

**Ветеринарная микробиология**

УДК 636.2:619:579.62:57.083.1

doi: 10.15389/agrobiology.2021.2.304rus

**ВЫЯВЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ВОЗБУДИТЕЛЯ ГИСТОФИЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *Histophilus somni***С.П. ЯЦЕНТЮК<sup>1</sup> ✉, Ю.И. ПОБОЛЕЛОВА<sup>1</sup>, Д.А. РУДНЯЕВ<sup>1</sup>,  
А.И. ЛАИШЕВЦЕВ<sup>2</sup>, А.В. КАПУСТИН<sup>2</sup>

Микроорганизм *Histophilus somni* (сем. *Pasteurellaceae*) часто встречается у крупного рогатого скота (КРС), осложняет течение респираторных вирусных заболеваний и может вызывать мультисистемное заболевание, известное как гистофилез. Для лечения заболеваний, вызванных микроорганизмами семейства *Pasteurellaceae*, наиболее часто применяются аминогликозиды, сульфаниламиды, бета-лактамы, тетрациклины и макролиды, в связи с чем можно ожидать формирование устойчивости *H. somni* к препаратам этих групп. В настоящей работе впервые охарактеризована устойчивость к антимикробным препаратам изолятов *H. somni*, выделенных от КРС на территории Российской Федерации. Впервые установлена циркуляция резистентных штаммов *H. somni* в российских животноводческих хозяйствах. Нашей целью было изучение антибиотикорезистентности циркулирующих штаммов *Histophilus somni* с помощью фенотипических и генотипических методов и оценка возможности использования ПЦР для прогнозирования устойчивости *H. somni* к антимикробным средствам нескольких групп. Молекулярно-генетическое определение антибиотикорезистентности проводилось на основе идентификации генов *blaOXA-2*, *sul2*, *strA*, *strB*, *aadA25*, *aphA1*, *tetH*. В работе использовали культуры *H. somni*, выделенные в 2018-2019 годах из биологического материала (паренхиматозные органы, смывы, сперма) крупного рогатого скота разных пород, возрастных, половых и физиологических групп (всего 145 животных). Чувствительность изолятов *H. somni* к 13 антибактериальным препаратам, относящимся к 4 классам (аминогликозидам, бета-лактамам, тетрациклинам и сульфаниламидам), тестировали диско-диффузионным методом. ДНК выделяли из культур *H. somni* и использовали для выявления генетических детерминант устойчивости к антибиотикам. Изоляты *H. somni* были протестированы на наличие семи генов устойчивости к антибиотикам (*tetH*, *blaOXA-2*, *aadA25*, *strA*, *strB*, *aphA1*, *sul2*) методом ПЦР с электрофоретической детекцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Всего были выделены и идентифицированы 18 изолятов *H. somni*, при этом вырастить в достаточном количестве и оценить на чувствительность к антибиотикам удалось лишь 12 образцов. Наибольшую фенотипическую устойчивость выявили к аминогликозидам: резистентность к стрептомицину составляла 50 %, а устойчивость к неомицину превышала 40 %. У устойчивых образцов были обнаружены гены резистентности *aadA25*, *strA*, *strB* и *aphA1*. Резистентность к сульфаниламидам также оказалась велика и была выявлена у 33 % образцов, в каждом из которых методом ПЦР идентифицировали ген устойчивости *sul2*. По результатам микробиологического исследования чувствительность к пенициллинам составила 75 %, к цефалоспорином приближалась к 100 %. Чувствительность к препаратам группы тетрациклинов оказалась выше 80 %. При этом гены устойчивости к тетрациклинам (*tetH*) и пенициллинам (*blaOXA-2*) обнаружены не были. По-видимому, устойчивость образцов была обусловлена другими механизмами резистентности. Мультирезистентными оказались два изолята *H. somni*: они проявляли устойчивость к препаратам классов аминогликозидов, бета-лактамов и тетрациклинов. Четыре образца показали устойчивость к препаратам сразу двух различных групп антибиотиков: два образца — к аминогликозидам и сульфаниламидам (в них были идентифицированы гены *strA*, *strB*, *aadA25*, *aphA1* и *sul2*), два образца — к аминогликозидам и бета-лактамам (у них обнаружили только гены устойчивости к аминогликозидам *aadA25* и *strA*). За исключением образцов, устойчивых к тетрациклинам и пенициллинам, в которых не были выявлены ожидаемые генетические детерминанты резистентности, все наблюдаемые фенотипы устойчивости к противомикробным препаратам соответствовали результатам ПЦР-исследования. Сочетание генотипического и фенотипического методов определения антибиотикорезистентности способствует лучшему пониманию механизмов устойчивости бактерий к антимикробным препаратам, а также позволяет повысить эффективность мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов, выделяемых от продуктивных животных.

Ключевые слова: *Histophilus somni*, ПЦР, антибиотикорезистентность, гистофилез, крупный рогатый скот, КРС.

*Histophilus somni* (сем. *Pasteurellaceae*) — грамотрицательная бактерия, которая часто встречается у крупного рогатого скота и, как правило,

осложняет течение респираторных вирусных заболеваний (1). *H. somni* может вызывать мультисистемное заболевание, известное как гистофилез, при этом инфицирование верхних дыхательных путей часто предшествует поражению других систем органов. Наиболее часто *H. somni* вызывает респираторные заболевания и пневмонию у телят 1–2-месячного возраста, но также может быть причиной поражения легких у животных на откормочных площадках. Возбудитель способен длительно персистировать в организме, постепенно распространяясь по всему стаду. При изучении респираторных болезней крупного рогатого скота (КРС) в США и Канаде было показано, что *H. somni* — второй по распространенности (57 % случаев) бактериальный возбудитель после *Mannheimia haemolytica* (91 %) (2-5).

