використання хромогенних середовищ допомагає спростити та прискорити протокол ідентифікації патогенних мікроорганізмів. Набір CHROMagar™ Mastitis складається з 2-х окремих середовищ, грам-позитивного (ГП+) та грамнегативного агару (ГП-). Агарова пластина ГП+ середовища пригнічує ріст грамнегативної мікрофлори, тимчасом ГП – пригнічує грам-позитивні мікроорганізми. Це середовище має високу чутливість та специфічність, і підходить для культивування збудників, що найчастіше спричиняють мастити у ВРХ [17].

Інструкція CHROMagar™ Orientation не передбачає використання цього середовища для ідентифікації збудників маститу. Проте на поверхні Orientation ростуть всі мікроорганізми, зокрема найпоширеніші збудники маститу мають специфічне забарвлення колоній. Вартість одного дослідження з використанням середовища Orientation менша ніж з використанням Mastitis.

Дослідження стійкості до антибіотиків з використанням CHROMagar™ MH Orientation дає можливість провести тестування стійкості змішаної культури мікроорганізмів. У зв'язку з тим, що колір колоній відрізняється, зона затримки росту для кожного збудника візуально різна. Це зменшує час необхідний для отримання результату в порівнянні з використанням не хромогенного агару.

Виявлені нами *Staphylococcus aureus*, CoNS, *Streptococcus agalactiae* та *Streptococcus dysgalactiae* асоційовані з інфекційним маститом, тимчасом *Streptococcus uberis* – із санітарним [18].

Стійкість до β-лактамних антибіотиків розвивається завдяки ферментам, що розщеплюють діючу речовину антибіотика, або через мобільні генетичні елементи, що змінюють білкові сполуки, які є мішенями дії сполук цього класу (рис. 3). Клавуланова кислота має подібну будову до β-лактамних антибіотиків, у зв'язку з цим частина ферментів, які можуть виробляти бактерії, зв'язується з цією сполукою і не діє безпосередньо на антибактеріальну речовину. Генетична стійкість до цього класу антибіотиків розвивається завдяки хромосомній касеті SCCmec [19, 20].

У процесі дослідження деякі ізоляти формували стійкість до антибактеріальних сполук. В середині зони пригнічення росту утворювалися поодинокі колонії, які були стійкі до досліджуваного антибіотика. Дослідники Flanagan and Steck провели декілька послідовних пересівань поодиноких, стійких колоній. Після декількох пасажів отримані штами були

повністю стійкі до антибіотика, нанесеного на диск [21].

За останні 5 років з'явилося декілька публікацій про дослідження молока від хворих тварин, щодо стійкості грам-позитивних кокових збудників до антибактеріальних засобів.

Дослідження *S. aureus* від корів Ефіопії показало, що всі ізоляти були стійкі до β-лактамних антибіотиків, 48 % виділених мікроорганізмів виявились не чутливими до окситетрацикліну, 38 % – до стрептоміцину і 33 % – до канаміцину [16]. *S. aureus* ізолювані з молока в Бангладеші, також мали високу стійкість до β-лактамних антибіотиків: 50 % всіх ізолятів були стійкі до ципрофлоксацину, 42 % – до амоксициліну, тимчасом стійкість до гентаміцину та еритроміцину була низька – 18 та 8 %, а цефтріаксон діяв на всі ізоляти [22]. Дослідження стафілококів виділених у корів з Непалу, виявило стійкість всіх ізолятів до пеніцилінових антибіотиків. Зокрема стійкість *S. aureus* до гентаміцину становила 27 %, ципрофлоксацину – 20 %, а еритроміцину – 14 %. Для CoNS відзначали стійкість до цих антибіотиків на рівні 24; 42 та 37 % [23]. *Streptococcus dysgalactiae*, виділений від хворих на клінічний мастит корів у Китаї, був стійким до канаміцину у 90 %, стрептоміцину – 58 %, еритроміцину – 48 %, цефалексину – 34 % та цефтріаксону у 14 % випадків [24]. У аналізі молока від румунських корів було визначено високу стійкість ізолятів *S. aureus* до антибіотиків еритроміцину 75 %, тимчасом стійкість до амоксициліну та канаміцину становила 25 та 16 % відповідно. Також в цьому дослідженні виявили, що 100 % ізолятів стрептококів стійкі до канаміцину, 87 % *Str. agalactiae* – до еритроміцину, а 75 % *Str. uberis* – до комбінації амоксициліну та клавуланової кислоти [25]. Річний аналіз збудників, виділених з молока від словацьких корів показав що 44,6 і 36,4 % *S. aureus* та CoNS мали стійкість до стрептоміцину, 13,9 і 10,8 % – до цефалексину. *Str. uberis* та *Str. agalactiae* мали стійкість до стрептоміцину на рівні 70 та 79 %, до цефалексину – 23 та 10 %. *Str. uberis* мав стійкість до амоксициліну та комбінації амоксициліну з клавулановою кислотою на рівні 4 % [26]. У десятирічному аналізі збудників, що були виділені з молока хворих корів у Франції [27], вивчили видовий склад мікрофлори молока ізолюваної від субклінічно хворих тварин, стійкість до еритроміцину мали 13 % *Streptococcus spp.*, 13 % CoPS та 17 % CoNS, до цефалексину – 15; 22 і 9 %, до ципрофлоксацину – 7; 9 та 6 % [28].

