

Туяхов М. Ф.

УДК: 636.7:636.09: 579.6

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ДЕЯКИХ МІКРОБНИХ ІЗОЛЯТІВ ЗА ОТИТУ У СОБАК

М. Ф. ТУЯХОВ, лікар ветеринарної медицини, здобувач

E-mail: vetmeddpss@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України[https://doi.org/10.31548/dopovidi4\(104\).2023.009](https://doi.org/10.31548/dopovidi4(104).2023.009)

Анотація. У статті наведені результати вивчення чутливості деяких ізолятів мікрофлори шкіри собак до антибіотиків за отиту.

Дослідження чутливості ізолятів *Malassezia pachydermatis* на щільних середовищах за отиту у собак показало, що позаконазол виявився найбільш ефективним інгібітором росту *Malassezia*, про що свідчать отримані значення MIK_{50} і MIK_{90} .

Визначення чутливості до антибіотиків представників роду *Pseudomonas* показало, що найбільш виразне пригнічення росту мікроорганізмів даної групи спостерігалось під дією таких антибіотиків: тобраміцин, цефтазидим, марбофлоксацин. Високочутливими представники даної групи мікроорганізмів виявилися і до препарату з групи пеніцилінів – тікарциліну, фторхінолонів норфлоксацину та офлоксацину та аміноглікозидів амікацину і гентаміцину.

Ключові слова: собаки, мікробіологічні дослідження, живильні середовища, мікрофлора шкіри, мікробні ізоляти, отит, стафілококи

Зовнішній отит – запальне захворювання зовнішнього слухового проходу, в тому числі вушної раковини. Зовнішній отит може бути гострим і хронічним (персистуючий або рецидивуючий отит, що триває три місяці і довше) . Зміни, які відбуваються у зовнішньому слуховому проході у відповідь на хронічне запалення, можуть включати гіперплазію залоз, розширення залоз, гіперплазію епітелію та гіперкератоз. Ці зміни зазвичай призводять до збільшення продукції сірки у зовнішньому слуховому каналі, що сприяє підвищенню локальної вологості та рН зовнішнього слухового проходу, таким чином сприяючи

розвитку вторинної інфекції (Scott DW, Miller WH, 2005).

Бактерії, які найчастіше виділяють із вушних проходів собак, уражених отитом – це *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* і *Corynebacterium* (Hnilica K.A., 2011). Деякі бактерії, такі як *Staphylococcus* і *Pseudomonas*, можуть утворювати біоплівку, що може призвести до персистенції інфекції, незважаючи на адекватну терапію. Дріжджі *Malassezia* є ще одним поширеним компонентом зовнішнього отиту у собак. У деяких собак можливий розвиток алергійної реакції на *Malassezia* spp., що призводить до значного дискомфорту

Туяхов М. Ф.

та свербіж (Paterson S., Matyskiewicz W., 2018).

Зважаючи на значну розповсюдженість отитів, що поряд з піодермією складають основну частку серед інфекцій шкіри собак, а також прояви антибіотикорезистентності, проблема вивчення чутливості мікрофлори вуха до антибіотиків залишається актуальним напрямком досліджень.

Мета даного дослідження полягала у вивченні чутливості ізолятів *Ps. aeruginosa* зі шкіри собак із діагнозом бактеріальний отит до антибіотиків та ізолятів *Malassezia pachydermatis* до протигрибкових препаратів з метою розробки ефективних схем комбінованої терапії у собак за отитів бактеріальної чи змішаної етіології.

Матеріали і методи. У рамках дослідження було обстежено 30 собак віком від до 10 років, обох статевих груп. За період з жовтня 2020 року по січень 2021 було досліджено 30 собак різних порід, обох статевих груп, із симптомами отиту. Дослідження проводили на базі ветеринарних клінік Київської області «Здоров'я тварин» та «V елемент», на базі кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України.

Для дослідження відбирали собак з діагнозом «клінічний зовнішній отит», у тварин реєстрували такі клінічні ознаки, як трясіння головою, почервоніння шкіри зовнішнього вушного каналу, набряк, проліферативні зміни шкіри, і/або

наявність ексудату у вушному каналі. У дослідження не включали тварин, яким впродовж попередніх 5 днів застосовували кортикостероїди короткотривалої дії, антибіотики і/або протигрибкові препарати, системні кортикостероїди пролонгованої дії протягом попередніх 4 тижнів, або системні протимікробні чи протигрибкові препарати протягом попереднього тижня.