Для лечения гистофилеза и других бактериальных инфекций КРС используют различные антимикробные препараты, однако появление и распространение антибиотикорезистентных штаммов существенно снижает эффективность терапии. Для лечения заболеваний, вызванных микроорганизмами семейства *Pasteurellaceae*, наиболее часто применяют макролиды, тетрациклины, бета-лактамы (пенициллины и цефалоспорины), аминогликозиды, фениколы и сульфаниламиды (6, 7), в связи с чем можно ожидать формирование резистентности *H. somni* к антибиотикам этих групп. Чувствительность *H. somni* к антимикробным препаратам в настоящее время довольно высока, но к антибиотикам отдельных групп в последние годы начинает формироваться выраженная устойчивость (5, 8, 9).

Первые исследования антибиотикорезистентности *H. somni* были проведены компанией «Upjohn Company» (США) в 1988–1992 годах (10). Чувствительность изолятов *H. somni*, выделенных из легких КРС в США и Канаде, к бета-лактамам, тетрациклину и макролидам превышала 90 %, к аминогликозиду спектиномицину составляла 87,1 %. К препарату группы сульфаниламидов сульфаметазину оказались чувствительны лишь 35,8 % образцов (10). По данным другого исследования, проведенного R.D. Welsh с соавт. (11) в США в 1994–2002 годах, чувствительность *H. somni* к ампициллину, цефалоспину и тилмикозину оставалась высокой (94–100 %), а к тетрациклину и спектиномицину снизилась соответственно до 88–94 и 65 %. E. Portis с соавт. (12) изучали антибиотикорезистентность бактерий семейства *Pasteurellaceae* из респираторного комплекса КРС и показали, что в течение 2000–2009 годов чувствительность *H. somni* in vitro к бета-лактамам оставалась близкой к 90 %. Также 90–100 % изолятов *H. somni* были чувствительны к флорфениколу, при этом за 10-летний период снизилась доля изолятов *H. somni*, чувствительных к тетрациклину (12). Исследования резистентности *H. somni*, проведенные в Австралии, показали 100 % чувствительность бактерий к цефтиофуру (цефалоспину 3-го поколения), флорфениколу и энрофлоксацину, при этом был обнаружен один образец, устойчивый к макролидам (13).

Мониторинг резистентности *H. somni* к антибиотикам в Канаде с 2012 по 2016 годы выявил устойчивость к аминогликозиду неомицину у 93,6 % изолятов (14). В публикации C.G. Lamm с соавт. (15) сообщается о широкой вариабельности чувствительности микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae* (*Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* и *H. somni*) к макролиду тилмикозину — соответственно 88, 42 и 0 %. При этом отмечена высокая чувствительность всех трех микроорганизмов к препаратам группы фторхинолонов (90–98 %) и низкая — к тетрациклину (40 %) (15).

Исследования устойчивости *H. somni* к антибиотикам проводятся в основном в США и Канаде (4, 5, 12). На территории Европы проблеме

резистентности бактерий семейства *Pasteurellaceae* уделяется меньше внимания. Несмотря на то, что в странах Европейского союза были реализованы две программы мониторинга антибиотикорезистентности — ARBAO-II, организованная ЕС в 2003-2005 годах (16), и VetPath, курируемая Европейским центром исследований здоровья животных (European Animal Health Study Centre, CEESA, Бельгия) в 2002-2006 годах (17), — резистентность *H. somni* практически не изучалась. В рамках этих программ была исследована чувствительность *P. multocida* и *M. haemolytica* к разным антибиотикам. По чувствительности этих бактерий к флорфениколу, цефтиофуру и комбинации амоксициллина с клавулановой кислотой в обеих программах получены сходные результаты, однако данные по чувствительности к тетрациклину сильно различаются (16, 17). Несмотря на то, что *H. somni*, *P. multocida* и *M. haemolytica* относятся к одному семейству, они демонстрируют различную чувствительность к антимикробным препаратам (7, 10, 15), что не позволяет проводить параллели между ними в отношении развития антибиотикорезистентности. Российские исследователи также оценивали устойчивость к антибиотикам бактерий *P. multocida* и *M. haemolytica*, выделенных от КРС (18), однако антибиотикорезистентность *H. somni* не изучалась.

В настоящее время серьезное внимание уделяется определению генетических детерминант антибиотикорезистентности бактерий, вызывающих респираторные болезни КРС (19, 20). Для микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae*, имеющих значение для ветеринарии (*Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Histophilus*), зафиксировано наличие как минимум 9 генов устойчивости к тетрациклинам, 5 — к бета-лактамам, 6 — к макролидам, 10 — к аминогликозидам (21). G.H. D'Amours с соавт. (22) приводят результаты исследования изолятов *H. somni* на наличие различных вариантов генов устойчивости к тетрациклинам. Согласно этому сообщению, у *H. somni* выявлен только ген *tetH*, а другие гены не обнаружены. В публикациях канадских и американских исследователей встречаются данные об интегративном конъюгативном элементе (ICE), несущем сразу несколько генов, кодирующих устойчивость *H. somni* к антибиотикам (14, 19, 25). У *H. somni* выявлены следующие гены резистентности: *tetH* — устойчивость к тетрациклинам, *blaOXA-2* — к пенициллинам, *strA*, *strB*, *aadA25*, *aphA1*, *aadB* — к аминогликозидам, *sul2* — к сульфаниламидам, *erm(42)*, *mrs(E)-mph(E)* — к макролидам, *floR* — к флорфениколу, *dfrA14* — к триметоприму (19, 21).

