

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/см³ при условии наличия пенициллина (1000,0 мкг/см³) 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/см³ 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/см³ 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/см³ не оказывает ингибирующего влияния на репродуктивные свойства *Mycoplasma gallisepticum* при условии наличия в среде пенициллина (1000,0 мкг/см³).

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/см³, для пенициллина – 1000,0 мкг/см³.

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 решении 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. – Х., 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 *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.
8. Дорофеева, С. Респираторный микоплазмоз птицы и методы его предупреждения [текст] / С. Дорофеева // Ветеринария с.-х. животных. – 2008. – N 7. – С. 27-30.
9. Зяткова, Е.Л. Изучение распространенности и антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм мелких домашних животных [текст] / Е.Л. Зяткова [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 вульвовагініту 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.

Також встановлено, що серологічно ідентичні віруси мають хімічно відмінну поверхневу структуру, кожен штам має характерну електрофоретичну рухливість [3].

Основним методом діагностики, який рекомендований МЕБ для контролю благополуччя поголів'я великої рогатої худоби, є імуноферментний аналіз. На цей час зусиллями багатьох дослідників запропоновані методичні прийоми щодо виготовлення антигенів та кон'югатів для ІФА, активність і специфічність яких залежить від ряду факторів, у тому числі репродуктивних властивостей вірусу та умов довгострокового його збереження. З врахування зазначеного у порівняльному аспекті проведені дослідження з вивчення інфекційності та репродуктивної здатності різних штамів вірусу ІРТ, що довгочасно підтримувались у замороженому стані та за культивування у ряді культур клітин.

Матеріали та методи. З метою відбору штаму вірусу інфекційного ринотрахеїту ВРХ, придатного для виготовлення антигену для постановки реакції ІФА, нами проведені дослідження на моделі 5-ти референтних штамів герпесвірусу 1-го серотипу – збудника інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, що зберігаються у замороженому стані у колекції лабораторії вірусології, зокрема ТК-ВІЕВ (термін зберігання – 19 років), Урал (31 рік), Оренбург (26 років), Монорин (9 років), 468 (2 роки), та виробничого штаму Молдавський, який постійно підтримується за серійних пересівів у культурі клітин.

Культивування штамів здійснювали у культуральних флаконах у стаціонарних умовах та у ролерних бутлях. Визначення інфекційної активності вірусу здійснювали у моношарових культурах клітин СНЕВ, НВ, ВНК-21. Титр інфекційності визначали за методикою Ріда й Менча і виражали у логарифмах 50 % тканинних цитопатогенних доз ($\lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$).

Результати досліджень. Вихідна інфекційна активність штаму ТК-ВІЕВ-В2, репродукованого у культурі клітин НТ-80 (нирки теляти), складала $5,5\text{--}6,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ [5]. За результатами дослідів, проведених з інтервалом 4 роки, активність штаму ТК-ВІЕВ у моношаровій культурі клітин ТрТ (трахеї теляти), що зберігався у замороженому стані за температури мінус 40 °С, була $6,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, а за культивування цього ж штаму у культурі НТ у ролерних бутлях – $1,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. При зберіганні за температури мінус 40 °С впродовж 13 років біологічні властивості штаму Урал не змінювались, а штамів ТК-ВІЕВ і Оренбург лише впродовж 4 та 8 років. Штами Молдавський та Оренбург після 9 та 18 років збереження відповідно у стані замороженої культуральної суспензії втратили цитопатогенні властивості, тоді як ліофілізовані зберегли репродуктивну здатність. В подальшому, через 14 наступних років, інфекційна активність штаму ТК-ВІЕВ складала $7,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, а штаму Молдавський $7,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ [6]. За електронно-мікроскопічного дослідження, проведеного після трирічного збереження зразків вірусу ІРТ консервованих за температури мінус 196 °С, було виявлено вірусні частки з незначними ушкодженнями суперкапсидної оболонки разом з великою кількістю цільних віріонів. При вивченні імунобіологічних властивостей вірусів встановлено, що вони зберігають антигенні властивості. Зокрема, титр специфічних противірусних антитіл у сироватці крові тварин, імунізованих вірусом ІРТ, штам Молдавський, консервованим в умовах від мінус 18 °С до мінус 30 °С, склав $5,2 \pm 0,13 \log_2$, у порівнянні з $7,4 \pm 0,17 \log_2$ в імунізованих вірусом який не піддавали заморожуванню, а для штаму Монорин ці значення відповідали $4,3 \pm 0,21 \log_2$ і $6,1 \pm 0,13 \log_2$.

