

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet9713
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 615.33.636.09

Investigation of the antimicrobial activity of danofloxacin against bacteria pathogens in goats

T. I. Stetsko, Ya. M. Liubenko, V. N. Padovskyi, L. L. Ostrovska, O. Yo. Kalinina, O. Z. Balyan

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Lviv, Ukraine

Article info

Received 30.01.2020
Received in revised form
02.03.2020
Accepted 03.03.2020

State Scientific-Research Control
Institute of Veterinary Medicinal
Products and Feed Additives,
Donetska Str., 11, Lviv,
79019, Ukraine.
Tel.: +38-067-252-98-29
E-mail: stetskot@ukr.net

Stetsko, T. I., Liubenko, Ya. M., Padovskyi, V. N., Ostrovska, L. L., Kalinina, O. Yo., & Balyan, O. Z. (2020). Investigation of the antimicrobial activity of danofloxacin against bacteria pathogens in goats. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 22(97), 74–78. doi: 10.32718/nvlvet9713

Fluoroquinolones are critical antimicrobials for both human and veterinary medicine. Due to their unique mechanism of antimicrobial action and good pharmacokinetic properties, they are often the first choice drugs in the treatment of bacterial infections in animals. The purpose of the investigation was to study the antimicrobial activity of a third-generation fluoroquinolone antibiotic of danofloxacin against bacteria, pathogens of respiratory and intestinal infection in goats. The samples of the nasal outflows (respiratory infection) and fecal masses (intestinal infection) were collected from clinically ill goats for microbiological studies. The sensitivity test of the microflora of the biomaterial, carried out by the disco-diffusion method, showed that the microorganisms of all the samples were sensitive to danofloxacin. Bacteria *Streptococcus pneumoniae* ($n = 10$), *Staphylococcus aureus* ($n = 4$) and *Escherichia coli* ($n = 2$) were isolated and identified from nasal exudate samples ($n = 10$). Pathogenic strains of *Escherichia coli* were isolated from all faecal samples ($n = 12$). The degree of bacteriostatic activity of danofloxacin was determined by establishing its minimum inhibitory concentration (MIC) for bacterial isolates by sequential dilutions in a liquid nutrient medium. The average MIC of danofloxacin for *Streptococcus pneumoniae* isolates was $0.26 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ and for *Staphylococcus aureus* isolates – $0.25 \pm 0.075 \mu\text{g/ml}$. For *Escherichia coli* strains isolated from faeces of goats suffering from coli infection, the average MIC of danofloxacin was $0.38 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ (range 0.2 to 0.8 $\mu\text{g/ml}$). Antimicrobial sensitivity testing have shown a high level of bacteriostatic activity of danofloxacin against bacteria, pathogens of respiratory and intestinal infections in goats. This may be the argument for the use of danofloxacin-based chemotherapeutic agents in the treatment of bacterial infections in goats, especially for the empirical approach to therapy.

Key words: fluoroquinolones, danofloxacin, goats, respiratory and intestinal infections, bacteria, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, sensitivity of microorganisms, minimum inhibitory concentration.

Дослідження антимікробної активності данофлораксацину проти збудників бактеріальних інфекцій у кіз

Т. І. Стецько, Я. М. Любенко, В. Н. Падовський, Л. Л. Островська, О. Й. Калініна, О. З. Бальян

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів, Україна

Фторхінолони є критично важливими антимікробними речовинами як для гуманної, так і для ветеринарної медицини. Завдяки унікальному механізму антимікробної дії та добрим фармакокінетичним властивостям, вони часто служать препаратами першого вибору при лікуванні бактеріальних інфекцій у тварин. Метою дослідження було вивчення антимікробної активності фторхінолонового антибіотику третього покоління данофлораксацину щодо бактерій, збудників респіраторної та кишкової інфекції у кіз. Для мікробіологічних досліджень від клінічно хворих кіз відбирали зразки носових виділень (респіраторна інфекція) і калових

