

avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys / S. M. Goyal, S. J. Chiang, A. M. Dar [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2000. – Vol. 12. – P. 166-168. 5. Jones, R. C. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered / R. C. Jones // Avian Pathol. – 1996. – V. 25. – P. 639-648. 6. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup / M. H. Băyon-Auboyer, C. Arnauld, D. Toquin, N. Etteradossi // J. Gen. Virol. – 2000. – V. 81. – P. 2723-2733. 7. Preliminary antigenic characterization of an avian Pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA / J. K. A. Cook, M. B. Huggins, S. J. Orbell, D. A. Senne // Avian Pathol. – 1999. – V. 28. – P. 607-617.

#### ISOLATION OF FIELD AVIAN METAPNEUMOVIRUS ISOLATES USING TRACHEAL ORGAN CULTURE

**Nikonova Z.B., Lazareva S.P., Mudrak N.S., Drygin V.V.**  
FGI "Federal Center for Animal Health" (FGI "ARRIAH"), Vladimir

We recovered 7 field avian metapneumovirus (aMPV) isolates using tracheal organ culture. Properties of virus replication were described. The aMPV isolates were adapted to growth in chicken embryo fibroblast cell culture.

УДК 619:579.887.111:636.5

#### ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕТА-ЛАКТАМОВ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА *Mycoplasma gallisepticum* И СОПУТСТВУЮЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ

**Обуховская О.В.**

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Респираторный микоплазмоз – широко распространенное инфекционное заболевание сельскохозяйственной птицы, которое наносит значительный ущерб птицеводческим хозяйствам во всех странах мира [1, 2, 3, 4]. Условием успешной борьбы с этим заболеванием является установление эпизоотического статуса группы птицы (на основе результатов серологических и бактериологических исследований) и проведение иммунизации или антибиотикотерапии (в зависимости от стадии эпизоотического процесса) [5, 6, 7, 8]. Основой для постановки окончательного диагноза служат результаты бактериологического исследования. Одним из главных условий успешной и своевременной диагностики респираторного микоплазмоза является получение проб биологического материала, которые не контаминированы сопутствующей микрофлорой. С этой целью в среде для транспортировки проб добавляют пенициллин, так как представители семейства *Mycoplasmataceae* не чувствительны к этому антибиотику [9, 10, 11, 12]. Однако, другие бактериальные патогены, которые циркулируют среди птицепоголовья наряду с микоплазмами, в большинстве своем пенициллинрезистентны.

Поэтому на сегодняшний день актуально направление исследований по разработке подобных сред, в состав которых введены более эффективные и современные антибактериальные препараты.

Целью наших исследований было подобрать граничные концентрации таких антибактериальных препаратов, которые ингибируют рост представителей банальной микрофлоры, но не влияют на репродуктивные способности возбудителя респираторного микоплазмоза птиц.

**Материалы и методы.** В работе использовали «Жидкую питательную среду для изоляции и культивирования микоплазм» (ТУ У 24.4-00497087-091:2009), разработанную коллективом авторов ННЦ «ИЭКВМ». Для изучения ингибирующего влияния антибиотиков группы бета-лактамов на репродуктивные свойства микоплазм в готовую среду добавляли цефазолин и цефатаксим в концентрациях от 12,5 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>, а также пенициллин в концентрации 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>.

В качестве контроля использовали среду, содержащую только пенициллин (контроль 1), а также среду без добавления антибиотиков (контроль 2). Среды фасовали в бактериологические пробирки в количестве 5,0 см<sup>3</sup> и контролировали на стерильность по стандартной методике.

В качестве бактериальных тест-культур использовали музейные штаммы *Staphylococcus aureus* 209, *Escherichia coli* K99, *Bacillus alvei* 5, *Proteus mirabilis* K. Культуры микроорганизмов инкубировали на МПА (при температуре 37,5±0,5 °С в течении 20 часов). Бакмассу смывали стерильным физраствором и стандартизовали в соответствии с оптическим стандартом мутности и вносили в питательные среды с целью получения конечной концентрации 5×10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и культивировали в течении 5 суток при температуре 37,5±0,5 °С. На пятые сутки культивирования оценивали наличие и интенсивность роста бактерий визуально и путем микроскопии мазков. Визуально оценивали наличие и интенсивность помутнения среды, наличие осадка. Микроскопически определяли наличие бактерий в мазках, окрашенных по Грамму.

