

185-186 . 4. Зорин, В.Л., Краткие ветеринарные консультации [Текст]/ В.Л. Зорин, А.И.Зорина —М.: Аквариум ЛТД, 1999. — С. 9-20. 5. Инфекционные болезни животных [Текст]: справочник/ Ю.Ф. Борисович, Л.В. Кириллов; Под общ. ред. Д.Ф.Осидзе. — М.: Агропромиздат, 1987. — 288 с. 6. Игнатов, П. Очерки об инфекционных болезнях собак [Текст]/ П. Игнатов. — М.: Мир, 1995. — С. 48-59. 7. Лабинская, А.С. Практическое руководство по микробиологическим методам исследования [Текст]/ А.С. Лабинская. — М.: Гос. Из-во мед. литературы, 1963. — 463 с. 8. Лабораторные исследования в ветеринарии [Текст] / Под ред. В.Я. Антонова и П.Н. Блинова. — М.: Колос, 1974. — 320 с. 9. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции [Текст]: справочник/ Под ред В.Я.Антонова и П.Н.Блинова. — М.: Колос, 1971. — 648 с. 10. Максимов, Н.А. Клинические признаки и результаты бактериологических исследований при пиодерматитах собак [Текст]/ Н.А. Максимов, С.И. Лебедево, А.И. Албулов, С.М. Шинкарев//11-ый Моск.междунар.вет.конгресс: Мат-лы (17-19.04.03 г., М.). — М., 2003. — С. 14-15. 11. Медицинская микробиология [Текст]/ Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. — М.: Гостар медицина, 1999. — 1200 с. 12. Ниманд, Х.Г. Болезни собак [Текст]: Пер. с нем./Х.Г. Ниманд, П.Б.Сутер. — М.: Аквариум ЛТД, 2001. — С. 271-284. 13. Определитель бактерий Берджи [Текст]: пер.с англ./ Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. — М.: Мир, 1997. — 432 с. 14. Патерсон, С. Кожные болезни собак [Текст]: пер.с англ./ Под ред Е. Осипова. — М.: Аквариум, 2003. — 176 с. 15. Правила відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для лабораторного дослідження (Затверджене начальником Головного управління ветеринарної медицини України 15 квітня 1997 р., № 15-14, 111). 16. Тамошкин, Д.А., Антибиотикотерапия в ветеринарии [Текст]/ Д.А. Тамошкин, В.В. Сотников, М.В. Сотников// I-а міжнар. Нук.-прак.конф. з проблем дрібних тварин: Мат-ли (29-31.05.02 р.,Одеса). — Одесса, 2002. — С. 157-162.

**SELECTION OF THE PERSPECTIVE PRODUCTIVE STAPHYLOCOCCUS CULTURE FOR MANUFACTURING OF THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC PREPARATIONS AGAINST DOG STAPHYLOCOCCAL PYODERMIA**

**Obuhovska O.V., Keleberda N.I., Obuhovsky J.M., Petrenchuk E.P., Glebova K.V., Kuznetsov E.P.**

*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv*

*The spectrum of bacterial microflora in samples of biological material from 123 dogs with the typical clinical signs of purulent pyoderma is studied.*

УДК 619:579.887.111:616-078:636.2

**ВИВЧЕННЯ ІНГІБУЮЧОГО ВПЛИВУ БЕТА-ЛАКТАМІВ НА МІКРООРГАНІЗМИ ТА МІКОПЛАЗМИ  
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ СЕРЕДОВИЩ  
ДЛЯ ТРАНСПОРТУВАННЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ**

**Орлов С.М., Обуховська О.В., Глебова К.В.**

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

Останнім часом в Україні та інших країнах СНД близько чверті досліджуваної великої рогатої худоби є мікоплазманосіями (від 3,5 до 34,4 %), за умов дії стрес-факторів (порушення умов годівлі та утримання тварин) така форма перебігу інфекції ускладнюється вірусною або бактеріальною мікрофлорою. В таких випадках реєструють нетипову клінічну картину, що значно ускладнює первинну діагностику і призводить до помилкових рішень у призначенні терапевтичних заходів. Все це спричиняє зниження продуктивності, безпліддя і, як наслідок, передчасну вибраковку тварин [1, 2, 3].