Як свідчать результати дослідів, з підвищенням кількості пасажів вірусу в культурах клітин швидкість прояву ЦПД та інфекційна активність змінювались у залежності від штаму, термінів зберігання у замороженому стані та умов культивування. Інфекційність штаму Молдавський вірусу ІРТ, який постійно підтримується за культивування в культурах перещеплюваних клітин з метою напрацювання вихідної вірусомішучої сировини для виготовлення вакцин, знаходиться у межах $8,0\text{--}8,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. Зберігання впродовж 25 років культуральної суспензії штаму ТК-ВІЕВ, без стабілізаторів у замороженому стані негативно вплинуло на його репродуктивну здатність. Інфекційність його після відновлення із замороженого стану, не перевищувала $3,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ впродовж трьох наступних пасажів. Напроти, штам Урал і Монорин після 30- і 18-річного зберігання у замороженому стані репродукувались у перещеплюваних культурах клітин з інфекційністю від $6,0$ до $8,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, причому, у пасажах їх титр зростав на $1,0\text{--}1,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$.

За титру накопичення вірусу більш чутливими виявились культури клітин КСТ, НВ-2 і ВНК-21. Культура перещеплюваних клітин СНЕВ менш чутлива до вірусу ІРТ, про що свідчать результати з культивування штамів. Так, інфекційність штамів Молдавський, Урал та Монорин знизилась на $0,3\text{--}1,6 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, а титр активності штамів 468, Оренбург, ТК-ВІЕВ у культурі СНЕВ був найнижчим і становив $1,0\text{--}2,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ (таблиця 1).

Таблиця 1 – Вивчення репродуктивної здатності штамів герпесвірусу 1 серотипу в культурах клітин, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, n=3

Штам вірусу ІРТ	Культура клітин	1 пасаж	2 пасаж	3 пасаж	Ролерне культивування
1	2	3	4	5	6
Молдавський	КСТ	$8,33 \pm 0,23$	-	-	-
	НВ-2	$7,5 \pm 0,18$	$8,02 \pm 0,23$	$8,55 \pm 0,24$	-
	ВНК-21	$8,77 \pm 0,25$	$8,67 \pm 0,24$	$8,5 \pm 0,23$	-
	СНЕВ	$8,0 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$	-	-
Урал	КСТ	$7,67 \pm 0,23$	-	-	-
	НВ-2	$6,67 \pm 0,26$	$7,78 \pm 0,25$	$8,3 \pm 0,24$	-
	ВНК-21	$7,5 \pm 0,25$	$7,67 \pm 0,27$	$7,67 \pm 0,23$	$9,33 \pm 0,45$
	СНЕВ	$6,54 \pm 0,23$	$7,23 \pm 0,27$	-	-
ТК-ВІЕВ	КСТ	$3,0 \pm 0,07$	-	-	-
	НВ-2	$1,75 \pm 0,08$	$1,5 \pm 0,06$	$2,5 \pm 0,04$	-
	ВНК-21	$1,33 \pm 0,07$	$1,83 \pm 0,07$	$2,36 \pm 0,07$	-
	СНЕВ	менше 1,0	менше 1,0	-	-
Монорин	КСТ	$6,67 \pm 0,26$	-	-	-
	НВ-2	$7,33 \pm 0,26$	$7,5 \pm 0,24$	$8,0 \pm 0,28$	-
	ВНК-21	$7,0 \pm 0,26$	$7,23 \pm 0,26$	$7,0 \pm 0,26$	$8,5 \pm 0,31$
	СНЕВ	$5,33 \pm 0,18$	$5,0 \pm 0,19$	-	-

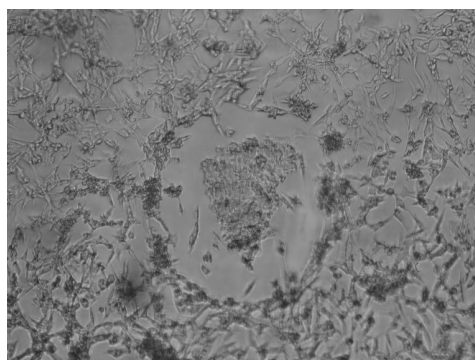
Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

