

УДК 619:579.887.111:636.5

**О. В. ОБУХОВСЬКА**, кандидат ветеринарних наук  
ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної  
медицини» (м. Харків)

### ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ БЕТА- ЛАКТАМІВ У СКЛАДІ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ *Mycoplasma gallisepticum*

Визначені оптимальні концентрації бета-лактамів, які не чинять інгібуючого впливу на репродуктивні властивості *Mycoplasma gallisepticum*, але володіють бактерицидними властивостями у відношенні до таких бактеріальних патогенів, як *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* та *Staphylococcus aureus*. Доведено, що за умов наявності в складі поживного середовища для мікоплазм пеніциліну в кількості 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>, оптимальні концентрації цефазоліну та цефатаксиму становлять 50,0-250,0 мкг/см<sup>3</sup>.

*Ключові слова:* *Mycoplasma gallisepticum*, бета-лактами, поживні середовища.

Респираторний мікоплазмоз – одне з найбільш поширених захворювань продуктивної та племінної птиці, яке спричиняє значні збитки за рахунок загибелі молодняка та втратою дорослою птицею своїх господарських якостей [1, 2, 3]. Підставою для встановлення остаточного діагнозу на це захворювання слугують результати бактеріологічних досліджень [4, 5, 6]. Однією з головних умов успішної та своєчасної діагностики є отримання проб біологічного матеріалу, які не контаміновані супутньою мікрофлорою. З цією метою до транспортних середовищ додають пеніцилін, тому що представники родини *Mycoplasmataceae* не чутливі до цього антибіотику [7, 8, 9]. Однак, інші бактеріальні патогени, що циркулюють серед птицепоголів'я одночасно із мікоплазмами є пеніцилінрезистентними. Тому на сьогоднішній день актуальним є напрямок щодо розробки транспортних середовищ, до складу яких входять більш ефективні антибактеріальні препарати.

Метою наших досліджень було визначення оптимальних концентрацій антибактеріальних препаратів, які інгібують ріст представників банальної мікрофлори, але не впливають на репродуктивні властивості *Mycoplasma gallisepticum*.

**Матеріали та методи.** В дослідях застосовували «Рідке поживне середовище для ізоляції та культивування мікоплазм від птиці» (ТУ У 24.4-00497087-091). З метою вивчення інгібуючої дії антибіотиків групи бета-лактамів на репродуктивні властивості мікоплазм до середовища додавали цефазолін та цефатаксим в концентраціях від 12,5 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>, до складу середовища входив пеніцилін (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>). В якості контролів застосовували середовище із пеніциліном (контроль 1), а також середовище без додавання антибіотиків (контроль 2).

В якості бактеріальних тест-культур використовували музейні штами *Escherichia coli* K 99, *Salmonella enteritidis* M, *Staphylococcus aureus* 209, *Proteus mirabilis* K. Культури мікроорганізмів інкубували на МПА (за t (37,5±0,5) °C впродовж 20 годин). Бакмасу змивали стерильним фізрозчином,

стандартизували за оптичним стандартом каламутності та вносили до поживних середовищ до отримання кінцевої концентрації  $5 \times 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>; культивували впродовж 5 діб за  $t$  ( $37,5 \pm 0,5$ ) °С. На 5-ту добу оцінювали наявність та інтенсивність росту візуально та шляхом мікроскопії мазків (фарбування за Грамом).

В якості тест-культури мікоплазм застосовували музейний штам *Mycoplasma gallisepticum* S<sub>6</sub>. 4-добову культуру вносили до пробірок із поживним середовищем в кількості  $5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup> та культивували впродовж 5 діб за  $t$  ( $37,5 \pm 0,5$ ) °С. На п'яту добу оцінювали наявність та інтенсивність росту візуально та шляхом мікроскопії мазків (фарбування за Романовським-Гімзе та шляхом фотокалориметрії (зелений світлофільтр, довжина хвилі 420-440 нм проти стерильного середовища).