Особливості будови клітини мікоплазм, відсутність клітинної стінки, зумовлюють низький рівень життєздатності цих мікроорганізмів у зовнішньому середовищі. Особливу проблему складає процес зберігання збудника в пробах патологічного матеріалу, який доставляється до діагностичного закладу [4, 5]. За умов відсутності загиблих тварин у великої рогатої худоби (ВРХ), до лабораторії надсилають мазки (або зскрібки) з слизових оболонок носоглотки або піхви. При цьому значно підвищується ймовірність контамінації проб банальною мікрофлорою [6]. Запропоновані раніше бактеріальні та грибові інгібітори в середовищах для культивування мікоплазм мають не дуже велику бактеріцидну активність, а деякі з них не виготовляють вітчизняні біопідприємства. Вирішення проблеми полягає у розробці спеціального транспортного середовища і підготовки проб патологічного матеріалу при дослідженні на мікоплазмоз ВРХ.

З цією метою було проведено порівняльне вивчення інгібуючої концентрації бета-лактамів (цефалоспоринів і пеніциліну) на мікоплазми ВРХ і тест-штами мікроорганізмів при застосуванні середовищ для транспортування біологічного матеріалу (СТБМ).

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили у 2 етапи. За першим етапом для вивчення інгібуючої концентрації цефалоспоринів і пеніциліну на тест-штами мікроорганізмів застосовували 13 СТБМ: № 1 – Хоттінгеру перевар з додаванням пеніциліну 1000 ОД на см<sup>3</sup> середовища; № 2-4 – Хоттінгеру перевар із додаванням цефазоліну в різних концентраціях 12,5; 25; 50 мкг/см<sup>3</sup> відповідно; № 6-8 – Хоттінгеру перевар із додаванням цефотаксиму (12,5; 25; 50 мкг/см<sup>3</sup>) відповідно; № 10-12 – рідкі живильні середовища (РЖС) із додаванням пеніциліну (1000 ОД/см<sup>3</sup>) і цефазоліну (12,5; 25; 50 мкг/см<sup>3</sup>) відповідно; № 17-19 – РЖС із додаванням пеніциліну та цефотаксиму (12,5; 25; 50 мкг/см<sup>3</sup>) відповідно.

В якості основи для рідких живильних середовищ використовували середовище ННЦ «ІЕКВМ» [7] і Хоттінгеру перевар основний (із додаванням 20 % сироватки крові коня, 8 % дріжджового екстракту, 0,5 % глюкози) для ізоляції мікоплазм [8].

Визначали інгібуючу концентрацію бета-лактамів, яка не пригнічує росту культур мікроорганізмів в концентраціях 5 x 10<sup>4</sup>, 10 x 10<sup>4</sup>, 20 x 10<sup>4</sup> і 50 x 10<sup>4</sup> м. к./см<sup>3</sup>. Для цього використовували музейні штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* 209, *Escherichia coli* K99, *Bacillus alvei* 5, *Proteus mirabilis* K.

Інкубували посіви з середовищами впродовж 1-ї доби за температури (37,0±0,5)°С, за яким проводили посіви на МПА. Результати досліджень враховували за відсутністю росту культури на досліджуваних середовищах. Мікроскопію мазків проводили після фарбування за Грамом.

За другим етапом для вивчення інгібуючої концентрації цефалоспоринів і пеніциліну на культури мікоплазм застосовували вищевказані 12 СТБМ (№№ 2-4, 6-8, 10-12, 17-19). Додатково використовували 10 СТБМ із додаванням більшої концентрації цефалоспоринів: № 5 – Хоттінгеру перевар із додаванням цефазоліну в концентрації 100 мкг/см<sup>3</sup>; № 9 – Хоттінгеру перевар із цефотаксимумом (100 мкг/см<sup>3</sup>); № 13-16 – РЖС із додаванням пеніциліну (1000 ОД/см<sup>3</sup>) і цефазоліну (100; 250; 500 і 1000 мкг/см<sup>3</sup>) відповідно; № 20-23 – РЖС із пеніциліном та цефотаксимумом (100; 250; 500; 1000 мкг/см<sup>3</sup>) відповідно. Контролем були: СТБМ № 1 із пеніциліном – контроль 1 і середовище без антибіотиків – контроль 2.