Продовження табл. 1

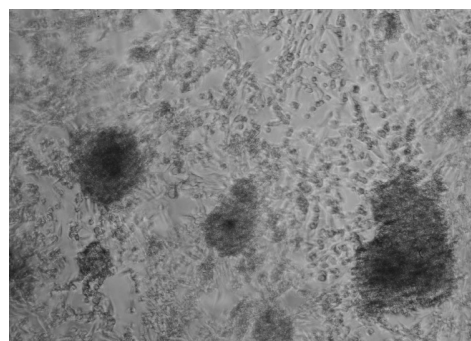
1	2	3	4	5	6
Оренбург	КСТ	2,0±0,18	-	-	-
	НВ-2	1,5±0,09	1,69±0,12	1,69±0,11	-
	ВНК-21	1,77±0,08	2,4±0,08	-	-
	СНЕВ	1,0±0,02	1,0±0,02	-	-
468	КСТ	3,0±0,08	-	-	-
	НВ-2	1,0±0,04	2,02±0,08	2,02±0,03	-
	ВНК-21	1,77±0,03	2,4±0,05	-	-
	СНЕВ	2,56±0,04	1,96±0,03	-	-

Репродуктивна здатність штамів також суттєво залежала від способу культивування інфікованих клітин. Встановлено, що за культивування клітин і вірусу ІРТ у ролерних бутлях інфекційність його зростала на 1,5-1,66 lg ТЦД₅₀/см³ порівняно з культивуванням у статичних умовах у культуральних пласких посудинах. Так, титр інфекційності штамів Урал і Монорин за репродукції в культурі клітин ВНК-21 у 3-літрових бутлях сягала 9,33 і 8,5 lg ТЦД₅₀/см³ проти 7,67 і 7,0 lg ТЦД₅₀/см³ у культуральних матрасах.

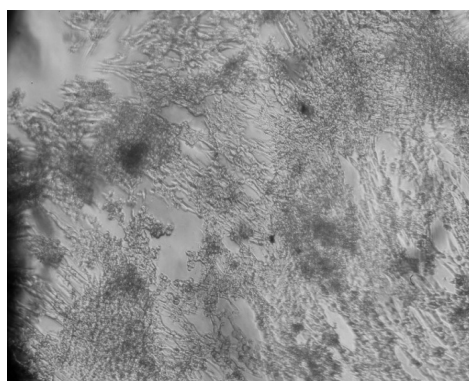
Цитопатичні зміни в інфікованих клітинах характеризувались в залежності від видової належності клітин культури та штамів вірусу (рис.). Цитопатогенна дія штамів вірусу ІРТ проявлялась, починаючи з 18-24 години до 5 доби інфікування (таблиця 2). Штами ТК-ВІЕВ та 468 у культурі клітин ВНК-21 та НВ викликали округлення клітин та появу «сітки» у моношарі клітин з подальшим повним його руйнуванням.



а) ЦПД штаму 468 (1 пасаж, 8 доба інкубування в ВНК-21; ×160)



б) ЦПД штаму Оренбург (1 пасаж, 8 доба інкубування в ВНК-21; ×160)



в) ЦПД штаму ТК-ВІЕВ (1 пасаж, 8 доба інкубування в ВНК-21; ×160)

Рис. Цитопатичні зміни у моношарових культурах клітин при культивуванні штамів вірусу ІРТ

Штам Оренбург спричиняв округлення клітин з утворенням «виноградних грон». ЦПД штамів Молдавський, Урал та Монорин характеризувалась практично одночасним «вибуховим» округленням та відторгненням від поверхні пластику або лізису усіх клітин моношару. Такий характер ЦПД є типовим для герпесвірусів. Термін проявлення і завершення цитопатогенної дії з повним руйнуванням моношару клітин для штамів Молдавський, Урал та Монорин – становив у середньому 1-3 доби, для штамів ТК-ВІЕВ та 468-10 діб, а для штаму Оренбург – 11 діб.

Таблиця 2 – Терміни прояву ЦПД штамів герпесвірусу 1 серотипу в культурах клітин (год.), n=3

Штам вірусу ІРТ	Культура клітин	1 пасаж	2 пасаж	3 пасаж	Ролерне культивування
1	2	3	4	5	6
Молдавський	КСТ	20-24	-	-	-
	НВ-2	20-24	20-24	20-24	-
	ВНК-21	18-20	18-20	18-20	-
	СНЕВ	68-72	68-72	-	-