Після реєстрації тварини, ретельного збору анамнезу життя та хвороби, проводили загальноклінічне дослідження, а також мікробіологічні, біохімічні, цитологічні, рентгенологічні, за потреби – паразитологічні, гематологічні і біохімічні дослідження крові, УЗД тощо.

Діагноз «зовнішній отит» ставили на підставі вивченого симптомокомплексу та результатів досліджень.

Відбір проб для досліджень проводили за допомогою стерильного тампону – з уражених ділянок шкіри відбирали ексудат у спеціальні мікробіологічні транспортні контейнери із середовищем КЕРІ-Блейр 4012872 та середовищем Еймса.

За потребою проводили аспірацію ексудату у стерильні шприци. Десквамований епітелій у вигляді кірочок і лусочок, волосся відбирали у стерильні сухі культуральні пробірки та чашки Петрі одноразового застосування.

Виготовлення мазків-відбитків із ексудату і зіскоби шкіри проводили за

Туяхов М. Ф.

стандартною методикою. Фарбували мазки за Грамом та за методом Романовського-Гімза, досліджували з використанням імерсійної системи світлового мікроскопу Vetscan HD Microscope.

Висіви проводили в стерильних умовах на тверді та рідкі живильні середовища: МПА, кров'яний МПА, МПБ, МПЖ, агар Ендо і агар Сабуро у стерильні пластикові чашки Петрі та культуральні пробірки. Крім того, застосовували селективні середовища (кров'яний МПА із 8-10 % хлористого натрію і 3,5 % МПА із кристалічним фіолетовим). Культивування проводили за різних температурних режимів (25-37°C) у термостаті. Виділення чистих культур проводили на МПА за методом Дригальського та шляхом штрихового посіву. Культури проглядали через із періодичністю 12-24 годин. При появі колоній виготовляли мазки, які фарбували вказаними вище методами (Korbelik J., Singh A., 2019).

Результати власних досліджень.

Як показали результати досліджень, серед Грам-негативних мікроорганізмів частка *Pseudomonas aeruginosa* складала 16,7 %. При перегляді мазків *Pseudomonas aeruginosa* (синьогнійні палички) розташовувалися поодинокі чи короткими ланцюжками. На МПА збудник утворював невеликі плоскі колонії. Середовище згодом набувало синьо-зеленого забарвлення, внаслідок продукції піоціаніну. На МПА і середовищі Ендо спостерігалось

утворення слизистих або точкових плоских колоній неправильної форми. Ізольовані мікроорганізми виявляли каталазну активність, здатність до розрідження желатини, на кров'яному МПА зумовлювали виразний β -гемоліз.

Серед представників дріжджових грибів найчастіше виділяли *Malassezia pachydermatis* – 9 випадків (18,8 %). На середовищі Сабуро ріст випуклих гладеньких кремового кольору колоній спостерігався на 5-7 добу культивування при 30°C. Починаючи з 10 – 12 доби культивування спостерігалось їх ослизнення, поява колоній жовтувато-оранжевого кольору, вростання у середовище. При мікроскопічному дослідженні зіскобів шкіри відзначалась наявність дріжджоподібних клітин, а у матеріалі із колоній - дріжджоподібні клітини еліпсоїдної форми.

Представники *Candida albicans* були виділені лише у 1 випадку (2,1 %). У мазках з ексудату, знаходили клітини овальної форми, елементи псевдоміцелію. На середовищі Сабуро при 30° С вони формували на 4-6 добу сірувато-кремові колонії з злегка шорохуватою поверхнею. При мікроскопії препаратів з колоній відзначали присутність септованих фрагментів міцелію.

Отримані на 5-7-у добу на агарі Сабуро культури мали гладеньку поверхню, були випуклими, ламкими. При фарбуванні за Грамом у мазку

Туяхов М. Ф.

виявляли численні еліпсоїдні Грам-позитивні дріжджові клітини.

У результаті визначення МІК *Malassezia pachydermatis*, при висіві

матеріалу на агар Сабуро і інкубуванні при 32°C, встановлено, що позаконазол виявився найбільш ефективним інгібітором росту *Malassezia* (табл.1).