В качестве тест-культур микоплазм использовали музейный штамм *Mycoplasma gallisepticum* S<sub>6</sub>. 4-х суточную культуру вносили в пробирки с питательной средой в количестве 5×10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и культивировали в течении 5 суток при температуре 37,5±0,5 °С. На пятые сутки культивирования оценивали наличие и интенсивность роста микоплазм визуально, путем микроскопии мазков и путем фотокалориметрии.

Визуально оценивали наличие и интенсивность опалесценции среды, наличие осадка. Микроскопически определяли наличие элементарных тельц микоплазм в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе. На ФЕКе КФК-2 определяли изменение оптической плотности среды при зеленом светофильтре, длине волны 420-440 нм против стерильной среды.

**Результаты исследований.** Для проведения исследований из группы цефалоспоринов мы выбрали цефазолин (препарат I-го поколения) и цефатаксим (препарат III-го поколения), как наиболее эффективные, доступные и широко применяемые в практике.

На первом этапе мы подбирали минимальные концентрации цефалоспоринов, которые подавляют рост бактериальных культур. Выбор в качестве тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus alvei* и *Proteus mirabilis* объясняется не только тем фактом, что это типичные представители наиболее широко распространенных в птицеводстве групп бактериальных патогенов, но также и тем, что действующие на территории Украины нормативные документы рекомендуют использовать именно эти культуры при проведении изучения эффективности различных антибактериальных препаратов. В опытах использовали такую концентрацию культур, которая в 2-2,5 раза превышает аналогичный показатель в полевых условиях. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Результаты исследований показали, что наличие пенициллина в составе питательной среды (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>) не ингибирует рост бактериальных тест-культур при условии их первоначальной концентрации 5×10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Цефазолин оказывает бактерицидное действие на все тест-культуры в концентрациях от 25,0 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>. Действие цефатаксима аналогично для всех тест-культур за исключением *Bacillus alvei*, для этого патогена ингибирующей являются концентрации от 50,0 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>.

### Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

**Таблица 1** – Определение минимальных ингибирующих концентраций цефалоспоринов на рост бактериальных культур

Маркировка питательных сред	Наличие антибиотика в составе питательных сред			Наличие роста тест-культур на питательных средах			
	Пенициллина натриевая соль, мкг/см <sup>3</sup>	Цефазолин, мкг/см <sup>3</sup>	Цефатаксим, мкг/см <sup>3</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> 209	<i>Escherichia coli</i> K99	<i>Bacillus alvei</i> 5	<i>Proteus mirabilis</i> K
Опыт 1.1	1000,0	12,5	0,0	+	+	+	+
Опыт 1.2	1000,0	25,0	0,0	-	-	-	-
Опыт 1.3	1000,0	50,0	0,0	-	-	-	-
Опыт 1.4	1000,0	100,0	0,0	-	-	-	-
Опыт 1.5	1000,0	500,0	0,0	-	-	-	-
Опыт 1.6	1000,0	1000,0	0,0	-	-	-	-
Опыт 1.7	1000,0	0,0	12,5	+	+	+	+
Опыт 1.8	1000,0	0,0	25,0	-	-	+	-
Опыт 1.9	1000,0	0,0	50,0	-	-	-	-
Опыт 1.10	1000,0	0,0	100,0	-	-	-	-
Опыт 1.11	1000,0	0,0	500,0	-	-	-	-
Опыт 1.12	1000,0	0,0	1000,0	-	-	-	-
Контроль 1.1	1000,0	0,0	0,0	+	+	+	+
Контроль 1.2	0,0	0,0	0,0	+	+	+	+

**Примечания:** – - отсутствие роста тест-культуры, + - наличие роста тест-культуры.

В последующих опытах мы изучали влияние различных концентраций цефазолина и цефатаксима на репродуктивные свойства микоплазм.

**Таблица 2** – Изучение влияния на рост микоплазм наличия в жидкой питательной среде цефалоспоринов.

Маркировка питательных сред	Наличие антибиотика в составе питательных сред			Наличие роста штамма <i>M.gallisepticum</i> S <sub>6</sub> в жидкой питательной среде
	Пенициллина натриевая соль, мкг/см <sup>3</sup>	Цефазолин, мкг/см <sup>3</sup>	Цефатаксим, мкг/см <sup>3</sup>	
Опыт 2.1	0,0	12,5	0,0	+
Опыт 2.2	0,0	25,0	0,0	+
Опыт 2.3	0,0	50,0	0,0	+
Опыт 2.4	0,0	100,0	0,0	+
Опыт 2.5	0,0	250,0	0,0	+
Опыт 2.6	0,0	500,0	0,0	±
Опыт 2.7	0,0	1000,0	0,0	-
Опыт 2.8	0,0	0,0	12,5	+
Опыт 2.9	0,0	0,0	25,0	+
Опыт 2.10	0,0	0,0	50,0	+
Опыт 2.11	0,0	0,0	100,0	+
Опыт 2.12	0,0	0,0	250,0	+
Опыт 2.13	0,0	0,0	500,0	±
Опыт 2.14	0,0	0,0	1000,0	-
Контроль 2.1	1000,0	0,0	0,0	+
Контроль 2.2	0,0	0,0	0,0	+