Загалом профіль стійкості до антибіотиків відрізнявся в різних дослідженнях. Це може

бути пов'язано з тим, що у господарствах різних країн використовують різні антибіотики. Слід відзначити тенденції стійкості до певних класів антибактеріальних сполук у різних грампозитивних збудників.

Висновок. *Staphylococcus aureus* і CoNS найчастіше були стійкими до бензилпеніциліну – 60 і 66,7 % ізолятів. *Streptococcus agalactiae* проявляли резистентність до кліндаміцину та тетрацикліну – 35,3 % ізолятів. *Streptococcus disgalactiae* проявив найбільшу стійкість до тетрацикліну – 46,7 %, а *Streptococcus uberis* до цефтріаксону – 50 % ізолятів. MAR індекс вище 0,2 мали 75 % *Streptococcus uberis*, 60 % CoNS та 52,9 % *Streptococcus agalactiae*.

Використання хромогенних середовищ допомагає спростити протоколи ідентифікації грампозитивних мікроорганізмів. Використання середовища CHROMagar™ MH Orientation зменшує час, необхідний для визначення стійкості до антибіотиків, оскільки не потребує отримання чистої культури.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Majumder S., Jung D., Ronholm J., George S. Prevalence and mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from mastitic dairy cattle in Canada, *BMC Microbiol.* 2021. Vol. 21. no. 1. 222 p. DOI:10.1186/s12866-021-02280-5.
2. Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea / S.-J. Kim et al. *J. Dairy Sci.* 2019. Vol. 102. no. 12. P. 11439–11448. DOI:10.3168/jds.2019-17028.
3. Persson Y., J. Nyman A.-K., Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden, *Acta Vet. Scand.* 2011. Vol. 53. no. 1. 36 p. DOI:10.1186/1751-0147-53-36.
4. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms / V. Saini et al. *J. Dairy Sci.* 2012. Vol. 95. no. 4. P. 1921–1929. DOI:10.3168/jds.2011-5065.
5. The Two-Track Investigation of Fibronectin Binding Protein A of *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis as a Potential Candidate for Immunodiagnosis: A Pilot Study/ A. Dobrut et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. no. 7. 6569 p. DOI:10.3390/ijms24076569.
6. Invited review: Selective treatment of clinical mastitis in dairy cattle / E. De Jong et al. *J. Dairy Sci.* 2023. DOI:10.3168/jds.2022-22826.
7. Krömker V., Leimbach S. Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows, *Reprod. Domest. Anim.* 2017. Vol. 52. P. 21–29. DOI:10.1111/rda.13032.
8. McDougall S., Hussein H., Petrovski K. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis, *N. Z. Vet. J.* 2014. Vol. 62. no. 2. P. 68–76. DOI:10.1080/00480169.2013.843135.
9. Oliver S.P., Murinda S.E. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2012. Vol. 28. no. 2. P. 165–185. DOI:10.1016/j.cvfa.2012.03.005.
10. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows / B. Bengtsson et al. *Vet. Microbiol.* Vol. 136. no. 1–2. 2009. P. 142–149. DOI:10.1016/j.vetmic.2008.10.024.
11. Чемеровська І.О., Рубленко І.О. Проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів в Україні та світі. *Науковий вісник ветеринарної медицини.* 2022. № 2. С. 33–41. DOI:10.33245/2310-4902-2022-176-2-33-41
12. Sandhu R., Dahiya S., Sayal P. Evaluation of multiple antibiotic resistance (MAR) index and Doxycycline susceptibility of *Acinetobacter* species among inpatients, *Indian J. Microbiol. Res.* 2016. Vol. 3. no. 3. 299 p. DOI:10.5958/2394-5478.2016.00064.9.