В настоящей работе впервые охарактеризована устойчивость к антимикробным препаратам изолятов *H. somni*, выделенных от КРС на территории Российской Федерации. Впервые установлена циркуляция резистентных штаммов *H. somni* в российских животноводческих хозяйствах.

Нашей целью было изучение антибиотикорезистентности циркулирующих штаммов *Histophilus somni* с помощью фенотипических и генотипических методов и оценка возможности использования ПЦР для прогнозирования устойчивости *H. somni* к антимикробным средствам нескольких групп. Молекулярно-генетическое определение антибиотикорезистентности проводилось на основе идентификации генов *blaOXA-2*, *sul2*, *strA*, *strB*, *aadA25*, *aphA1*, *tetH*.

**Методика.** Исследования проводили в 2018-2020 годах. В работе использовали культуры *H. somni*, выделенные в 2018-2019 годах из биологического материала (паренхиматозные органы, смывы, сперма) крупного рогатого скота разных пород, возрастных, половых и физиологических групп.

Посев материала проводили методом отпечатка на питательную среду СМ0898В (Oxoid™, «Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением сапле-мента FD117 («HiMedia Laboratories Pvt, Ltd.», Индия), а также на шоко-ладный агар. Культивирование осуществляли в атмосфере 10 % CO<sub>2</sub> в те-чение 48 ч. Чувствительность изолятов *H. somni* к стрептомицину (10 мкг), неомицину 30 (мкг), ампициллину (10 мкг), амоксициллину (30 мкг), цефо-таксиму (30 мкг), цефтазидиму (30 мкг), цефтриаксону (30 мкг), тетрацик-лину (30 мкг), доксициклину (30 мкг) («HiMedia Laboratories Pvt., Ltd.», Ин-дия) тестировали диско-диффузионным методом, категории чувствительно-сти (чувствительный, промежуточный или резистентный) определяли по-средством сравнения зоны задержки роста микроорганизма по рекоменда-циям Института клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (23) с некоторыми изменениями.

Бактериальные суспензии готовили на сердечно-мозговом бульоне из 48-часовых агаровых культур. Оптическая плотность каждого инокулюма перед использованием составляла 0,5 ед. по шкале МакФарланда, что соот-ветствовало концентрации  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Инкубацию посевов с дисками антибактериальных препаратов проводили в течение 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере с 8-10 % CO<sub>2</sub>. Диаметр зоны ингибирования роста куль-тур измеряли штангенциркулем и выражали в миллиметрах. Все измерения проводили в 3 повторностях.

ДНК из культур *H. somni* использовали для выявления генетических детерминант устойчивости к антибиотикам. Экстракцию ДНК проводили из 100 мм<sup>3</sup> бактериальной суспензии с помощью комплекта реагентов ДНК-сорб-В (ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпиде-миологии, ЦНИИЭ, Россия). Изоляты *H. somni* были протестированы на наличие семи генов устойчивости к антибиотикам (*tetH*, *blaOXA-2*, *aadA25*, *strA*, *strB*, *aphA1*, *sul2*) методом ПЦР с электрофоретической детекцией и ги-бридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в ре-жиме реального времени (24). ПЦР с электрофоретической детекцией про-водили на амплификаторе Терцик («ДНК-Технология», Россия) по следую-щей программе: 5 мин при 95 °С; 10 с при 95 °С, 20 с при 55-64 °С (в зависимости от используемых праймеров), 10 с при 72 °С (40 циклов); 3 мин при 72 °С. Реакционные смеси для ПЦР содержали 10 мм<sup>3</sup> ДНК-матрицы, по 6 пмоль специфических праймеров, раствор дНТФ и ПЦР-смесь-2-blue (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Детекцию осуществляли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Положительные образцы дополнительно подтвер-ждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Для выявления генов *aadA25*, *strA*, *strB* и *sul2* были дополнительно подобраны TaqMan-зонды и отработаны условия ПЦР в режиме реального времени на приборах RotorGene 6000 («Corbett Research Pty, Ltd.», Австра-лия) и RotorGene Q («Qiagen», Германия). ПЦР проводили в режиме 15 мин при 95 °С; 10 с при 95 °С, 20 с при 63 °С, 10 с при 72 °С (5 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); 10 с при 95 °С, 20 с при 60 °С, 10 с при 72 °С (35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала). Ампли-фикацию генов *strA* и *strB* осуществляли одновременно в процессе мультитиплексной ПЦР.

Реакционные смеси содержали 10 мм<sup>3</sup> ДНК-матрицы, 10 мм<sup>3</sup> ПЦР-смеси-1 (по 6 пмоль специфических праймеров и по 3 пмоль зондов, рас-твор дНТФ, деионизованная вода), 0,5 мм<sup>3</sup> Taq-F полимеразы, 5 мм<sup>3</sup> ПЦР-буфера-Flu (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Эффективность экстракции ДНК

оценивали по прохождению реакции амплификации внутренних экзогенных контролей (ВКО). В качестве положительных контролей ПЦР использовали рекомбинантные плазмиды, содержащие целевые вставки (ПЦР-продукты) в векторной плазмиде pAL2-TA («Евроген», Россия).