**Примечания:** – - отсутствие роста тест-культуры, + - наличие роста тест-культуры, ± - наличие незначительного роста тест-культуры

При визуальной оценке результатов опыта не выявлено существенных различий между интенсивностью роста микоплазм в питательных средах с концентрациями цефазолина и цефатаксима от 12,5 до 100,0 мкг/см<sup>3</sup> (во всех случаях отмечена характерная опалесценция, в мазках выявлены скопления элементарных тел). Оба препарата в концентрации 500,0 мкг/см<sup>3</sup>

оказывали выраженное ингибирующее действие на рост возбудителя (опалесценция слабо выражена, в мазках – одиночные элементарные тельца). В случае использования обоих цефалоспоринов в концентрации 1000,0 мкг/см<sup>3</sup> выявить рост микоплазм визуально и микроскопически не удалось (табл. 2).

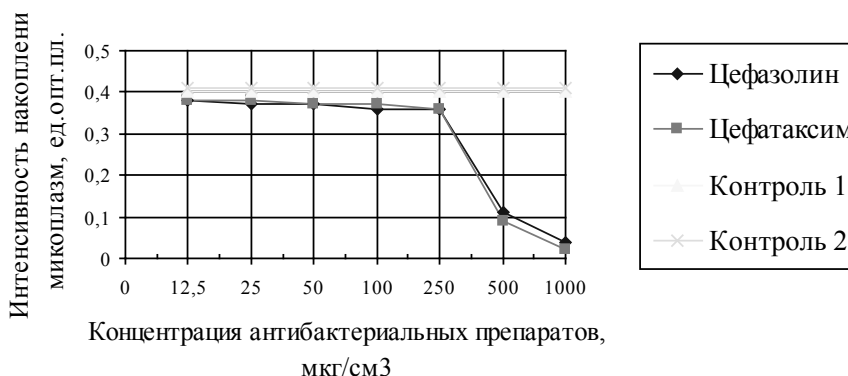


Рис. 1 Интенсивность накопления бактериальной массы микоплазм на фоне различных концентраций цефалоспоринов

При анализе интенсивности накопления микоплазм в питательной среде на ФЕКе удалось установить, что повышение концентрации цефазолина и цефатаксима от 12,5 до 250,0 мкг/см<sup>3</sup> незначительно снижает оптическую плотность бактериальной суспензии (от 2,6 до 4,2 %). Тогда как концентрация 500,0 мкг/см<sup>3</sup> уменьшает данный показатель (от 71,1 до 76,3 %), а концентрация 1000,0 – на 99,6 и 99,8 % соответственно (рис. 1).

Учитывая тот факт, что в питательные среды для культивирования микоплазм и транспортировки биоматериала при исследовании на микоплазмоз обычно содержат пенициллин мы повторили наши опыты, добавив к цефалоспоринам пенициллин в стандартной концентрации (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>).

Таблица 3 – Изучение влияния на рост микоплазм наличия в жидкой питательной среде цефазолина, цефатаксима и пенициллина

Маркировка питательных сред	Наличие антибиотика в составе питательных сред			Наличие роста штамма <i>Mycoplasma gallisepticum</i> S <sub>6</sub> в жидкой питательной среде
	Пенициллина натрия, мкг/см <sup>3</sup>	Цефазолин, мкг/см <sup>3</sup>	Цефатаксим, мкг/см <sup>3</sup>	
Опыт 3.1	1000,0	12,5	0,0	+
Опыт 3.2	1000,0	25,0	0,0	+
Опыт 3.3	1000,0	50,0	0,0	+
Опыт 3.4	1000,0	100,0	0,0	+
Опыт 3.5	1000,0	250,0	0,0	+
Опыт 3.6	1000,0	500,0	0,0	-
Опыт 3.7	1000,0	1000,0	0,0	-
Опыт 3.8	1000,0	0,0	12,5	+
Опыт 3.9	1000,0	0,0	25,0	+
Опыт 3.10	1000,0	0,0	50,0	+
Опыт 3.11	1000,0	0,0	100,0	+
Опыт 3.12	1000,0	0,0	250,0	+
Контроль 3.1	1000,0	0,0	500,0	-
Контроль 3.2	1000,0	0,0	1000,0	-
Контроль 3.1	1000,0	0,0	0,0	+
Контроль 3.2	0,0	0,0	0,0	+

