

УДК 619:579.887.111:616-078:636.2

© 2010

*Орлов С.М., кандидат ветеринарних наук*

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

## ЗАСТОСУВАННЯ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ТРАНСПОРТУВАННЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ТА ІЗОЛЯЦІЇ МІКОПЛАЗМ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*Рецензент – кандидат ветеринарних наук В.В. Білушко*

*При застосуванні середовищ для транспортування біологічного матеріалу (СТБМ) були виділені польові ізоляти мікоплазм від 30 до 50 % корів із патологіями репродуктивних органів. Найбільш ефективним щодо ізоляції мікоплазм великої рогатої худоби й інгібування супутньої мікрофлори було застосування СТБМ із додаванням антибактеріальних (цефалоспоринони 50 мкг/см<sup>3</sup>, пеніцилін 1000 ОД/см<sup>3</sup>) й антигрибкових (ністатин 500 ОД/см<sup>3</sup>) антибіотиків, їх однодобової інкубації з подальшим пересівом на діагностичні живильні середовища.*

**Ключові слова:** мікоплазма, середовище для транспортування біологічного матеріалу, інгібітори, діагностика, велика рогата худоба.

**Постановка проблеми.** Особливості будови клітини мікоплазм, зокрема, відсутність клітинної стінки, зумовлюють низький рівень життєздатності цих мікроорганізмів у зовнішньому середовищі. Особливу проблему становить процес зберігання збудника в пробах біологічного матеріалу, який доставляється до діагностичного закладу [3, 6].

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Останнім часом в Україні та країнах СНД при диференційній діагностиці змішаних інфекцій великої рогатої худоби в господарствах виявляються стаціонарно неблагополучні стада з однією або двома трьома інфекційними хворобами вірус-бактеріальної етіології (РТ-ВД-мікоплазмоз та ін.), де близько чверті досліджуваних тварин є мікоплазманосями. Все це призводить до зниження продуктивності, безпліддя і, як наслідок, – передчасної выбраковки тварин [2, 5, 7, 9].

При проведенні досліджень на мікоплазмоз великої рогатої худоби (ВРХ) надсилають до лабораторії мазки (або зішкрібки) зі слизових оболонок носоглотки або піхви, однак при цьому значно підвищується ймовірність контамінації проб банальною мікрофлорою. Запропоновані раніше бактеріальні та грибові інгібітори в середовищах для культивування мікоплазм мають

не досить високу бактерицидну активність [3, 5]. Так, наприклад, до пеніциліну, який широко використовується в середовищах для ізоляції мікоплазм, з'явилися стійкі штами бактерій. Останнім часом створені нові бета-лактамі антибіотики – цефалоспоринони (цефазолін, цефотаксим та ін.), що мають високу ступінь бактерицидності й більш широкий спектр дії, включаючи вплив на грамнегативні мікроорганізми. Механізм антибактеріальної дії цефалоспоринів такий же, як і у пеніцилінів, і пов'язаний з інгібуванням біосинтезу клітинної стінки мікроорганізмів [8]. Нами в лабораторних дослідах не виявлено інгібуючого впливу цефазоліну або цефотаксиму в концентраціях від 12,5 до 250 мкг/см<sup>3</sup> на культури мікоплазм ВРХ за умов використання різних середовищ для транспортування біологічного матеріалу й однодобової інкубації проби. Встановлено також, що найефективнішим щодо ізоляції мікоплазм ВРХ було застосування середовищ із додаванням цефалоспоринів (50 мкг/см<sup>3</sup>) і пеніциліну (1000 ОД/см<sup>3</sup>). При цьому використані тест-штами мікроорганізмів проявляють найбільшу чутливість до одночасного застосування цих бета-лактамінів [4]. Вирішення проблеми полягає у розробці спеціального середовища для транспортування біологічного матеріалу при дослідженні на мікоплазмоз ВРХ.

**Мета дослідження** – провести порівняльне вивчення ефективності застосування середовищ з одночасним додаванням антибактеріальних і антигрибкових антибіотиків для транспортування проб біологічного матеріалу від ВРХ при дослідженні на мікоплазмоз.