1	2	3	4	5	6
Урал	КСТ	40-48	-	-	-
	НВ-2	60-72	44-48	22-24	-
	ВНК-21	40-48	22-24	22-24	20-24
	СНЕВ	68-72	68-72	-	-
ТК-ВІЕВ	КСТ	90-96	-	-	-
	НВ-2	9 діб	9 діб	9 діб	-
	ВНК-21	10 діб	5 діб	5 діб	-
	СНЕВ	11 діб	7 діб	-	-
Монорин	КСТ	40-48	-	-	-
	НВ-2	68-72	44-48	60-68	-
	ВНК-21	44-48	20-24	20-24	20-24
	СНЕВ	12 діб	12 діб	-	-
Оренбург	КСТ	90-96	-	-	-
	НВ-2	7 діб	10 діб	12 діб	-
	ВНК-21	11 діб	10 діб	10 діб	-
	СНЕВ	12 діб	7 діб	-	-
468	КСТ	7 діб	-	-	-
	НВ-2	7 діб	10 діб	12 діб	-
	ВНК-21	10 діб	8 діб	7 діб	-
	СНЕВ	12 діб	7 діб	-	-

Висновки. За аналізу отриманих даних зроблено висновок: тривале зберігання штамів Молдавський та ТК-ВІЕВ культурального вірусу ІРТ за температури мінус 40 °С без кріоконсервантів упродовж 9 та 19 років знижує інфекційну активність на 3,0-3,5 lg ТЦД₅₀/см³; а штамів Урал, Монорин та Оренбург за тих же умов має менш руйнівні наслідки, (титр знижується на 1,0-1,5 lg ТЦД₅₀/см³). Найвищу інфекційність встановлено у штамів вірусу ІРТ Урал, Монорин та Молдавський, репродукованих у культурах клітин ВНК-21, НВ, та КСТ. Найбільш чутливою до вірусу ІРТ є культура перещеплюваних клітин ВНК-21, що визначається найвищими титрами та найменшими термінами накопичення вірусу. За ролевого культивування штамів Урал та Монорин у культурі клітин титр інфекційної активності на 1,5 lg ТЦД₅₀/см³ вище у порівнянні з накопиченням біомаси вірусу у матрасах.

Список літератури

1. Васильев, Д.А., Луговцев, В.Ю. Лекционный курс по частной вирусологии. Вирусы, вызывающие болезни жвачных и однокопытных. [Электронный ресурс] / Ульяновск 2004 Режим доступа http://vgavm.w6.ru/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=6&Itemid=35
2. Инфекционная патология животных Том 1 [Текст] / под общей ред. А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьева [и др.] – М.: ИКЦ «Академкнига» 2006 г., С. 670-672.
3. Штрауб, О. Х. Инфекции крупного рогатого скота, вызываемые вирусами герпеса [Текст]: Пер. с нем. -Л. Г. Осипян под ред. Д. Ф. Осидзе; М. Колос – 1981. – 43-48 с.
4. Готов, А. Г., Шуляк, А. Ф. с соавт. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота [Текст] Новосибирск, 2006. – 10-15 с.
5. Кузнецова, С. В., Концентрирование вируса инфекционного ринотрахеита [Текст] / С. В. Кузнецова. А. А. Бойко, В. С. Иванов // Ветеринария №10, 1985 – С. 31-32.

VARIABILITY IN REPRODUCTIVE ABILITY OF THE VIRUS OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS DEPENDING ON THE CULTIVATION AND STORAGE CONDITIONS

Pylypenko A.V., Bilokin V.S., Kucheryavenko R.A., Kucheryavenko L.I., Kucheryavenko L.N.

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

The article gives results of the research dedicated to changes in reproductive of the virus infectious bovine rhinotracheitis depending on the virus shelf life, selected cultures and cultivation conditions.

УДК 578.84

ФОТОДИНАМІЧНА ІНАКТИВАЦІЯ ІРИДОВІРУСУ КОМАРА ФУЛЕРЕНАМИ C₆₀

Рудь Ю.П.¹, Прилуцька С.В.², Буцацький Л.П.², Прилуцький Ю.І.²

¹Інститут рибного господарства НААН України

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Іридовіруси – це великі ікосаедричні, цитоплазматичні, ДНК-вмісні віруси, ізолювані від комах, риб, амфібій і рептилій. Іридовіруси кровосисних комарів широко розповсюджені у природних водоймах України і є регуляторами їх чисельності. Діаметр віріонів складає 180-200 нм [1].

Фулерени C₆₀ – це ікосаедричні молекули вуглецю діаметром 0,7 нм [2]. Під дією УФ/Вид світла фулерени C₆₀ активуються і здатні продукувати активні форми кисню [3], які призводять до деструкції біологічних макромолекул, зокрема нуклеїнових кислот, білків і ліпідів [4].

У літературі зустрічаються повідомлення про фотодинамічну інактивацію вірусів з родин *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* та *Togaviridae*. Так, у присутності фулеренів C₆₀ представники родин *Rhabdoviridae* та *Togaviridae* упродовж п'яти годин фотоінакти-