мас (кишкова інфекція). Тест на чутливість мікрофлори біоматеріалу, проведений диско-дифузійним методом, показав, що мікроорганізми усіх зразків були чутливими до данофлораксацину. Зі зразків носового ексудату ($n = 10$) були виділені та ідентифіковані бактерії *Streptococcus pneumoniae* ($n = 10$), *Staphylococcus aureus* ($n = 4$) і *Escherichia coli* ($n=2$). З усіх зразків калових мас ($n = 12$) були виділені патогенні штами *Escherichia coli*. Ступінь бактеріостатичної активності данофлораксацину визначали шляхом встановлення його мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) для бактерій-ізолятів методом послідовних розведень у рідкому поживному середовищі. Середнє значення МІК данофлораксацину для ізолятів *Streptococcus pneumoniae* становило $0,26 \pm 0,13$ мкг/мл, а для ізолятів *Staphylococcus aureus* – $0,25 \pm 0,075$ мкг/мл. Для штампів *Escherichia coli*, виділених з фекалій кіз, хворих на коліінфекцію, середнє значення МІК данофлораксацину становило $0,38 \pm 0,12$ мкг/мл (діапазон від 0,2 до 0,8 мкг/мл). Дослідження антимікробної чутливості показало високий рівень бактеріостатичної активності данофлораксацину щодо бактерій, збудників респіраторної та кишкової інфекцій у кіз. Це може служити підставою для застосування хіміотерапевтичних засобів на основі данофлораксацину в лікуванні бактеріальних інфекцій у кіз, особливо при емпіричному підході до терапії.

Ключові слова: фторхінолони, данофлораксацин, кози, респіраторні та кишкові інфекції, бактерії, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, чутливість мікроорганізмів, мінімальна інгібуюча концентрація.

Вступ

Кози, як і інші види сільськогосподарських тварин, схильні до інфекційних хвороб. Інфекції можуть мати різну етіологію – вірусну, бактеріальну, грибову. Бактеріальні інфекції є одними з найпоширеніших захворювань кіз (Duhamel et al., 1992; Oros et al., 1997; Berge et al., 2006). На сьогодні антибактеріальні препарати залишаються основними засобами їхнього лікування. Вибір ефективного антибіотика часто ускладнюється наявністю антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів (Paphitou, 2013; Clifford et al., 2018). Тому ефективність лікування бактеріальних хвороб у значній мірі залежить від хіміотерапевтичного засобу, активно діюча речовина якого володіла б високою біологічною активністю щодо мікроорганізмів, збудників інфекцій (Boothe, 2006; Stetsko, 2008).

Антибіотики групи фторхінолонів є одними з найефективніших засобів хіміотерапії бактеріальних інфекцій у тварин. Їхня ефективність пов'язана насамперед з унікальним механізмом антимікробної дії. Фторхінолони діють бактерицидно, блокуючи активність ферментів ДНК-гіраза і топоізомераза IV, які забезпечують суперспіралізацію ДНК, що призводить до загибелі мікробної клітини (Smith & Lewin, 1988; Hooper & Wolfson, 1993). Фторхінолони мають добрі фармакокінетичні властивості. Вони характеризуються високим рівнем біодоступності, великим об'ємом розподілу в макроорганізмі, створюючи високі концентрації у більшості тканин та рідин організму і проникаючи всередину клітин, тривалим періодом напіввиведення (Yakovlev, 1993). Фторхінолони є антибіотиками широкого спектру дії, що належать до критично важливих антимікробних препаратів як для гуманної, так і для ветеринарної медицини (Yakovlev, 1999; Resolution OIE No. XXVIII, 2007; WHO, 2011).

Ще одною особливістю фторхінолонів є те, що стійкість мікроорганізмів до цього класу антибіотиків виникає внаслідок генних мутацій у хромосомах бактерій, рідше поширюючись через плазмідні, що значно сповільнює появу антибіотикорезистентних штамів. Відсутні дані щодо ензимної інактивації фторхінолонів бактеріями, для антибіотиків цієї групи не характерна перехресна резистентність з іншими класами антибіотиків (Stetsko, 2005).