**Матеріал і методи досліджень.** Дослідження проводили у два етапи. На першому етапі для вивчення інгібуючої дії цефалоспоринів, пеніциліну та ністатину на польові ізоляти й музейні штами мікоплазм застосовували виготовлені СТБМ: перше – Хоттінгеру перевар із додаванням цефазоліну в концентрації 50 мкг на см<sup>3</sup> середовища, пеніциліну – 1000 ОД/см<sup>3</sup> і ністатину – 500 ОД/см<sup>3</sup>; друге – Хоттінгеру з цефотакси-

мом ( $50 \text{ мкг/см}^3$ ), пеніциліном ( $1000 \text{ ОД/см}^3$ ) та ністатином ( $500 \text{ ОД/см}^3$ ). Контролем було середовище Хоттінгеру без додавання антибіотиків. В якості основи для живильних середовищ використовували Хоттінгеру перевар основний (із додаванням 20 % сироватки крові коня, 8 % дріжджового екстракту, 0,5 % глюкози) для ізоляції мікоплазм [1, 3].

Далі визначали вплив вищевказаних антибіотиків, які не пригнічують росту культур мікоплазм, у концентрації  $10^5 \text{ м.к./см}^3$ . Для досліджень застосовували три польові ізоляти мікоплазм від ВРХ і також музейні штами *Mycoplasma bovis* PG 45, *M. arginini* G 230. Режим інкубування посівів із середовищами – одна доба за температури ( $37,0 \pm 0,5$ )°C, за яким проводили (2-3) послідовних пасажі на діагностичні живильні середовища для ізоляції мікоплазм. Кожну добу проводили контроль інтенсивності росту візуально, а також за допомогою мікроскопії мазків (фарбування за Романовським – Гімзою та Грамом).

На другому етапі в якості середовищ для транспортування біологічного матеріалу (СТБМ) використовували: № 1 – середовище Едварда з додаванням інгібіторів: цефазоліну в концентрації  $50 \text{ мкг/см}^3$ , пеніциліну –  $1000 \text{ ОД/см}^3$  і ністатину –  $500 \text{ ОД/см}^3$ ; № 2 – середовище Едварда з додаванням цефотаксиму ( $50 \text{ мкг/см}^3$ ), пеніциліну ( $1000 \text{ ОД/см}^3$ ) та ністатину ( $500 \text{ ОД/см}^3$ ); № 3 – рідке живильне середовище (РЖС) із пеніциліном ( $1000 \text{ ОД/см}^3$ ) та 0,025 % талію ацетату (контроль). У якості основи для живильних середовищ № 1-2 використовували середовище Едварда з додаванням 20 % альбуміну сироватки крові ВРХ, 8 % – екстракту дріжджів, 0,5 % глюкози, а СТБМ № 3 – середовище ННЦ “ІЕКВМ” для ізоляції мікоплазм [1, 4].

СТБМ розфасовували у стерильні пробірки по  $4,0 \text{ см}^3$ . Відбір мазків із слизової оболонки переддвір'я піхви у 10 корів із патологіями репродуктивних органів (вувльовагініти, ендометрити, подовженість сервіс-періоду, аборти) з господарства ДП ДГ “Кутузівка” Харківської області проводили за стандартною методикою. Від однієї тварини відбирали одночасно три проби, які додавали до різних СТБМ і доставляли в лабораторію в термосі з льодом через 2 години після взяття. Далі проби інкубували протягом однієї доби, з посівів проводили (2-3) пасажі. Контроль росту культур спостерігали візуально та за допомогою мікроскопії мазків.

**Результати досліджень.** При дослідженні середовища Хоттінгеру із застосуванням однодо-

бової інкубації посівів усі культури мікоплазм були нечутливими до одночасної дії цефалоспоринових (цефазоліну або цефотаксиму) в концентрації  $50 \text{ мкг/см}^3$ , пеніциліну та ністатину. При подальших (2-3-х) пасажах на діагностичні середовища виявили ріст досліджуваних культур мікоплазм у вигляді легкої опалесценції з формуванням незначного осаду. В контрольних пробірках із середовищем без додавання антибіотиків на 4-5-у добу виявили ріст культур мікоплазм. Після фарбування за Романовським – Гімзою при мікроскопії мазків спостерігали дрібні поліморфні коко-овоїдоподібні тільця (0,2-0,5) нм рожево-фіолетового кольору, розташованих одинично, у вигляді невеликих скупчень та ниткоподібних форм.