Примечания: – отсутствие роста тест-культуры, + - наличие роста тест-культуры

Как видно из данных таблицы 3 наличие в среде пенициллина (1000 мкг/см<sup>3</sup>) и цефазолина (от 12,5 до 500,0 мкг/см<sup>3</sup>) не оказывает выраженного ингибирующего действия на интенсивность репродукции *M. gallisepticum* S<sub>6</sub>. Повышение концентрации цефазолина до 500,0 и 1000,0 мкг/см<sup>3</sup> ингибирует рост микоплазм. Аналогичные данные получены и для цефатаксима.

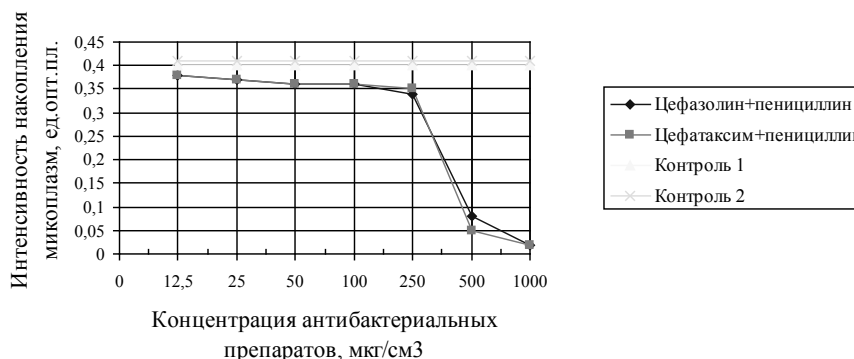


Рис. 2 Интенсивность накопления бактериальной массы микоплазм на фоне различных концентраций цефалоспоринов и пенициллина

Как показано на рис. 2 интенсивность накопления микоплазм в питательной среде в присутствии цефазолина и цефатаксима в концентрациях от 12,5 до 250,0 мкг/см<sup>3</sup> при условии наличия пенициллина (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>) практически не меняется по сравнению с контролями (снижается на 0,04 и 0,06 ед. опт. пл. соответственно). Наличие этих препаратов в концентрации 500 мкг/см<sup>3</sup> и выше не подавляет рост микоплазм полностью, но интенсивность накопления бакмассы в среде столь незначительна (0,08 и 0,02 ед. опт. пл.), что делает дальнейшее проведение диагностических или производственных работ практически невозможным.

Таким образом, нами установлены граничные концентрации цефалоспоринов I-го и III-го поколения, которые самостоятельно или совместно с пенициллином могут быть использованы в составе питательных сред для транспортировки проб биологического материала при проведении бактериологических исследований на респираторный микоплазмоз птиц.

**Выводы.** В серии лабораторных опытов установлено, что содержание в питательной среде цефазолина и цефатаксима в концентрациях от 50 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup> оказывает выраженное бактерицидное действие на представителей наиболее широко распространенных в птицеводстве групп бактериальных патогенов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus alvei*, *Proteus mirabilis*).

Концентрация цефалоспоринов от 12,5 до 250,0 мкг/см<sup>3</sup> не оказывает ингибирующего влияния на репродуктивные свойства *Mycoplasma gallisepticum* при условии наличия в среде пенициллина (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>).

Таким образом, оптимальные концентрации бета-лактамов различных групп, рекомендуемые для внесения в среды для транспортировки проб биологического материала при исследовании на респираторный микоплазмоз, составляют для цефазолина и цефатаксима 50,0-250,0 мкг/см<sup>3</sup>, для пенициллина – 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>.

**Перспективы дальнейших исследований.** В перспективе мы планируем провести аналогичные исследования в условиях птицеводств Украины с целью уточнения концентрации цефалоспоринов в питательных средах при исследовании на респираторный микоплазмоз птиц, а также решению вопроса о возможности исключения пенициллина из состава подобных сред.