Секвенирование продуктов ПЦР осуществляли с применением набора Big Dye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystem», США) на амплификаторе GeneAmp PCR System 2720 («Applied Biosystem», США) и автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystem», США).

**Результаты.** От 145 животных были выделены и идентифицированы 18 изолятов *H. somni*. Поскольку *H. somni* — медленно растущий организм, требовательный к условиям культивирования, вырастить в достаточном количестве и оценить на чувствительность к антибиотикам удалось лишь 12 образцов.

Исследованные изоляты наиболее часто были устойчивы к аминогликозидам. Так, резистентность к стрептомицину составляла 50 %, а устойчивость к неомицину превышала 40 % (табл. 1). Четыре образца были дополнительно исследованы на чувствительность к канамицину, гентамицину и спектиномицину. Устойчивость к канамицину была выявлена у одного образца. Все 4 образца оказались чувствительны к гентамицину и спектиномицину. В работах американских исследователей в панель антибиотиков был включен только один антибиотик группы аминогликозидов — спектиномицин (10-12, 15). Чувствительность изолятов *H. somni* к нему уменьшилась с 86 % в 1988-1992 годах до 65-86 % в 1994-2002 годах (10, 11). В работе К. Bhatt с соавт. (14) также показана высокая чувствительность *H. somni* к спектиномицину (87 %), однако к другому аминогликозиду, неомицину, оказались устойчивы 93,6 % изолятов, собранных в 2012-2016 годах и 22 % образцов, собранных в 1980-1990 годах в Канаде, что указывает на возрастание резистентности к этому препарату.

### 1. Фенотипическая устойчивость изолятов *Histophilus somni* к различным антибиотикам, определенная диско-диффузионным методом

Группа	Антибиотик	Число (доля, %) изолятов		
		устойчивых	с промежуточной устойчивостью	чувствительных
Аминогликозиды	Стрептомицин	6 (50 %)	–	6 (50 %)
	Неомицин	5 (42 %)	2 (16 %)	5 (42 %)
Бета-лактамы	Ампициллин	3 (25 %)	–	9 (75 %)
	Амоксициллин	3 (25 %)	–	9 (75 %)
	Цефотаксим	1 (8 %)	–	11 (92 %)
	Цефтазидим	–	–	12 (100 %)
	Цефтриаксон	–	–	12 (100 %)
Тетрациклины	Тетрациклин	–	–	12 (100 %)
	Доксициклин	2 (17 %)	–	10 (83 %)

Примечание. Прочерки означают, что устойчивые к указанному антибиотику изоляты не обнаружены.

Чувствительность изолятов *H. somni* к бета-лактамам (аминопенициллинам и цефалоспорином) в нашей работе была 75-100 %, что соответствует результатам исследований, проведенных в США и Канаде, согласно которым чувствительность изолятов *H. somni* к препаратам этой группы составляла 90-96 % (10-12). Следует отметить, что в нашей работе у 25 % изолятов была обнаружена устойчивость только к аминопенициллинам. У одного образца выявили резистентность к цефалоспориноу 3-го поколения цефотаксиму, при этом к другим препаратам 3-го поколения — цефтазидиму и цефтриаксону была зафиксирована 100 % чувствительность.

Чувствительность изолятов *H. somni* к препаратам группы тетрациклинов, по нашим данным, также оказалась высокой — 83-100 %. Это согласуется с результатами исследований, проведенных в США, в которых чувствительность *H. somni* к тетрациклину составляла 88-100 % (10, 11). Позднее в работе E. Portis с соавт. (12), проведенной в 2000-2009 годах, было показано, что чувствительность *H. somni* к тетрациклину неуклонно снижалась с каждым годом и за 9 лет уменьшилась практически вдвое — с 83 до 47 %. Нужно отметить, что в еще одном исследовании авторы сообщают о чувствительности *H. somni* к тетрациклину, составлявшей 92 % (15), что может быть связано как с различиями в выборке образцов, так и с неравномерным распределением устойчивых изолятов на территории стран Северной Америки.

В нашей работе шесть изолятов *H. somni* были дополнительно исследованы на чувствительность к препарату группы сульфаниламидов сульфаметоксазолу. Устойчивыми оказались 33 % образцов. Примерно такие же цифры были получены в работе R.D. Welsh с соавт. (11), где чувствительность к препарату этой группы сульфаклорпиридизину составила 68-86 %. В более ранней работе также была показана устойчивость более половины исследованных образцов к сульфаметазину (64,2 %) (10).

Среди изолятов *H. somni* мы выявили два образца, обладающих мультирезистентностью, что проявлялось в устойчивости к антибиотикам трех классов — аминогликозидам, бета-лактамам и тетрациклинам. Четыре образца показали фенотипическую устойчивость к препаратам двух классов антибиотиков (два образца к аминогликозидам и сульфаниламидам, два — к аминогликозидам и бета-лактамам). Надо отметить, что устойчивость *H. somni* сразу к нескольким антибиотикам была выявлена ранее при изучении бактерий, выделенных от больных животных на откормочных площадках в разных штатах США. В работе американских ученых 30 % исследованных изолятов *H. somni* были устойчивы к более чем семи классам антибиотиков, включая аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, бета-лактамы, фторхинолоны, линкозамиды и плевромугилины (25).