13. EUCAST Disk Diffusion Test Methodology. URL: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology (Date of application 15.05.2023)
14. CHROMagar™ Orientation Instructions for Use. URL: <https://www.chromagar.com/product/chromagar-orientation/> (Date of application 15.05.2023)
15. CHROMagar™ MH Orientation Instructions for Use. URL: <https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-mh-orientation/> (Date of application 15.05.2023)
16. Granja B.M., Fidelis C.E., Garcia B.L.N., dos Santos M.V. Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 2021. Vol. 104. no. 8. P. 9115–9129. DOI:10.3168/jds.2020-19513.
17. Cobirka M., Tancin V., Slama P. Epidemiology and Classification of Mastitis, *Animals.* 2020. Vol. 10. no. 12. 2212 p. DOI:10.3390/ani10122212.
18. Гаркавенко Т.О., Козицька Т.Г. Механізм резистентності та методи виявлення метицилінрезистентного стафілокока (MRSA) (оглядова стаття). *Ветеринарна Біотехнологія.* 2016. Т. 28. С. 42–54.
19. Isolation and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Milk in Shire Dairy Farms, Tigray, Ethiopia / W. Girmay et al. *Vet. Med. Int.* 2020. Vol. 2020. P. 1–7. DOI:10.1155/2020/8833973.
20. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів: механізми розвитку й шляхи запобігання / М.В. Бондар та ін. *Медицина невідкладних станів.* 2022. № (3.74). С. 11–17. DOI:10.22141/2224-0586.3.74.2016.76136.
21. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh/ M.N. Hoque et al. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018. Vol. 6. no. 1. P. 53–60. DOI:10.1016/j.ijvsm.2018.03.008.
22. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and pattern of antimicrobial resistance

in mastitis milk of cattle in Chitwan, Nepal / A. Shrestha et al. BMC Vet. Res. 2021. Vol. 17. no. 1. 239 p. DOI:10.1186/s12917-021-02942-6.

23. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China / S. Zhang et al. J. Dairy Sci. 2018. Vol. 101. no. 4. P. 3344–3355. DOI:10.3168/jds.2017-14031.

24. Pascu C., Herman V., Iancu I., Costinar L. Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania, Antibiotics. 2022. Vol. 11. no. 1. 57 p. DOI:10.3390/antibiotics11010057.

25. Holko I., Tančin V., Vrškova M., Tvarožková K. Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. J. Dairy Res. 2019. Vol. 86. no. 4. P. 436–439. DOI:10.1017/S0022029919000694.

26. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France 2006–2016 / C. Boireau et al. J. Dairy Sci. 2018. Vol. 101. no. 10. P. 9451–9462. DOI:10.3168/jds.2018-14835.

27. Identification and antimicrobial susceptibility of milk pathogen isolated from dairy production systems, Prev. / S. Kuhnen et al. Vet. Med. 2021. Vol. 194. 105451 p. DOI:10.1016/j.prevetmed.2021.105451.

REFERENCES

1. Majumder, S., Jung, D., Ronholm, J., George, S. (2021). Prevalence and mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from mastitic dairy cattle in Canada. BMC Microbiol., Vol. 21, no. 1, 222 p. DOI:10.1186/s12866-021-02280-5.

2. Kim, S.-J., Moon, D.C., Park, S.-C., Kang, H.Y., Na, S.H., Lim, S.-K. (2019). Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea. J. Dairy Sci., Vol. 102, no. 12, pp. 11439–11448. DOI:10.3168/jds.2019-17028.