**Результати досліджень.** Для проведення досліджень з групи бета-лактамів були відбрані цефалоспорини: цефазолін (препарат I-го покоління) та цефатаксим (препарат III-го покоління), як найбільш ефективні та доступні. На першому етапі ми підбрали мінімальні концентрації цефалоспринів, які пригнічують ріст бактеріальних культур. В досліді застосовували бактеріальні патогени в концентрації  $5 \times 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>, що в 2-2,5 рази перевищує аналогічний показник в польових умовах. Результати досліджень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

**Визначення мінімальних інгібуючих концентрацій цефалоспринів відносно бактеріальних культур.**

Маркування поживних середовищ	Концентрація антибіотиків			Наявність росту тест-культур в середовищі			
	Пеніциліна натрієва сіль, мкг/см <sup>3</sup>	Цефазолін, мкг/см <sup>3</sup>	Цефатаксим, мкг/см <sup>3</sup>	<i>Escherichia coli</i> K 99	<i>Salmonella enteritidis</i> M	<i>Staphylococcus aureus</i> 209	<i>Proteus mirabilis</i> K
Дослід 1.1	1000,0	12,5	0,0	+	+	+	+
Дослід 1.2	1000,0	25,0	0,0	-	-	-	-
Дослід 1.3	1000,0	50,0	0,0	-	-	-	-
Дослід 1.4	1000,0	100,0	0,0	-	-	-	-
Дослід 1.5	1000,0	500,0	0,0	-	-	-	-
Дослід 1.6	1000,0	1000,0	0,0	-	-	-	-
Дослід 1.7	1000,0	0,0	12,5	+	+	+	+
Дослід 1.8	1000,0	0,0	25,0	-	-	+	-
Дослід 1.9	1000,0	0,0	50,0	-	-	-	-
Дослід 1.10	1000,0	0,0	100,0	-	-	-	-
Дослід 1.11	1000,0	0,0	500,0	-	-	-	-
Дослід 1.12	1000,0	0,0	1000,0	-	-	-	-
Контроль 1	1000,0	0,0	0,0	+	+	+	+
Контроль 2	0,0	0,0	0,0	+	+	+	+

**Примітки:** -- відсутність росту; + - наявність росту.

Результати досліджень показали, що пеніцилін в концентрації 1000,0 мкг/см<sup>3</sup> не інгібує ріст бактеріальних тест-культур за умов їх первинної концентрації 5x10<sup>5</sup> КУО/см<sup>3</sup>. Цефазолін здійснює бактерицидну дію на всі тест-культури в концентраціях від 25,0 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>. Дія цефатаксиму аналогічна для всіх тест-культур за виключенням *S. aureus*, для цього патогену інгібуючою є концентрація від 50,0 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>.

У подальшому ми вивчали дію різних концентрацій цефазоліну та цефатаксиму на репродуктивні властивості мікоплазм (табл.2).

Таблиця 2

### Вивчення впливу цефалоспоринів на ріст мікоплазм

Маркування поживних середовищ	Концентрація антибіотиків			Наявність росту <i>M.galli-septicum</i> S <sub>6</sub>
	Пеніциліну натрієвасіль, мкг/см <sup>3</sup>	Цефазолін, мкг/см <sup>3</sup>	Цефатаксим, мкг/см <sup>3</sup>	
Дослід 2.1	0,0	12,5	0,0	+
Дослід 2.2	0,0	25,0	0,0	+
Дослід 2.3	0,0	50,0	0,0	+
Дослід 2.4	0,0	100,0	0,0	+
Дослід 2.5	0,0	250,0	0,0	+
Дослід 2.6	0,0	500,0	0,0	±
Дослід 2.7	0,0	1000,0	0,0	-
Дослід 2.8	0,0	0,0	12,5	+
Дослід 2.9	0,0	0,0	25,0	+
Дослід 2.10	0,0	0,0	50,0	+
Дослід 2.11	0,0	0,0	100,0	+
Дослід 2.12	0,0	0,0	250,0	+
Дослід 2.13	0,0	0,0	500,0	±
Дослід 2.14	0,0	0,0	1000,0	-
Контроль 1	1000,0	0,0	0,0	+
Контроль 2	0,0	0,0	0,0	+

**Примітки:** – відсутність росту; + наявність росту; ± незначний ріст

За візуальної оцінки результатів не виявлено суттєвої різниці між інтенсивністю росту мікоплазм в середовищах із концентраціями цефазоліну та цефатаксиму від 12,5 до 100,0 мкг/см<sup>3</sup>. Обидва препарати в концентрації 500,0 мкг/см<sup>3</sup> проявляли виражену інгібуючу дію на ріст збудника. За умов застосування цефалоспоринів в концентрації 1000,0 мкг/см<sup>3</sup> виявити ріст мікоплазм візуально та шляхом мікроскопії не вдалося.

При аналізі інтенсивності накопичення біомаси мікоплазм в середовищі шляхом фотокалориметрії було встановлено, що підвищення концентрації цефазоліну та цефатаксиму від 12,5 до 250,0 мкг/см<sup>3</sup> незначно знижує оптичну щільність середовища (від 2,6 до 4,2 %). Тоді як концентрація 500,0 мкг/см<sup>3</sup> значно зменшує цей показник (від 71,1 до 76,3 %), концентрація 1000,0 мкг/см<sup>3</sup> – на 99,6 та 99,8 % відповідно (Рис.1).