Визначали інгібуючу концентрацію антибіотиків, яка не пригнічує ріст культур мікоплазм в концентрації 10<sup>5</sup> м. к./см<sup>3</sup>. Для досліджень застосовували 5 польових ізолятів мікоплазм від ВРХ і музейні штами *Mycoplasma bovis* PG 45, *M. arginini* G 230 і *M. gallisepticum* S<sub>6</sub>.

Середовища інкубували впродовж 1-ї доби за температури (37,0±0,5)°С. Потім суспензію мікоплазм в об'ємі 0,5 см<sup>3</sup> перенесли до пробірок із діагностичним живильним середовищем для ізоляції мікоплазм. Режим інкубування посівів – 5 діб за температури (37,0±0,5)°С, за яким проводили 2-3 пасажі. Контроль інтенсивності росту культур перевіряли кожен добу візуально. Мікроскопію мазків проводили після фарбування за Романовським-Гімза та Грамом.

**Результати досліджень.** Результати визначення інгібуючої дії пеніциліну на тест-штами мікроорганізмів в концентраціях від  $5 \times 10^4$  до  $50 \times 10^4$  м. к./см<sup>3</sup> в СТБМ № 1 наведено у таблиці 1.

**Таблиця 1** – Визначення інгібуючого впливу пеніциліну на музейні штами мікроорганізмів в середовищі для транспортування біологічного матеріалу

Культура	Концентрація (м. к./см <sup>3</sup> ) культури	Інгібуюча дія пеніциліну на культуру в СТБМ №1	Контроль (СТБМ без антибіотику)
<i>S. aureus</i> 209	$5 \times 10^4$	+	-
	$10 \times 10^4$	+	-
	$20 \times 10^4$	+	-
	$50 \times 10^4$	- <sup>**</sup>	-
<i>E. coli</i> K99	$5 \times 10^4$	+	-
	$10 \times 10^4$	+	-
	$20 \times 10^4$	+	-
	$50 \times 10^4$	-	-
<i>B. alvei</i> 5	$5 \times 10^4$	+	-
	$10 \times 10^4$	+	-
	$20 \times 10^4$	+	-
	$50 \times 10^4$	-	-
<i>P. mirabilis</i> K	$5 \times 10^4$	+	-
	$10 \times 10^4$	+	-
	$20 \times 10^4$	+	-
	$50 \times 10^4$	-	-

**Примітки:** <sup>+</sup> (+) інгібувannya культури; <sup>\*\*</sup> (-) ріст культури.

Музейні штами мікроорганізмів (*S. aureus* 209, *E. coli* K99, *B. alvei* 5, *P. mirabilis* K) в концентраціях від  $5 \times 10^4$  до  $20 \times 10^4$  м. к./см<sup>3</sup> виявилися чутливими до пеніциліну (1000 ОД/ см<sup>3</sup>) при застосуванні СТБМ № 1, а при наступному посіві на МПА спостерігали ріст культур. У більшій концентрації  $50 \times 10^4$  м. к./см<sup>3</sup> всі культури були стійкими до дії антибіотику.

Результати визначення інгібуючої дії цефалоспоринових на музейні штами мікроорганізмів (кінцева концентрація  $5 \times 10^4$  м. к./см<sup>3</sup>) і на культуру *S. aureus* 209 в більших концентраціях в СТБМ наведено у таблицях 2 і 3.

**Таблиця 2** – Визначення концентрації інгібіторів цефалоспоринового ряду на тест-штами мікроорганізмів у СТБМ

Культура	Інгібуюча дія цефалоспоринових на культуру в СТБМ <sup>*</sup>						Контроль (СТБМ без антибіотику)
	2	3	4	6	7	8	
<i>S. aureus</i> 209	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i> K99	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. alvei</i> 5	-	+	+	-	-	+	-
<i>P. mirabilis</i> K	+	+	+	+	+	+	-

**Примітка:** <sup>\*</sup> склад середовищ у цій і наступних таблицях наведено в матеріалах і методах.

При застосуванні СТБМ № 2-4 і № 6-8 із додаванням цефазоліну або цефотаксиму в концентраціях 12,5-50 мкг/см<sup>3</sup> чутливішими були мікроорганізми *S. aureus* 209, *E. coli* K99 і *P. mirabilis* K. Щодо культури *B. alvei* 5, то встановлена інгібуюча дія цефазоліну тільки в концентраціях 25-50 мкг/см<sup>3</sup> і цефотаксиму – 50 мкг/см<sup>3</sup>.