Метою роботи було вивчити активність антимікробного препарату Данофлоракс, розчину для ін'єкцій,

виробництва ПАТ "Галичфарм" (Україна), на основі фторхінолонового антибіотика третього покоління данофлораксацину стосовно до мікроорганізмів, збудників бактеріальних інфекцій у кіз.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на базі одного з фермерських господарств Львівської області, що спеціалізувалося на вирощуванні кіз молочного напрямку. Суб'єктами дослідження був молодняк кіз з клінічними ознаками гострої респіраторної (пневмонія) та кишкової (ентерит) інфекції. Діагноз ставили на основі даних анамнезу, клінічних симптомів захворювання та результатів мікробіологічного дослідження.

Для мікробіологічних досліджень від хворих тварин відбирали зразки носових виділень (респіраторна інфекція) та калових мас (кишкова інфекція). Чутливість до данофлораксацину мікрофлори біоматеріалу встановлювали методом дифузії в агар з використанням паперових дисків з данофлораксацином. Інтерпретацію результатів тесту на чутливість проводили таким чином: діаметр затримки росту навколо диску з данофлораксацином: ≥ 21 мм – мікрофлора чутлива; 20–16 мм – помірно чутлива; ≤ 16 мм – резистентна (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004).

Виділення та ідентифікацію мікроорганізмів проводили за загальноприйнятими мікробіологічними методиками. Рівень бактеріостатичної активності препарату Данофлоракс щодо збудників бактеріальних інфекцій кіз визначали шляхом встановлення мінімальної інгібуючої концентрації данофлораксацину (МІК) для бактерій-ізолятів методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі (Yoshimura et al., 2002). Для цього були приготовлені розведення препарату Данофлоракс з концентрацією діючої речовини у розчинах 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05 і 0,025 мкг/мл. Інтерпретацію отриманих значень МІК антибіотиків для бактерій-ізолятів проводили таким чином: $\leq 0,5$ мкг/мл – штам мікроорганізму чутливий; від 0,5 до 4,0 мкг/мл – помірно чутливий; ≥ 4 мкг/мл – резистентний (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004).

Результати та їх обговорення

Результати тесту на чутливість мікрофлори носових виділень хворих на пневмонію кіз наведені у таблиці 1.

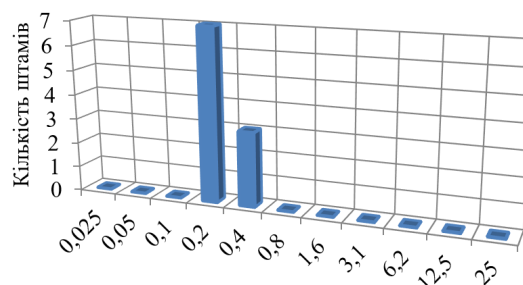
Отримані результати показали високий рівень чутливості мікрофлори носового ексудату кіз, хворих на пневмонію, до діючої речовини препарату Данофлоркс. Середня величина діаметру зони затримки росту мікрофлори навколо диска з данофлорксацином становила $27,5 \pm 1,95$ мм.

З усіх зразків носового ексудату (n = 10) були виділені стрептококи (*Streptococcus pneumoniae*). З 4 зразків біоматеріалу, окрім стрептококу, були виділенні стафілококи (*Staphylococcus aureus*), з двох – кишкова паличка (*Escherichia coli*).

Отримані значення МІК данофлорксацину для ізолятів *Streptococcus pneumoniae* показані на рисунку 1.

За значеннями МІК до данофлорксацину чутливими були усі виділені штами стрептококу. Середнє значення

МІК данофлорксацину для ізолятів *Streptococcus pneumoniae* становило $0,26 \pm 0,13$ мкг/мл.



Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл

Рис. 1. МІК данофлорксацину для ізолятів *Streptococcus pneumoniae* (мкг/мл, n = 10)

Результати визначення МІК данофлорксацину для ізолятів *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli* наведені у таблиці 2.

Таблиця 1

Чутливість мікрофлори носових виділень хворих на пневмонію кіз до данофлорксацину (n = 10)

Антибіотик	Діаметр зон затримки росту, мм									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
данофлорксацин	30	29	26	30	28	25	25	27	26	29
рівень чутливості	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч

Примітка: “Ч” – мікрофлора чутлива

Таблиця 2

МІК данофлорксацину для ізолятів *Staphylococcus aureus* (n = 4) і *Escherichia coli* (n = 2)

Концентрація антибіотика (мкг/см ³)	Мікроорганізм					
	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>	
	1	2	3	4	1	2
25	-	-	-	-	-	-
12,5	-	-	-	-	-	-
6,2	-	-	-	-	-	-
3,1	-	-	-	-	-	-
1,6	-	-	-	-	-	-
0,8	-	-	-	-	+	-
0,4	-	-	-	-	+	-
0,2	-	-	-	+	+	+
0,1	+	+	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+	+	+
0,025	+	+	+	+	+	+

Примітка: “-” – відсутність росту; “+” – наявність росту

За значеннями МІК усі виділені штами *Staphylococcus aureus* були чутливими до данофлорксацину. Середнє значення МІК антибіотика для ізолятів *Staphylococcus aureus* становило $0,25 \pm 0,075$ мкг/мл. Один штам *Escherichia coli* був помірно чутливий

(МІК = 1,6 мкг/мл) до данофлорксацину, інший – чутливий (МІК = 0,4 мкг/мл).

Результати тесту на чутливість мікрофлори калових мас до данофлорксацину, проведеного диско-дифузійним методом, наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Чутливість мікрофлори калових мас хворих на ентерит кіз до данофлорксацину (n = 12)

Антибіотик	Діаметр зон затримки росту, мм											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
данофлорксацин	25	26	25	29	23	28	26	23	25	27	25	26
рівень чутливості	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч

Примітка: “Ч” – мікрофлора чутлива

За розмірами зон затримки росту до данофлоксацину виявилася чутливою мікрофлора усіх фекальних зразків (100 %). Середнє значення діаметру зони затримки росту мікроорганізмів навколо диску з данофлоксацином становило $25,7 \pm 1,33$ мм.

З усіх зразків калових мас була виділена та ідентифікована кишкова паличка (*Escherichia coli*). На основі отриманих результатів бактеріологічного дослідження був поставлений остаточний діагноз “колібактеріоз кіз”.

Результати встановлення МІК данофлоксацину в препараті Данофлоркс для ізолятів *Escherichia coli* показані на рис. 2.

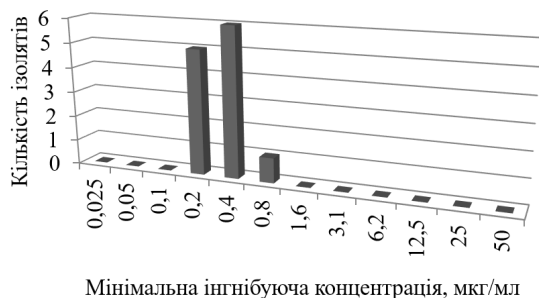


Рис. 2. МІК данофлоксацину для ізолятів *Escherichia coli* (мкг/мл, n = 12)

За рівнем бактеріостатичної активності данофлоксацину 11 з 12 штамів кишкової палички виявилися чутливими до препарату (91,7 %), і лише один штам – помірно чутливим (8,3 %). Середня величина МІК данофлоксацину для ізолятів *Escherichia coli* становила $0,38 \pm 0,12$ мкг/мл (діапазон від 0,2 до 0,8 мкг/мл).