#### Список литературы

1. Епанова, Е.Л. Респираторный микоплазмоз в хозяйствах мясного птицеводства АР Крым [текст] / Е.Л. Епанова // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – X., 2009. – Вып. 92. – С. 183-186.
2. Characterization of the mycoplasma conjunctivitis epizootic in a house finch population in the Southeastern USA [text] / S. Roberts [et al] // J. Wildlife Dis. – 2001. – 37: 1. – 82-88.
3. Current respiratory disease problem and the probes in chicken [text] / S. Hasan [et al] // Pakistan Veterinary Journal. – 2002. – 22: 1. – P. 17-20.
4. Рождественская, Т.Н. Микоплазмозы птицы: особенности эпизоотологии, диагностики и профилактики [текст] / Т.Н. Рождественская, А.Н. Борисенкова, С.В. Панкратов // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2006. – N 3. – С. 38-40.
5. Damages caused on broiler chickens by the induced action of *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli* [text] / O.D. Rodrigues [et al] // Revista Brasileira de Medicina Veterinaria. – 2001. – 23: 6. – P. 240-243.
6. Diagnosis and treatment of conjunctivitis in house finches associated with mycoplasmosis in Minnesota [text] / J.F.X. Wellehan [et al] // J. Wildlife Dis. – 2001. – 37: 2. – P. 245-251.
7. Семенихин, А.Л. Микоплазмозы группы Mycooides: вопросы этиологии, диагностики и профилактики [текст] / А.Л. Семенихин, А.Н. Панин // Состояние, пробл. и перспективы развития вет. науки России. – М. – 1999. – Т.1. – С. 203-207.
8. Дорофеева, С. Респираторный микоплазмоз птицы и методы его предупреждения [текст] / С. Дорофеева // Ветеринария с.-х. животных. – 2008. – N 7. – С. 27-30.
9. Зяцькова, Е.Л. Изучение распространенности и антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм мелких домашних животных [текст] / Е.Л. Зяцькова [и др.] // Диагностика, лечение и профилактика болезней животных в условиях Сибири и Урала/ Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – Омск, 2008. – С. 133-138.
10. In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae* [text] / A.V. Gautier Bouchardon [et al] // Veter. Microbiol. – 2002. – 88: 1. – P. 47-58.
11. Valks, M., The use of antimicrobials against avian mycoplasma [text] / M. Valks, D.G.S. Burch // Int. Poultry Prod. – 2001. – 9: 7. – P. 17.
12. Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin [text] / W.A. Stanley [et al] // Avian Dis. – 2001. – Vol.45, N 2. – P. 534-539.

#### STUDY OF INFLUENCE OF VARIOUS BETA-LACTAMS CONCENTRATIONS ON REPRODUCTIVE PROPERTIES OF MYCOPLASMA GALLISEPTICUM AND CONCOMITANT BACTERIAL MICROFLORA

Obuhovska O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Under the laboratory conditions there were determined the concentrations of beta-lactams, which exhibit marked bactericidal effect on the representatives of the most widely used in poultry groups of bacterial pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus alvei*, *Proteus mirabilis*) and has no inhibitory effect on the reproductive properties of *Mycoplasma gallisepticum*.

It is shown that the optimal concentrations of tsefazolin and tsefataksima recommended for inclusion in the medium for transport of samples of biological material for research on avian Mycoplasmosis are 50,0-250,0 mkg/ml, subject to availability in the medium of penicillin (1000.0 mkg/ml).

УДК 619:616.98:578.825.15:636.2

#### МІНЛИВІСТЬ РЕПРОДУКТИВНОЇ ЗДАТНОСТІ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД УМОВ ЗБЕРІГАННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ

Пилипенко Г. В., Білокінь В. С., Кучерявенко Р. О., Кучерявенко Л. І., Кучерявенко Л. М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Інфекційний ринотрахеїт (ІРТ) – гостро перебігаюча хвороба великої рогатої худоби, яка характеризується катарально-некротичним ураженням респіраторних органів, лихоманкою, загальним пригніченням і кон'юнктивітом, розвитком пустульозного вильовоагініту або баланопоститу за ураження статевих органів й абортами [2].

Однією з біологічних особливостей герпесвірусів, а саме представників роду *Varicellavirus*, до якого відноситься збудник інфекційного ринотрахеїту, є здатність інфікувати широке коло природних хазяїв, у той же час представники підродин *Bethaherpesvirinae* і *Gammaherpesvirinae* проявляють обмежену хазяїно-тропність. Подібна закономірність встановлена й при вивченні спектра чутливих до вірусу культур клітин [1]. Вірус ІРТ репродукується у багатьох культурах клітин як перещеплюваних, так і первинних та органних [2]. Найчастіше для культивування вірусу ІРТ використовують перещеплювані культури клітин нирок ембріону корови, нирок, трахеї та тестікулів телят, нирок вівці [1-4]. Доведено, що штами вірусу ІРТ відрізняються один від одного за патогенністю для сприйнятливих тварин та культур клітин, деякі з них є патогенні для лабораторних тварин.