3. Persson, Y., J. Nyman, A.-K., Grönlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Vet. Scand., Vol. 53, no. 1, 36 p. DOI:10.1186/1751-0147-53-36.

4. Saini, V., McClure, J.T., Scholl, D.T., DeVries, T.J., Barkema, H.W. (2012). Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. J. Dairy Sci., Vol. 95, no. 4, pp. 1921–1929. DOI:10.3168/jds.2011-5065.

5. Dobrut, A. (2023). The Two-Track Investigation of Fibronectin Binding Protein A of *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis as a Potential Candidate for Immunodiagnosis: A Pilot Study. Int. J. Mol. Sci., Vol. 24, no. 7, 6569 p. DOI: 10.3390/ijms24076569.

6. De Jong, E. (2023). Invited review: Selective treatment of clinical mastitis in dairy cattle. J. Dairy Sci. DOI:10.3168/jds.2022-22826.

7. Krömker, V., Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows, Reprod. Domest. Anim., Vol. 52, pp. 21–29. DOI:10.1111/rda.13032.

8. McDougall, S., Hussein, H., Petrovski, K. (2014). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis, N. Z. Vet. J., Vol. 62, no. 2, pp. 68–76. DOI:10.1080/00480169.2013.843135.

9. Oliver, S.P., Murinda, S.E. (2012). Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., Vol. 28, no. 2, pp. 165–185. DOI:10.1016/j.cvfa.2012.03.005.

10. Bengtsson, B., Unnerstad, H.E., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., Waller, K.P. (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. Vet. Microbiol., Vol. 136, no. 1–2, pp. 142–149. DOI:10.1016/j.vetmic.2008.10.024.

11. Chemerovska, I.O., Rublenko, I.O. (2022). Problema antybiotykorezystentnosti mikroorhanizmiv v Ukraini ta sviti [The problem of antibiotic resistance of microorganisms in Ukraine and the world]. Naukovyi Visnyk Veterynarnoi Medytsyny [Scientific Bulletin of Veterinary Medicine]. no. 2, pp. 33–41. DOI:10.33245/2310-4902-2022-176-2-33-41

12. Sandhu, R., Dahiya, S., Sayal, P. (2016). Evaluation of multiple antibiotic resistance (MAR) index and Doxycycline susceptibility of *Acinetobacter* species among inpatients, Indian. J. Microbiol. Res., Vol. 3, no. 3, 299 p. DOI:10.5958/2394-5478.2016.00064.9.

13. EUCAST Disk Diffusion Test Methodology. Available at: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology [15.05.2023]

14. CHROMagar™ Orientation Instructions for Use. Available at: <https://www.chromagar.com/product/chromagar-orientation/> [15.05.2023]

15. CHROMagar™ MH Orientation Instructions for Use. Accessible at: <https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-mh-orientation/> [15.05.2023]

16. Granja, B.M., Fidelis, C.E., Garcia, B.L.N., dos Santos, M.V. (2021). Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. J. Dairy Sci., Vol. 104, no. 8, pp. 9115–9129. DOI:10.3168/jds.2020-19513.

17. Cobirka, M., Tancin, V., Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. Animals, Vol. 10, no. 12, 2212 p. DOI:10.3390/ani10122212.

18. Harkavenko, T.O., Kozytska, T.H. (2016). Mekhanizm rezystentnosti ta metody vyavleniia metytsylinrezestentnoho stafilokoka (MRSA) (Ohliadova stattia) [Mechanism of resistance and methods of detection of methicillin-resistant staphylococcus (MRSA) (review article)]. Veterynarna Biotekhnolohiia [Veterinary Biotechnology], Vol. 28, pp. 42–54.

19. Girmay, W. (2020). Isolation and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Milk in Shire Dairy Farms, Tigray, Ethiopia. Vet. Med. Int., Vol. 2020, pp. 1–7. DOI:10.1155/2020/8833973.