Отримані результати чутливості до данофлоксацину мікроорганізмів, збудників бактеріальних інфекцій у кіз, корелюють з даними, отриманими іншими дослідниками. Так, у дослідженнях Marín та ін. МІК данофлоксацину для 32 штамів *Staphylococcus aureus*, виділених з молока хворих на мастит кіз, становила в середньому 0,25 мкг/мл (Marín et al., 2010). Високий ступінь бактеріостатичної активності данофлоксацину підтверджений в дослідженнях Serrano-Rodríguez та ін., які вивчаючи чутливість до п'яти фторхінолонових антибіотиків 24 ізолятів *Staphylococcus aureus*, виділених від маститного молока кіз, отримали найнижчі значення МІС саме для данофлоксацину (Serrano-Rodríguez et al., 2017).

Є дані про високий рівень антимікробної активності данофлоксацину проти патогенних бактерій, виділених від інших видів продуктивних тварин (Cruz et al., 1997; Yoshimura et al., 2002; Zhao et al., 2005; Grobbel et al., 2007; Ozawa et al., 2010). Так, дослідження *in vitro* активності 16 антимікробних речовин показали найвищий рівень чутливості *Actinobacillus pleuropneumoniae* до данофлоксацину (МІК₉₀ = 0,05 мкг/мл) (Yoshimura et al., 2002). Середня величина МІС₅₀ данофлоксацину для штамів *Escherichia coli* у випадках пташиного колибактеріозу становила 0,25 мкг/мл, тимчасом як норфлоксацину і офлоксацину – 0,5 мкг/мл (Ozawa et al., 2010).

Висновки

Бактеріальні інфекції є одними з найпоширеніших захворювань кіз. Успіх в їхньому лікуванні значною мірою залежить від вибору ефективних засобів етіотропної терапії, якими є антибіотики. Ефективність антибіотикотерапії своєю чергою залежить від чутливості патогенних мікроорганізмів до діючої речовини чи речовин антимікробного препарату.

Дослідження *in vitro* чутливості бактерій-ізолятів до данофлоксацину показали високу ступінь біологічної активності цього фторхінолонового антибіотика проти збудників бактеріальних інфекцій дихальної та травної системи у кіз, що дає підставу стверджувати, що хіміотерапевтичний засіб ветеринарного призначення Данофлоркс, розчин для ін'єкцій, виробництва ПАТ “Галичфарм”, може служити препаратом першочергового вибору при лікуванні бактеріальних інфекцій у кіз.

Перспективи подальших досліджень. Науково-практичне значення матимуть дослідження ефективності та безпечності при застосуванні препарату Данофлоркс у лікуванні респіраторних та кишкових інфекцій бактеріальної етіології у кіз.

References

- Berge, A. C., Sischo, W. M., & Craigmill, A. L. (2006). Antimicrobial susceptibility patterns of respiratory tract pathogens from sheep and goats. *J Am Vet Med Assoc*, 229(8), 1279–1281. doi: 10.2460/javma.229.8.1279.
- Boothe, D. M. (2006). Principles of antimicrobial therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 36(5), 1003–47. doi: 10.1016/j.cvsm.2006.07.002.
- Clifford, K., Desai, D., Prazeres da Costa, C., Meyer, H., Klohe, K., Winkler, A. S., Rahman, T., Islame, T., & Zamana, M. H. (2018). Antimicrobial resistance in livestock and poor quality veterinary medicines. *Bull World Health Organ*, 96(9), 662–664. doi: 10.2471/BLT.18.209585.
- Cruz, A. D., Lopes C. A. D. M., Modolo, J. R., & Gottschalk, A. F. (1997). Comparative "in vitro" study on the susceptibility and emergence of mutants resistant to danofloxacin and ciprofloxacin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Revista de Microbiologia. São Paulo, Soc Brasileira Microbiologia*, 28(1), 61–64. http://hdl.handle.net/11449/32806.
- Duhamel, G. E., Moxley, R. A., Maddox, C. W., & Erickson, E. D. (1992). Enteric infection of a goat with enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Vet Diagn Invest*, 4(2), 197–200. doi: 10.1177/104063879200400218.
- Grobbel, M., Lubke-Becker, A., Wieler, L. H., Froyman, R., Friederichs, S., & Filios, S. (2007). Comparative quantification of the *in vitro* activity of veterinary fluoroquinolones. *Vet Microbiol*, 124(1–2), 73–81. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.017.
- Hooper, D. C., & Wolfson, J. S. (1993). Mechanism of quinolone action and bacterial killing. In “Quinolone