Все 18 изолятов, выделенных в нашей работе, были исследованы методом ПЦР на наличие генетических детерминант устойчивости к антимикробным препаратам. Праймеры, использованные для определения генетических детерминант устойчивости, представлены в таблице 2.

## 2. Праймеры, использованные для определения генетических детерминант устойчивости к антибиотикам у 18 изолятов *Histophilus somni*

Антибиотик	Ген-мишень	Последовательность 5'-3'	Tm, °C	Источник
Стрептомицин/ спектиномицин	<i>AadA25</i>	5'-GGCAACGCTATGTTCTCTTGCTTTTG-3'	60	Настоящая работа
		5'-TGTACGGCTCCGCAAGTGA-3'		
Неомицин/ гентамицин	<i>StrA</i>	5'-GGCGGCTGATCTGTCTGG-3'	59	(25)
Неомицин/ гентамицин	<i>StrB</i>	5'-CAGATAGAAGGCAAGGCGTTC-3'	60	(26)
		5'-CGCGTTGCTCCTTCTCCA-3'		
Канамицин/ неомицин	<i>aphA1</i>	5'-GGTACATGGCGATCTGCATC-3'	55	(25)
		5'-TTATGCCCTTCCGACCATC-3'		
Сульфонамиды	<i>Sul2</i>	5'-GAGAAAATTCACCGAGGCAG-3'	64	(25)
		5'-CCAATACCGCCAGCCCGTCG-3'		
Тетрациклины	<i>tetH</i>	5'-TGCSTTGTCCGCTGGTGTGG-3'	55	Настоящая работа
		5'-CCACCATTATGATCAGTATGTCT-3'		
Пенициллины	<i>blaOXA-2</i>	5'-CATCAGCCATAACAGACCATC-3'	64	(25)
		5'-GACAGCAACGCCAAGCGGA-3'		
		5'-CCCGCACGATTGCCCTCCCTC-3'		

Гены резистентности *H. somni* к тетрациклинам *tetH* и устойчивости к пенициллинам *blaOXA-2* не были выявлены ни в одном из 18 изолятов

(табл. 3). Чаще всего в образцах детектировали гены устойчивости к аминогликозидам *strA* и *strB* (44 % образцов), *aadA25* (39 %), *aphA1* (11 %). Ген устойчивости к сульфаниламидам *sul2* выявили в трех изолятах *H. somni*. В отличие от наших результатов, в работе К. Stanford с соавт. (20) ни в одном из 42 изолятов *H. somni* не был выявлен ген *aadA25*. При этом, как и мы, ни в одном из изолятов авторы не обнаружили ген *bla<sub>OXA2</sub>* (20). Интересно, что в работе канадских ученых при исследовании изолятов *H. somni* на наличие 13 генетических детерминант устойчивости и 5 генов, ассоциированных с ICE, 26 % изолятов не содержали ни генов ICE, ни генов устойчивости. Остальные изоляты сформировали две группы: в одной у изолятов было обнаружено 6, в другой — 9 генов устойчивости, при этом все изоляты несли 4 гена, ассоциированных с ICE (20).

### 3. Наличие генов антибиотикорезистентности у 18 изолятов *Histophilus somni*, выявленное методом ПЦР

Группа антибиотиков	Ген резистентности	Фермент, кодируемый геном резистентности	Число (доля, %) положительных образцов
Аминогликозиды	<i>aadA25</i>	Аминогликозид-3"-аденилтрансфераза	7 (39 %)
	<i>strA</i>	Аминогликозид-3"-фосфотрансфераза	8 (44 %)
	<i>strB</i>	Аминогликозид-6-фосфотрансфераза	8 (44 %)
	<i>aphA1</i>	Аминогликозид-3'-фосфотрансфераза	2 (11 %)
Тетрациклины	<i>tetH</i>	Белок эффлюкса	0
Бета-лактамы	<i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	Бета-лактамаза класса D	0
Сульфаниламиды	<i>sul2</i>	Дигидроптероат-синтаза	3 (17 %)

По данным анализа полного генома 7 изолятов *H. somni*, проведенного в этой же работе (20), у образцов чаще всего обнаруживали гены *strA*, *strB* и *sul2*. Эти результаты согласуются и с нашими данными по выявлению генов резистентности к аминогликозидам, однако, в отличие от работы канадских ученых, мы ни разу не обнаружили ген *tetH*. У двух образцов, резистентных по данным микробиологического анализа одновременно к аминогликозидам, пенициллинам и цефалоспорином, присутствовали только гены устойчивости к аминогликозидам *aadA25* и *strA*. Два образца, устойчивых по данным фенотипирования к аминогликозидам и сульфаниламидам, содержали практически все исследованные гены резистентности, кроме *tetH* и *bla<sub>OXA-2</sub>*. Возможно, гены *strA*, *strB*, *aadA25*, *aphA1* и *sul2*, как и гены резистентности *H. somni*, описанные в других работах (20, 25), располагаются на генетической кассете и передаются совместно, однако, поскольку в изолятах, исследованных нами, не выявлен ген *tetH*, характеристики этой генетической кассеты отличаются от описанных ранее ICE (14, 20, 25) и требуют дальнейшего изучения.

Мы сопоставили результаты, полученные в нашей работе с использованием микробиологического и молекулярно-генетического методов (табл. 4).