Враховуючи той факт, що до поживних культуральних та транспортних середовищ для мікоплазм додають пеніцилін ми провели додаткові досліді із додаванням до середовищ окрім цефалоспоринів і пеніциліну в стандартній концентрації (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>). Результати наведено в таблиці 3.

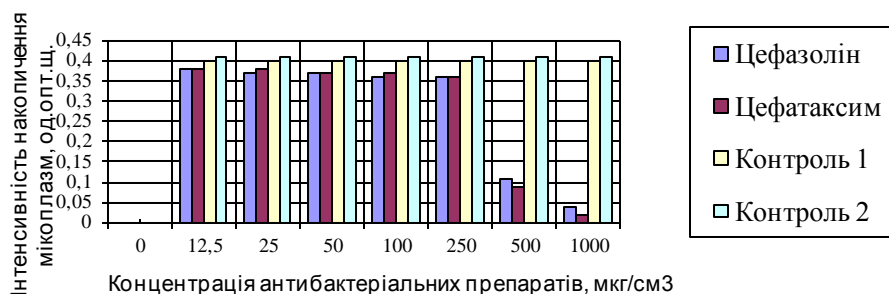


Рисунок 1 – Інтенсивність накопичення бактеріальної маси мікоплазм за різних концентрацій цефалоспоринів

Таблиця 3

Ріст мікоплазм в середовищі із цефазоліном, цефатаксимом та пеніциліном.

Маркування поживних середовищ	Концентрація антибіотиків			Наявність росту <i>M.galli-septicum</i> S <sub>6</sub>
	Пеніциліна натрієва сіль, мкг/см <sup>3</sup>	Цефазолін, мкг/см <sup>3</sup>	Цефатаксим, мкг/см <sup>3</sup>	
Дослід 3.1	1000,0	12,5	0,0	+
Дослід 3.2	1000,0	25,0	0,0	+
Дослід 3.3	1000,0	50,0	0,0	+
Дослід 3.4	1000,0	100,0	0,0	+
Дослід 3.5	1000,0	250,0	0,0	+
Дослід 3.6	1000,0	500,0	0,0	-
Дослід 3.7	1000,0	1000,0	0,0	-
Дослід 3.8	1000,0	0,0	12,5	+
Дослід 3.9	1000,0	0,0	25,0	+
Дослід 3.10	1000,0	0,0	50,0	+
Дослід 3.11	1000,0	0,0	100,0	+
Дослід 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	+

**Примітки:** - відсутність росту; + наявність росту

Як видно з даних таблиці 3 наявність в середовищі пеніциліну (1000 мкг/см<sup>3</sup>) та цефазоліну (від 12,5 до 500,0 мкг/см<sup>3</sup>) не здійснює вираженого інгібуючого впливу на інтенсивність репродукції *M.gallisepticum* S<sub>6</sub>. Підвищення концентрації цефазоліну до 500,0 та 1000,0 мкг/см<sup>3</sup> інгибує ріст мікоплазм. Аналогічні дані отримані й для цефатаксиму.

Як показано на рис. 2 інтенсивність накопичення мікоплазм в поживному середовищі в присутності цефазоліну та цефатаксиму в концентраціях від 12,5 до 250,0 мкг/см<sup>3</sup> за умов наявності пеніциліну (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>) практично не змінюється у порівнянні із контролями (знижується на 0,04 та 0,06 од.опт.щ. відповідно). Наявність цих препаратів в концентрації 500 мкг/см<sup>3</sup> та вище не пригнічує ріст мікоплазм повністю, але інтенсивність накопичення біомаси в

середовищі настільки незначна (0,08 та 0,02 од.опт.щ.), що робить подальше проведення діагностичних досліджень практично неможливим.

Таким чином, нами встановлені граничні концентрації цефалоспоринів I-го та III-го покоління, які самостійно або сумісно із пеніциліном можуть бути застосовані в складі поживних середовищ для транспортування проб біологічного матеріалу при проведенні діагностичних досліджень на респіраторний мікоплазмоз.