**Таблиця 3** – Визначення інгібуючого впливу цефалоспоринових на різні концентрації культури *Staphylococcus aureus* 209 в СТБМ

Концентрація (м. к./см <sup>3</sup> ) культури	Інгібуюча дія цефалоспоринових на культуру в СТБМ						Контроль (СТБМ без антибіотику)
	2	3	4	6	7	8	
$10 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	-
$20 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	-
$50 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	-

Культура *S. aureus* 209 в концентраціях від  $10 \times 10^4$  до  $50 \times 10^4$  м. к./см<sup>3</sup> у СТБМ № 2-4 і № 6-8 виявилася чутливою до дії цефалоспоринових.

Результати визначення інгібуючої дії бета-лактамів відносно тест-штамів мікроорганізмів у СТБМ наведено у таблиці 4.

**Таблиця 4** – Визначення інгібуючого впливу бета-лактамів на тест-штами мікроорганізмів у СТБМ

Культура в концентрації $5 \times 10^4$ м. к./см <sup>3</sup>	Інгібуюча дія цефалоспоринових і пеніциліну на культуру в СТБМ						Контроль (СТБМ без антибіотику)
	10	11	12	17	18	19	
<i>S. aureus</i> 209	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i> K99	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. alvei</i> 5	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. mirabilis</i> K	+	+	+	+	+	+	-

### Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія

Таким чином, всі культури мікроорганізмів виявилися чутливими до цефазоліну або цефотаксиму (концентрації 12,5-50 мкг/см<sup>3</sup>) разом з пеніциліном при застосуванні СТБМ №№ 10-12, 17-19 і після інкубації посівів впродовж 1-ї доби за температури (37,0±0,5)°С.

Результати визначення інгібуючої дії цефалоспоринів і пеніциліну на культури польових ізолятів і музейних штамів мікоплазм (концентрація 10<sup>5</sup> м. к./см<sup>3</sup>) в СТБМ наведено у таблицях 5 і 6.

**Таблиця 5** - Визначення інгібуючого впливу цефалоспоринів на культури мікоплазм в СТБМ

Культура мікоплазм	Інгібуюча дія цефалоспоринів на культури в СТБМ								Контроль 2
	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ізолят № 1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ізолят № 1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ізолят № 2-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ізолят № 3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ізолят № 4-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. bovis</i> PG 45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. arginini</i> G 230	-	-	-	-	-	-	-	-	-

В СТБМ № 2-9 (без пеніциліну) із застосуванням однодобової інкубації посівів всі культури мікоплазм були нечутливими до дії цефазоліну або цефотаксиму в концентраціях від 12,5 до 100 мкг/см<sup>3</sup>. При подальших 2-3-х пасажах на діагностичні середовища виявили ріст досліджуваних культур мікоплазм у вигляді легкої опалесценції із формуванням незначного осаду. Після фарбування за Романовським-Гімза при мікроскопії мазків спостерігали дрібні поліморфні коко-овоїдоподібні тільця (0,2-0,5) нм рожево-фіолетового кольору, розташованих поодинокі, у вигляді невеликих скупчень та ниткоподібних форм.

**Таблиця 6** – Визначення інгібуючої концентрації бета-лактамів на культури мікоплазм в СТБМ

Культура мікоплазм	Інгібуюча дія цефалоспоринів і пеніциліну на культури в СТБМ							Контролі 1 і 2
	10 і 17	11 і 18	12 і 19	13 і 20	14 і 21	15 і 22	16 і 23	
Ізолят № 1-4	-	-	-	-	-	+	+	-
Ізолят № 1-5	-	-	-	-	-	+	+	-
Ізолят № 2-6	-	-	-	-	-	+	+	-
Ізолят № 3-2	-	-	-	-	-	+	+	-
Ізолят № 4-3	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>M. bovis</i> PG 45	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>M. arginini</i> G 230	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>M. gallisepticum</i> S <sub>6</sub>	-	-	-	-	-	+	+	-

У досліді щодо визначення оптимальної концентрації антибіотиків цефалоспоринового ряду при застосуванні СТБМ № 10-14 і 17-21 показало, що концентрації цефазоліну або цефотаксиму (12,5-250 мкг/см<sup>3</sup>) одночасно з пеніциліном (1000 ОД/см<sup>3</sup>) не пригнічує росту досліджуваних культур мікоплазм. При подальших пасажах на діагностичні живильні середовища, як і в контрольних пробірках з СТБМ із пеніциліном і без додавання антибіотиків, на 4-5-у добу виявили ріст культур мікоплазм. При мікроскопії мазків спостерігали мікоплазми.