1. Показники МІК₅₀ (мкг/мл) деяких протигрибкових засобів щодо *Malassezia pachydermatis* на щільних середовищах за отиту у собак

	Ністатин	Позаконазол	Міконазол	Клотримазол
Кількість досліджених ізолятів	62	62	62	62
МІК ₅₀ (мкг/мл)	> 32	0,25	8	16
МІК ₉₀ (мкг/мл)	> 32	1	16	32

Як видно з таблиці 1, показники МІК₅₀ і МІК₉₀ позаконазолу були суттєво ($p < 0,001$) нижчими за аналогічні показники ністатину, міконазолу та клотримазолу, що свідчить про надзвичайно високу активність позаконазолу *in vitro* щодо *Malassezia pachydermatis*.

У результаті визначення МІК *Malassezia pachydermatis*, при висіві матеріалу на агар Сабуро і інкубуванні при 32°C, встановлено, що позаконазол виявився найбільш ефективним інгібітором росту *Malassezia*, про що свідчать отримані значення МІК₅₀ і МІК₉₀.

Визначення чутливості до антибіотиків представників роду *Pseudomonas* показало, що найбільш виразне пригнічення росту мікроорганізмів даної групи спостерігалось під дією таких антибіотиків: *тобраміцин* – зона пригнічення складала $34,7 \pm 3,16$ мм, *цефтазидим* – $33,6 \pm 2,67$ мм, *марбофлоксацин* – $32,3 \pm 1,29$ мм (табл.

2). Високочутливими представники даної групи мікроорганізмів виявилися і до препарату з групи пеніцилінів – *тікарциліну*, фторхінолонів *норфлоксацину* та *офлоксацину* та аміноглікозидів *амікацину* і *гентаміцину*; зони пригнічення росту відповідно становили $29,0 \pm 3,94$; $26,3 \pm 3,11$; $26,3 \pm 4,52$; $28,5 \pm 2,15$ і $28,1 \pm 2,31$.

Антибіотики стрептоміцин, цефотаксим, ампіцилін та цефуросим не впливали на ріст збудника.

Серед досліджених ізолятів до тобраміцину високочутливими і чутливими виявилися 100 %, до марбофлоксацину 97,3 %, а до цефтазидиму – 95,3 % (табл. 2.).

До норфлоксацину, амікацину і гентаміцину виявилися високочутливими і чутливими 91,5-92,8 % ізолятів. Офлоксацин також виявився активним щодо пригнічення росту *Ps. aeruginosa* – 93,5 % ізолятів були чутливими. Тікарцилін та гентаміцин, які можуть

Тухов М. Ф.

застосовуватися для лікування піодермій у собак, також показали високу ефективність (чутливими виявилися 86,0 та 73,2 % відповідно).

Менш ефективними були іміпенем, меропенем та енрофлоксацин (62,1-71,5 %).

2. Чутливість ізолятів *Ps. aeruginosa* до антибіотиків

Антибіотик	Діаметр зони затримки росту, мм M ± m, n = 20
Тобраміцин	34,7 ± 3,16
Цефтазидим	33,6 ± 2,67
Марбофлоксацин	32,3 ± 1,29
Тікарцилін	29,3 ± 3,11
Офлоксацин	29,0 ± 3,94
Амікацин	28,5 ± 2,15
Гентаміцин	28,1 ± 2,31
Норфлоксацин	26,3 ± 4,52
Іміпенем	24,4 ± 1,07
Меропенем	21,4 ± 2,15
Карбенціцилін	19,8 ± 3,45
Цефтриаксон	19,0 ± 3,10
Цефоперазон	13,2 ± 3,12
Енрофлоксацин	15,8 ± 1,12
Стрептоміцин	13 ± 4,73
Цефотаксим	11,7 ± 2,55
Ампіцилін	11,7 ± 2,07
Цефуросим	-
Триметоприм+сульфаметоксазол	-

До норфлоксацину, амікацину і гентаміцину виявилися високочутливими і чутливими 91,5-92,8 % ізолятів. Офлоксацин також виявився активним щодо пригнічення росту *Ps. aeruginosa* – 93,5 % ізолятів були чутливими. Тікарцилін та гентаміцин, які часто застосовуються для лікування піодермій у собак, також показали високу ефективність (чутливими виявилися 86,0 та 73,2 % відповідно). Дещо менш ефективними були іміпенем, меропенем та енрофлоксацин (62,1-71,5 %).

Висновки

Дослідження чутливості ізолятів *Malassezia pachydermatis* на щільних

середовищах за отиту у собак у собак показало, що позаконазол виявився найбільш ефективним інгібітором росту *Malassezia*, про що свідчать отримані значення MIK_{50} і MIK_{90} , що збігається із рядом подібних повідомлень (Chen T, Hill PV., 2005).