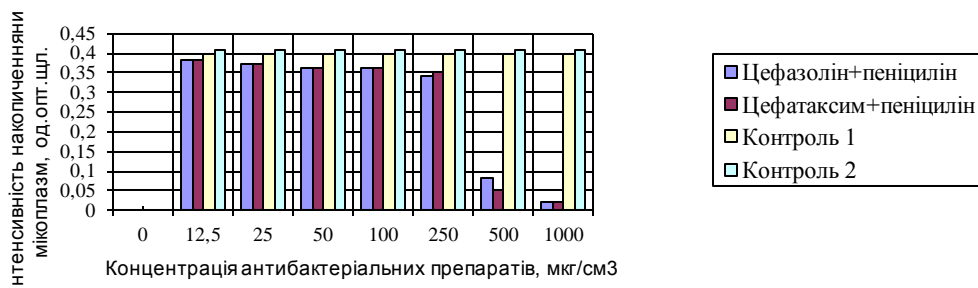


Рисунок 2 – Інтенсивність накопичення бактеріальної маси мікоплазм за різних концентрацій цефалоспоринів та пеніциліну.

**Висновки.** 1. Встановлено, що цефазолін та цефатаксим (в концентраціях від 50 до 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>) за умов введення їх в поживні середовища проявляють виражену бактерицидну дію на найбільш широко розповсюджені в птахівництві бактеріальні паогени (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*).

2. Цефалоспоринони в концентрації від 12,5 до 250,0 мкг/см<sup>3</sup> не чинять інгібуючої дії на репродуктивні властивості *Mycoplasma gallisepticum* за умов наявності в середовищі пеніциліну (1000,0 мкг/см<sup>3</sup>).

3. Оптимальні концентрації бета-лактамів, які рекомендовані для внесення в транспортні середовища для діагностики респіраторного мікоплазмозу, становлять для цефазоліну та цефатаксиму 50,0-250,0 мкг/см<sup>3</sup>, для пеніциліну - 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>.

1. Епанова, Е. Л. Респіраторний мікоплазмоз в господарствах м'ясоного птицеводства АР Крим [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 all]// J. Wildlife Dis.- 2001.- 37: 1.- 82-88.

3. Current respiratory disease problem and the probes in chicken [text]/ S. Hasan [et all]// Pakistan Veterinary Journal.- 2002.- 22: 1.-P.17-20.

4. Damages caused on broiler chickens by the induced action of *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli* [text]/ O.D. Rodrigues [et all]// Revista Brasileira de Medicina Veterinaria.- 2001.- 23: 6.-P.240-243.

5. Diagnosis and treatment of conjunctivitis in house finches associated with mycoplasmosis in Minnesota [text]/ J.F.X. Wellehan [et all]// J. Wildlife Dis.- 2001.- 37: 2.- P.245-251.

6. Семенихин, А. Л. Микоплазмы группы *Mycoides*: 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

7. 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 all]// Veter. Microbiol.- 2002.- 88: 1.- P.47-58.

8. Valks M., The use of antimicrobials against avian mycoplasma [text]/ M. Valks, D. G.S. Burch// Int. Poultry Prod. -2001.- 9: 7.-P.17.

9. Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin [text]/ W.A. Stanley [et all]// Avian Dis.- 2001.- Vol.45,N 2. - P. 534-539.

### **ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БЕТА-ЛАКТАМОВ В СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* / О. В. Обуховская**

*Определены оптимальные концентрации бета-лактамов, которые не проявляют ингибирующего действия на репродуктивные свойства *Mycoplasma gallisepticum*, но обладают бактерицидными свойствами по отношению к таким бактериальным патогенам, как *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus aureus*. Доказано, что при условии наличия в составе питательной среды для микоплазм пенициллина в количестве 1000,0 мкг/см<sup>3</sup>, оптимальные концентрации цефазолина и цефатаксима составляют 50,0-250,0 мкг/см<sup>3</sup>.*

*Ключевые слова: *Mycoplasma gallisepticum*, бета-лактамы, питательные среды.*

### **THE STUDY OF INFLUENCE OF VARIOUS BETA-LACTAMS CONCENTRATIONS TO *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* AND CONCOMITANT BACTERIAL MICROFLORA REPRODUCTION PROPERTIES/ О. Obukhovska**

*The optimal concentration of beta-lactams, which does not show inhibitory effect on the reproductive properties of *Mycoplasma gallisepticum*, but have antibacterial properties against such as bacterial pathogens like *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus*. It is proved that, subject to availability in the nutrient medium for *Mycoplasma penicillin* in the amount of 1000.0 mg/sm<sup>3</sup>, optimal concentrations of cefazolin and cefataksim are 50,0-250,0 mg/sm<sup>3</sup>.*

*Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, beta-lactams, growth media.*

**Рецензент** – кандидат ветеринарных наук **О. С. Айшпур.**