### 4. Соответствие фенотипической и генотипической устойчивости у 12 изолятов *Histophilus somni*

Группа	Антибиотик	S-фенотип		R-фенотип		Соответствие, %
		R-генотип	S-генотип	R-генотип	S-генотип	
Бета-лактамы	Ампициллин	0	9	0	3	75,0
	Амоксициллин	0	9	0	3	75,0
	Цефотаксим	0	11	0	1	91,7
	Цефтазидим	0	12	0	0	100
	Цефтриаксон	0	12	0	0	100
Тетрациклины	Тетрациклин	0	12	0	0	100
	Доксициклин	0	10	0	2	83,3
Аминогликозиды	Стрептомицин	0	6	6	0	100
	Неомицин	0	5	7 <sup>a</sup>	0	100

Примечание. S — чувствительный, R — устойчивый; <sup>a</sup> — включая изоляты с промежуточной устойчивостью.

Фенотипическая устойчивость к антибиотикам и присутствие генетических детерминант устойчивости были продемонстрированы для *H. somni* ранее (5, 20, 25). В работе К. Stanford с соавт. (20) соответствие фенотипической и генотипической устойчивости для аминогликозидов было крайне высоко и приближалось к 100 %, что совпадает с полученными нами результатами, согласно которым у всех штаммов, фенотипически устойчивых к аминогликозидам, выявляли генетические детерминанты такой устойчивости. У штаммов, устойчивых к стрептомицину, мы обнаружили ген *aadA25*. Во всех пяти штаммах, устойчивых к неомицину, детектировали одновременное присутствие генов *strA* и *strB*. Интересно, что в двух штаммах с промежуточной устойчивостью к неомицину гены *strA* и *strB* не выявили, но был детектирован ген *aadA25*. Аденилирование неомицина, по-видимому, снижает эффективность этого препарата, однако не приводит к абсолютной резистентности. Ген *aphA1* был обнаружен у двух образцов, устойчивых одновременно к стрептомицину и неомицину. Такое высокое соответствие данных фенотипирования позволит прогнозировать устойчивость изолятов к аминогликозидам на основе молекулярно-генетических исследований без длительной процедуры микробиологического исследования.

При сравнении генотипа и фенотипа устойчивости к сульфаниламидам также было получено неплохое соответствие: в нашей работе оно составило 100 %, в работе J.R. Owen с соавт. (19) — 94 %. И нами, и американскими авторами показана значительная вариабельность соответствия фенотип/генотип для бета-лактамов и тетрациклинов (19). В нашем исследовании ген *bla<sub>oxA-2</sub>* не был обнаружен ни в одном из трех образцов, фенотипически устойчивых к пенициллинам и цефалоспорином. Согласно данным литературы, у представителей семейства *Pasteurellaceae* найдено пять различных генов, кодирующих бета-лактамазы, однако на сегодняшний день у *H. somni* детектирован только *bla<sub>oxA-2</sub>* (21), в связи с чем мы проводили генотипирование устойчивости к бета-лактамам антибиотикам только по этому гену. Нельзя исключить, что в трех образцах, фенотипически устойчивых к бета-лактамам, могут присутствовать другие гены, кодирующие бета-лактамазы (*bla<sub>ROB-1</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>PSE-1</sub>* или *bla<sub>TEM-1</sub>*), которые передаются *H. somni* с помощью плазмид и мобильных генетических элементов от *P. multocida* и *M. haemolytica*.

Ген *tetH*, который кодирует мембранно-ассоциированный белок, ответственный за активное выведение тетрациклинов из бактериальной клетки (эффлюкс), также не был обнаружен при исследовании образцов, несмотря на то что два образца проявляли резистентность к доксициклину. По-видимому, устойчивость этих образцов обусловлена другими механизмами резистентности.

Таким образом, показана устойчивость *Histophilus somni* к препаратам групп аминогликозидов и сульфаниламидов, при этом чувствительность *H. somni* к тетрациклинам и цефалоспорином 3-го поколения была выше 90 %. Можно предположить высокую эффективность антибиотиков этих классов в антибактериальной терапии заболеваний, вызванных *H. somni*. Продемонстрировано высокое соответствие данных микробиологического и молекулярно-генетического методов выявления устойчивости к аминогликозидам и сульфаниламидам, в связи с чем можно рекомендовать метод ПЦР для прогнозирования устойчивости *H. somni* к исследованным препаратам этих групп. На основании данных литературы о наличии других