20. Bondar, M.V., Pylypenko, M.M., Svintukovskiy, M.Yu., Kharchenko, L.A., Prevysla, O.M., Tsyvk, I.M. (2022). Antybiotykorezystentnist' mikro-

organizmiv: mehanizmy rozvytku j shljahy zapobigannya [Antibiotic Resistance: Mechanisms of Development and Ways to Prevent]. Medycyna nevidkladnyh staniv [Emergency medicine]. no. (3.74), pp. 11–17. DOI:10.22141/2224-0586.3.74.2016.76136.

21. Hoque, M.N., Das, Z.C., Rahman, A.N.M.A., Haider, M.G., Islam, M.A. (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh, *Int. J. Vet. Sci. Med.*, Vol. 6, no. 1, pp. 53–60. DOI:10.1016/j.ijvsm.2018.03.008.

22. Shrestha, A., Bhattarai, R.K., Luitel, H., Karki, S., Basnet, H.B. (2021). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and pattern of antimicrobial resistance in mastitis milk of cattle in Chitwan, Nepal. *BMC Vet. Res.*, Vol. 17, no. 1, 239 p. DOI:10.1186/s12917-021-02942-6.

23. Zhang, S. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. *J. Dairy Sci.*, Vol. 101, no. 4, pp. 3344–3355. DOI:10.3168/jds.2017-14031.

24. Pascu, C., Herman, V., Iancu, I., Costinar, L. (2022). Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania. *Antibiotics*, Vol. 11, no. 1, 57 p. DOI:10.3390/antibiotics11010057.

25. Holko, I., Tančin, V., Vrškova, M., Tvarožková, K. (2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. *J. Dairy Res.*, Vol. 86, no. 4, pp. 436–439. DOI:10.1017/S0022029919000694.

26. Boireau, C. (2018). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France 2006–2016. *J. Dairy Sci.*, Vol. 101, no. 10, pp. 9451–9462. DOI:10.3168/jds.2018-14835.

27. Kuhnen, S. (2021). Identification and antimicrobial susceptibility of milk pathogen isolated from dairy production systems. *Prev. Vet. Med.*, Vol. 194. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105451.

Antibiotic resistance of isolates of *Staphylococcus spp.* and *Streptococcus spp.* causing mastitis on dairy farms in Ukraine

Shevchenko M., Andriichuk A.

Mastitis is the most common pathology of cows that causes large economic losses to dairy farms. Mastitis is often caused by a group of infectious associated pathogens that can be transmitted among animals. Most often, the pathological process in subclinically and clinically sick animals is caused by coccal gram-positive microflora. A major problem is the mechanisms by which microorganisms acquire resistance to one or more antibacterial agents. Thus, standard treatment regimens used on the farm become ineffective. The publication presents the results of the study of antibiotic resistance of 45 isolates of *Staphylococcus spp.* and 22 isolates of *Streptococcus spp.* In this study, the chromogenic media CHROMagar™ Mastitis, CHROMagar™ Orientation and CHROMagar™ MH Orientation were used, which helped to speed up the isolation and identification of cultures. Phenotypic antibiotic resistance profiles were determined using the agar diffusion method. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) showed a high level of resistance to beta-lactams of the penicillin class of benzylpenicillin – 60% and 66.7%. *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus agalactiae* showed high resistance to tetracycline – 46.7% and 35.3%. At the same time, *Streptococcus agalactiae* had a high resistance to clindamycin of 35.3%. *Streptococcus dysgalactiae* to benzylpenicillin – 29.4%, *Streptococcus uberis* to clindamycin – 75%. The lowest resistance was observed to the antibiotic vancomycin in 6.7% of isolated staphylococci and 13.3% of streptococci. MAR index of more than 0.2 was observed in 75% of *Streptococcus uberis*, 60% of CoNS and 52.9% of *Streptococcus agalactiae*. More than 50% of all studied isolates had multiple resistance to antibiotics most commonly used on Ukrainian farms.

Key words: *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, antibiotic resistance, mastitis, infectious mastitis, gram-positive bacteria.



Copyright: Шевченко М.В., Андрійчук А.В. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ORCID iD:

Шевченко М.В.

Андрійчук А.В.

<https://orcid.org/0000-0002-7002-1494>

<https://orcid.org/0000-0001-9144-5272>