Не виділили зазначених культур мікоплазм в СТБМ №№15-16, 22-23 із додаванням цефазоліну або цефотаксиму в більшій концентрації 500-1000 мкг/см<sup>3</sup>. У наступних 3-х пасажах на РЖС мікоплазм також не спостерігали.

Таким чином, СТБМ на основі середовищ ННЦ «ІЕКВМ» і Хоттінгера для ізоляції мікоплазм із додаванням цефалоспоринів в оптимальній концентрації 50 мкг/см<sup>3</sup> і пеніциліну можна рекомендувати для використання.

**Висновки.** 1. Не виявлено інгібуючого впливу цефазоліну або цефотаксиму в концентраціях від 12,5 до 250 мкг/см<sup>3</sup> на культури мікоплазм великої рогатої худоби за умов використання різних середовищ для транспортування біологічного матеріалу і однодобової інкубації проби.

2. Встановлено, що найбільш ефективним щодо ізоляції мікоплазм великої рогатої худоби було застосування середовищ для транспортування біологічного матеріалу із додаванням цефалоспоринів (50 мкг/см<sup>3</sup>) і пеніциліну (1000 ОД/см<sup>3</sup>).

3. Тест-штами мікроорганізмів проявляють найбільшу чутливість до одночасного застосування бета-лактамів.

#### Список літератури

- Чечеткіна, Н.П. Диагностика и система лечебно-профилактических мероприятий при смешанных инфекциях крупного рогатого скота вирус-бактериальной этиологии [Текст] // Н.П. Чечеткіна, М.П. Павленко, С.Н. Орлов и др. / Міжвід. темат. наук. зб.: Вет. медицина. – 2008. – № 91. – С. 494-501.
- Вологодская, О.В. Ассоциативный уrogenитальный микоплазмоз крупного рогатого скота (диагностика и лечение) / О.В. Вологодская. - Автореф. дисс...канд. вет. наук. – Омск, 2006. – 20 с.
- Смирнова, Л.И. Выделение и дифференциация уrogenитальных микоплазм от крупного рогатого скота [Текст] // Л.И. Смирнова, К.В. Племяшов, Л.В. Темникова / Ветеринария. – 2008. – № 8. – С. 9-10.
- Коромыслов, Г.Ф. Микоплазмозы в патологии животных [Текст] / Г.Ф. Коромыслов, Я. Месарош, Л. Штилкович. – М.: ВО Агропромиздат, 1987. – 304 с.
- Прозоровский, С.В. Медицинская микоплазмология [Текст] / С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфвич. - М.: Медицина, 1995. – 310 с.
- Орлов, С.М. Прижиттєва діагностика микоплазмозу великої рогатої худоби із застосуванням різних схем підготовки проб патологічного матеріалу [Текст] // С.М. Орлов, О.В. Обуховська, К.В. Глебова / Міжвід. темат. наук. зб.: Вет. медицина. – 2009. – № 92. – С. 389-394.
- Стегній, Б.Т. Диагностика микоплазмозів птиці (методичні рекомендації) [Текст] / Б.Т. Стегній, В.В. Кіприч, О.В. Обуховська та інш. – Харків, 2008. – 29 с.
- Ветеринарні імунобіологічні препарати: довідник / За заг. ред. П.І. Вербицького, А.М. Головка. – К.: Реферат, 2004. – 400с.

#### STUDY OF INGIBITING INFLUENCE OF BETA-LACTAMS ON MICROORGANISMS AND MYCOPLASMA OF CATTLE IN THE APPLICATION FOR TRANSPORTATION OF BIOLOGICAL MATERIAL

**Orlov S.N., Obuhovska O.V., Glebova K.V.**

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

*It is proved that the most effective for isolation of mycoplasma in cattle was the use for transportation of biological material with the addition of cephalosporins (50 mkg/sm<sup>3</sup>) and penicillin (1000 OD/sm<sup>3</sup>).*

*Test strains of microorganisms are most sensitive to the simultaneous use of beta-lactams.*