генов резистентности к макролидам и к флорфениколу *erm(42)*, *mrs(E)-mph(E)*, *floR* и активном использовании препаратов этих групп антибиотиков на территории Российской Федерации считаем, что исследование антибиотикорезистентности *H. somni* должно быть продолжено.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gershwin L.J., Berghaus L.J., Arnold K., Anderson M.L., Corbeil L.B. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, 107(1-2): 119-130 (doi: 10.1016/j.vetimm.2005.04.004).
2. Harris F.W., Janzen E.D. The *Haemophilus somnus* disease complex (hemophilosis): a review. *Canadian Veterinary Journal*, 1989, 30(10): 816-822.
3. O'Toole D., Sondgeroth K.S. Histophilosis as a natural disease. In: *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 396 /T.J. Inzana (ed.). Springer Cham, 2016: 15-48 (doi: 10.1007/82\_2015\_5008).
4. Corbeil L.B., Widders P.R., Gogolewski R., Arthur J., Inzana T.J., Ward A.C. *Haemophilus somnus*: bovine reproductive and respiratory disease. *Canadian Veterinary Journal*, 1986, 27(2): 90-93.
5. DeDonder K.D., Apley M.D. A literature review of antimicrobial resistance in pathogens associated with bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*, 2015, 16(2): 125-134 (doi: 10.1017/S146625231500016X).
6. Peek S.F., Olivett T.L., Divers T.J. *Rebhun's diseases of dairy cattle*. Elsevier, Saunders, 2018, 4: 94-167 (doi: 10.1016/C2013-0-12799-7).
7. Cameron A., McAllister T.A. Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7: 68 (doi: 10.1186/s40104-016-0127-3).
8. Timsit E., Hallewell J., Booker C., Tison N., Amat S., Alexander T.W. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 2017, 208: 118-125 (doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.013).
9. Magstadt D.R., Schuler A.M., Coetzee J.F., Krull A.C., O'Connor A.M., Cooper V.L., Engelken T.J. Treatment history and antimicrobial susceptibility results for *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* isolates from bovine respiratory disease cases submitted to the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory from 2013 to 2015. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2018, 30(1): 99-104 (doi: 10.1177/1040638717737589).
10. Watts J.L., Yancey R.J. Jr., Salmon S.A., Case C.A. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(3): 725-731 (doi: 10.1128/JCM.32.3.725-731.1994).
11. Welsh R.D., Dye L.B., Payton M.E., Confer A.W. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2004, 16(5): 426-431 (doi: 10.1177/104063870401600510).
12. Portis E., Lindeman C., Johansen L., Stoltman G. A ten-year (2000-2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex — *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* — in the United States and Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(5): 932-944 (doi: 10.1177/1040638712457559).
13. Goldspink L.K., Mollinger J.L., Barnes T.S., Groves M., Mahony T.J., Gibson J.S. Antimicrobial susceptibility of *Histophilus somni* isolated from clinically affected cattle in Australia. *The Veterinary Journal*, 2015, 203(2): 239-243 (doi: 10.1016/j.tvjl.2014.12.008).
14. Bhatt K., Timsit E., Rawlyk N., Potter A., Liljebjelke K. Integrative conjugative element ICEHs1 encodes for antimicrobial resistance and metal tolerance in *Histophilus somni*. *Frontiers in veterinary science*, 2018, 5: 153 (doi: 10.3389/fvets.2018.00153).
15. Lamm C.G., Love B.C., Krehbiel C.R., Johnson N.J., Step D.L. Comparison of antemortem antimicrobial treatment regimens to antimicrobial susceptibility patterns of postmortem lung isolates from feedlot cattle with bronchopneumonia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(2): 277-282 (doi: 10.1177/1040638711428149).
16. Hendriksen R.S., Mevius D.J., Schroeter A., Teale C., Meunier D., Butaye P., Franco A., Utinane A., Amado A., Moreno M., Greko C., Stark K., Berghold C., Myllyniemi A.L., Wasyl D., Sunde M., Aarestrup F.M. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2008, 50(1): 28 (doi: 10.1186/1751-0147-50-28).
17. De Jong A., Thomas V., Simjee S., Moyaert H., El Garch F., Maher K., Morrissey I., Butty P.,

- Klein U., Marion H., Rigaut D., Vallé M. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(1-2): 202-215 (doi: 10.1016/j.vetmic.2014.04.008).
18. Глотова Т.И., Глотов А.Г., Терентьева Т.Е., Кунгурцева О.В., Войтова К.В. Пастереллез крупного рогатого скота на молочных комплексах: частота выделения и характеристика культуры. *Российский ветеринарный журнал*, 2012, 3: 32-35.
  19. Owen J.R., Noyes N., Young A.E., Prince D.J., Blanchard P.C., Lehenbauer T.W., Aly S.S., Davis J.H., O'Rourke S.M., Abdo Z., Belk K., Miller M.R., Morley P., Van Eenennaam A.L. Whole-genome sequencing and concordance between antimicrobial susceptibility genotypes and phenotypes of bacterial isolates associated with bovine respiratory disease. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2017, 7(9): 3059-3071 (doi: 10.1534/g3.117.1137).
  20. Stanford K., Zaheer R., Klima C., McAllister T., Peters D., Niu Y.D., Ralston B. Antimicrobial resistance in members of the bacterial bovine respiratory disease complex isolated from lung tissue of cattle mortalities managed with or without the use of antimicrobials. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 288 (doi: 10.3390/microorganisms8020288).
  21. Michael G.B., Bossé J.T., Schwarz S. *Antimicrobial resistance in Pasteurellaceae of veterinary origin*. In: *Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals* /S. Schwarz, L. Cavaco, J. Shen (eds.). ASM Press, Washington, DC, 2018: 331-363 (doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0022-2017).
  22. D'Amours G.H., Ward T.I., Mulvey M.R., Read R.R., Morck D.W. Genetic diversity and tetracycline resistance genes of *Histophilus somni*. *Veterinary Microbiology*, 2011, 150(3-4): 362-372 (doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.051).
  23. CLSI. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*. 4th Edition. CLSI supplement Vet08. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 2018.
  24. Яцентюк С.П., Рудняев Д.А., Поболелова Ю.И., Козлова А.Д. Выявление ДНК *Histophilus somni* в сперме крупного рогатого скота методом полимеразной-цепной реакции в режиме реального времени. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*, 2020, 1: 58-59 (doi: 10.17238/issn2072-6023.2020.1.58).
  25. Klima C.L., Zaheer R., Cook S.R., Booker C.W., Hendrick S., Alexander T.W., McAllister T.A. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(2): 438-448 (doi: 10.1128/JCM.02485-13).
  26. Wang Z., Kong L.C., Jia B.Y., Liu S.M., Jiang X.Y., Ma H.X. Aminoglycoside susceptibility of *Pasteurella multocida* isolates from bovine respiratory infections in China and mutations in ribosomal protein S5 associated with high-level induced spectinomycin resistance. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(10): 1678-1681 (doi: 10.1292/jvms.17-0219).