Визначення чутливості до антибіотиків представників роду *Pseudomonas* показало, що найбільш виразне пригнічення росту мікроорганізмів даної групи спостерігалось під дією таких антибіотиків: тобраміцин, цефтазидим, марбофлоксацин (табл. 2).

Високочутливими представники даної групи мікроорганізмів виявилися і

Тухов М. Ф.

до препарату з групи пеніцилінів – тікарциліну, фторхінолонів норфлуксацину та офлуксацину та аміноглікозидів амікацину і гентаміцину.

Перспективи досліджень.

Подальше вивчення чутливості

References

1. Angus JC. (2004). Otic cytology in health and disease. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 34: 411-24.

2. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. (2001). External ear diseases. In: *Small Animal Dermatology*, 6th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1203-35.

3. Paterson S, Matyskiewicz W. (2018). A study to evaluate the primary causes associated with *Pseudomonas* otitis in 60 dogs. *J Small Anim Pract.* 59(4):238-242.

4. Chen T, Hill PB. (2005). The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol.* 16(1):4-26.

5. Borriello G, Paradiso R, Catozzi C, et al. (2020). Cerumen microbial community shifts between healthy and otitis affected dogs. *PLoS ONE.* 15(11):e0241447.

6. Tsuprun, V., Cureoglu, S., Schachern, P. A., Ferrieri, P., Briles, D. E., Paparella, M. M., & Juhn, S. K. (2008). Role of pneumococcal proteins in sensorineural hearing loss due to otitis media. *Otology & Neurotology*, 29(8), 1056-1060.

7. Buckley, L. M., McEwan, N. A., & Nuttall, T. (2013). Tris-EDTA significantly

мікробних ізолятів шкіри до антибіотиків, зокрема збудників групи коків, з подальшим удосконаленням антибіотикотерапії тварин, хворих на отити, особливо за наявності асоціацій збудників бактерійної та грибкової природи.

enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Veterinary Dermatology*, 24(5), 519-e122.

8. Glaze, M. (2013). Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. *Muller and Kirk's Small animal dermatology*, 741-773.

9. Swales N, Foster A, Barnard N. (2018). Retrospective study of the presentation, diagnosis and management of 16 cats with otitis media not due to nasopharyngeal polyp. *J Feline Med Surg.* 20(12):1082-1086.

10. Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS. (2019). Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Vet Dermatol.* 30(3):228-e70.

11. Hnilica KA. (2011). *Otitis Externa Small Animal Dermatology: A Color Atlas and Therapeutic Guide*. 3rd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; pp. 395-398.

12. Boyd M, Santoro D, Gram D. (2019). In vitro antimicrobial activity of topical otological antimicrobials and Tris-EDTA against resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs. *Vet Dermatol.* 30(2):139-e40.

INVESTIGATION OF THE SENSITIVITY OF SOME MICROBIAL ISOLATES IN DOGS WITH OTITIS

M. F. Tuyakhov

Abstract. *Introduction.* The article presents the results of the study of antimicrobial sensitivity of some isolates of the skin microflora of dogs with otitis.

Methods. Methods of investigation included isolation of microbial and fungal cultures, investigation of microbiological and biochemical features of isolates and investigation of their sensitivity to antimicrobials and antifungals.

Results. A study of the sensitivity of *Malassezia pachydermatis* isolates on dense nutrient media showed that posaconazole was the most effective inhibitor of *Malassezia* growth, as evidenced by the obtained MIC₅₀ and MIC₉₀ values.

Туяхов М. Ф.

Determination of sensitivity to antibiotics of representatives of the genus Pseudomonas showed that the most pronounced inhibition of the growth of microorganisms of this group was observed under the action of the following antibiotics: tobramycin, ceftazidime, marbofloxacin.

Representatives of this group of microorganisms were also highly sensitive to penicillin group - ticarcillin, fluoroquinolones norfloxacin and ofloxacin, either to aminoglycosides amikacin or gentamicin.

Discussion. Prospects of research are that further study of the sensitivity of microbial isolates of the skin to antibiotics, in particular causative agents of the cocci group, with further improvement of antibiotic therapy of animals suffering from otitis, especially in the presence of associations of causative agents of bacterial and fungal etiology.

Key words: *dogs, microbiological research, nutrient media, skin microflora, microbial isolates, otitis, staphylococci, pseudomonas, malassezia*