- Antimicrobial Agents”. Amer. Soc. For Microbiol., Washington, 482–512.
- Marín, P., Escudero, E., Fernández-Varón, E., Cárceles, C. M., Corrales, J.C., Gómez-Martín, A., Martínez, I. (2010). Short communication: Fluoroquinolone susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from caprine clinical mastitis in southeast Spain. *J Dairy Sci*, 93(11), 5243–5245. doi: 10.3168/jds.2010-3345.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, informational supplement. (2004). NCCLS document M31-S1 (ISBN 1- 56238-534-8), p. 12.
- Oros, J., Fernandez, A., Rodriguez, J. L., & Poveda, J. B. (1997). Bacteria associated with enzootic pneumonia in goats. *Journal of Veterinary Medicine series B*, 44(1-10), 99–104. doi: 10.1111/j.1439-0450.1997.tb00955.x.
- Ozawa, M., Baba, K., Shimizu, Y., & Asai, T. (2010). Comparison of in vitro activities and pharmacokinetics/pharmacodynamics estimations of veterinary fluoroquinolones against avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Microb. Drug Resist*, 16, 327–332. doi: 10.1089/mdr.2010.0024.
- Paphitou, N. I. (2013). Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int J Antimicrob Agents*, 42, 25–28. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.04.007.
- Resolution No. XXVIII. OIE LIST OF ANTIMICROBIAL AGENTS OF VETERINARY IMPORTANCE, adopted by International Committee of OIE on 24 May (2007).
- Serrano-Rodríguez, J. M., Cárceles-García, C., Cárceles-Rodríguez, C.M., Gabarda, M.L., Serrano-Caballero, J. M., & Fernández-Varón, E. (2017). Susceptibility and PK/PD relationships of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and caprine with clinical mastitis against five veterinary fluoroquinolones. *Vet Rec.*, 180(15), 376. doi: 10.1136/vr.103964.
- Smith, L. T., & Lewin, C. S. (1988). Chemistry and mechanisms of action of the quinolone antibacterials. In “Quinolones”, Ed. Andriole V., Acaem. Press, 23–82.
- Stetsko, T. I. (2005). Rezystentnist do fluorhinoloniv: pokhodzhennia, evoliutsiia, klinichne znachennia ta shliakhy podolannia. *Biolohiia tvaryn*, 7(1–2), 51–63 (in Ukrainian).
- Stetsko, T. I. (2008). Zasady efektyvnoi antybiotyko-terapii u veterynarii medytsyni. *Veterynarna biotekhnolohiia*, 13(1), 194–200 (in Ukrainian).
- WHO (2011). Critically Important Antimicrobials for human medicine publication. <http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-third/en>.
- Yakovlev, S. V. (1999). Mesto fluorhinolonov v lechenii bakterialnykh infektsiy. *Antibiotiki i himioterapiya*, 44(12), 27–30 (in Russian).
- Yakovlev, V. P. (1993). Farmakokinetika fluorhinolonov. *Antibiotiki i himioterapiya*, 38(6), 66–78 (in Russian).
- Yoshimura, H., Takagi, M., Ishimura, M., & Endoh, Y. S. (2002). Comparative in vitro activity of 16 antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res Commun*, 26(1), 11–19. doi: 10.1023/a:1013397419995.
- Zhao, S., Maurer, J. J., Hubert, S., DeVillena, J. F., McDermott, P. F., Meng, J., Ayers, S., English, L., & White, D. G. (2005). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Vet. Microbiol.*, 107, 215–224. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.01.021.