*1*ФГБУ Всероссийский государственный  
Центр качества и стандартизации лекарственных  
средств для животных и кормов,

123022 Россия, г. Москва, Звенигородское ш., 5,  
e-mail: pcr-lab@vgnki.ru ✉, y.pobolelova@vgnki.ru, rudnyaev@vgnki.ru;  
*2*ФГБНУ ФНЦ Всероссийский НИИ экспериментальной  
ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко РАН,  
109428 Россия, г. Москва, Рязанский просп., 24, к. 1,  
e-mail: kapustin\_andrei@mail.ru, a-laishevsev@bk.ru

Поступила в редакцию  
30 июля 2020 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, V. 56, № 2, pp. 304-314

## IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE CATTLE PATHOGEN *Histophilus somni*

S.P. Yatsentyuk<sup>1</sup> ✉, Yu.I. Pobolelova<sup>1</sup>, D.A. Rudnyaev<sup>1</sup>, A.I. Laishevchev<sup>2</sup>, A.V. Kapustin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 5, Zvenigorodskoe sh., Moscow, 123022 Russia, e-mail pcr-lab@vgnki.ru (✉ corresponding author), y.pobolelova@vgnki.ru, rudnyaev@vgnki.ru;

<sup>2</sup>Federal Scientific Centre Skryabin and Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary RAS, 24/1, Ryazanskii Prosp., Moscow, 109428 Russia, e-mail kapustin\_andrei@mail.ru, a-laishevsev@bk.ru

ORCID:

Yatsentyuk S.P. orcid.org/0000-0002-4819-2131  
Pobolelova Yu.I. orcid.org/0000-0002-8780-4671  
Rudnyaev D.A. orcid.org/0000-0002-1753-5920

Laishevchev A.I. orcid.org/0000-0002-5050-2274  
Kapustin A.V. orcid.org/0000-0003-0136-2487

The authors declare no conflict of interests

Received July 30, 2020

doi: 10.15389/agrobiology.2021.2.304eng

## Abstract

*Histophilus somni* is a Gram-negative bacterium of the *Pasteurellaceae* family which is a component of the Bovine Respiratory Disease Complex and the pathogen, causing a multisystem disease — histophilosis. For the treatment of diseases caused by *Pasteurellaceae* bacteria, aminoglycosides, sulfonamides, beta-lactams, tetracyclines and macrolides are most often used, therefore the formation of resistance of *H. somni* to antibiotics of these groups can be expected. This work is the first study of antibiotic resistance of *H. somni* isolated from cattle in the Russian Federation. This work aimed at exploration of the antibiotic resistance of circulating *H. somni* strains by phenotypic and genotypic methods and the evaluation of the PCR method applicability for the prediction *H. somni* resistance to antimicrobial agents. We studied 18 cultures of *H. somni*, the causative agent of histophilosis, isolated in 2018-2019 from biological material (parenchymal organs, washes, sperm) of 145 animals of different breed, age, sex and physiological groups using microbiological method. The cultures were studied using the disk diffusion method for sensitivity to 13 antibiotics of aminoglycosides, beta-lactams, tetracyclines and sulfonamides classes. All obtained isolates were tested by PCR for the presence of genetic determinants of antibiotic resistance, most often found in *H. somni*: *tetH* (resistance to tetracyclines), *bla<sub>OXA-2</sub>* (resistance to penicillins), *aadA25*, *strA*, *strB*, *aphA1* (resistance to aminoglycosides), *sul2* (sulfonamide resistance). Resistance to aminoglycoside group was most prevalent, i.e., resistance to streptomycin was 50 %, and resistance to neomycin exceeded 40 %. Resistance genes *aadA25*, *strA*, *strB* and *aphA1* were found in the resistant samples. A total of 33 % isolates showed resistance to sulfonamides, all this samples were positive for the *sul2* gene in PCR. The sensitivity to penicillins was quite high (~ 75 %), the sensitivity to beta-lactams approached 100 %. The sensitivity to antimicrobials of the tetracycline group was higher than 80 %. However, neither tetracyclines (*tetH*) nor penicillins (*bla<sub>OXA-2</sub>*) resistance genes were identified during the study. Two isolates were multidrug resistant with resistance to aminoglycosides, beta-lactams and tetracyclines. Also, four samples were resistant to antimicrobial agents of two different groups, i.e., two samples were resistant to aminoglycosides and sulfonamides with *strA*, *strB*, *aadA25*, *aphA1*, and *sul2* genes found, and two samples were resistant to aminoglycosides and beta-lactams with only aminoglycoside resistance genes *aadA25* and *strA* identified. With the exception of samples resistant to tetracyclines and beta-lactams, in which the expected genes were not detected, all observed phenotypes of antimicrobial resistance were consistent with the PCR test results. The combination of genotypic and phenotypic methods for determining antibiotic resistance is necessary for understanding of the resistance mechanisms and increases the efficiency of antibiotic resistance monitoring programs.

Keywords: *Histophilus somni*, PCR, antibiotic resistance, histophilosis, cattle.