У другому досліді проб біологічного матеріалу від корів було виділено мікоплазми та супутню мікрофлору (таблиця). У 50,0 % проб ізолювали мікоплазми, з яких 26,7 % – чисті культури. Бактеріальна мікрофлора була типована до виду; вона була представлена стафілококами (*Staphylococcus saprophyticus*), ентеробактеріями (*Enterobacter agglomerans*) та дріжджоподібними грибами.

Ефективність застосування СТБМ і подальшої ізоляції мікоплазм у цьому досліді становила від 30 до 50 %.

Найефективнішим стало застосування СТБМ № 2 з додаванням цефотаксиму, пеніциліну та ністатину, – при цьому з 50 % проб ізолювали чисті культури мікоплазм, а з 20 % проб виділили мікоплазми разом із супутньою грибковою мікрофлорою.

З СТБМ № 1 із додаванням цефазоліну, пеніциліну та ністатину виділили мікоплазми з супутньою бактеріальною та грибковою мікрофлорою у 50 % проб біологічного матеріалу, у 30 % проб – чисті культури мікоплазм.

Лише з 30 % проб із РЖС (контроль) були ізольовані мікоплазми разом із супутньою бактеріальною та грибковою мікрофлорою, а у 60 % проб із цього середовища (без додавання ністатину) разом із бактеріальною мікрофлорою виділили дріжджоподібні гриби.

Вивчення властивостей культур мікоплазм показало, що за морфологічними, тінкторіальними, культурально-біохімічними ознаками виділені культури відповідали властивостям, характерним для видів *Mycoplasma*. Так, ріст культур на рідкому середовищі характеризувався незначною опалесценцією, на щільних живильних середовищах – утворенням дрібних ізольованих круглястих прозорих колоній. При мікроскопії

мазків, виготовлених із бульйонних культур та забарвлених за Романовським – Гімзою, спостерігали мікоплазми.

Виділені мікоплазми не розклали глюкозу та аргінін, тобто, не змінювали забарвлення індикаторів у рідких живильних середовищах.

За контроль брався референтний штам *M. bovis* PG 45.

Таким чином, проводячи прижиттєву діагнос-

тику великої рогатої худоби на мікоплазмоз, слід враховувати, що супутня мікрофлора на слизових оболонках тварин представлена стафілококами, ентеробактеріями й дріжджоподібними грибами.

Тому до складу середовищ для транспортування біологічного матеріалу необхідно вводити антибактеріальні та антигрибкові препарати широкого спектру дії.

**Результати ізоляції мікоплазм від корів при застосуванні різних СТБМ**

Інв. № корови	СТБМ*		Діагностичні середовища		Виділені культури
	середовище	24 год. інкубації	мікоплазми	с. м.	
2708	№ 1	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
	№ 2	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
	№ 3 контроль	-	-	+	<i>E. agglomerans</i> , <i>S. saprophyticus</i> , Д.Г.
6638	№ 1	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
	№ 2	+	+	+	<b>Мyc.</b>
	№ 3 контроль	-	-	+	<i>E. agglomerans</i> , <i>S. saprophyticus</i>
2873	№ 1	+	+	-	<b>Мyc.</b>
	№ 2	+	+	-	<b>Мyc.</b>
	№ 3 контроль	+	+	+	<b>Мyc.</b> , <i>E. agglomerans</i> , <i>S. saprophyticus</i>
4281	№ 1	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
	№ 2	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
	№ 3 контроль	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
6308	№ 1	+	+	+	<b>Мyc.</b>
	№ 2	+	+	+	<b>Мyc.</b>
	№ 3 контроль	+	+	+	<b>Мyc.</b> , <i>E. agglomerans</i> , Д.Г.
2874	№ 1	-	-	+	<i>E. agglomerans</i> , Д.Г.
	№ 2	+	+	+	<b>Мyc.</b> , Д.Г.
	№ 3 контроль	-	-	+	<i>E. agglomerans</i> , <i>S. saprophyticus</i> , Д.Г.
4454	№ 1	+	+	+	<b>Мyc.</b> , <i>E. agglomerans</i>
	№ 2	+	+	-	<b>Мyc.</b>
	№ 3 контроль	-	-	+	<i>E. agglomerans</i> , <i>S. saprophyticus</i> , Д.Г.
6889	№ 1	+	+	+	<b>Мyc.</b> , <i>E. agglomerans</i>
	№ 2	+	+	+	<b>Мyc.</b> , Д.Г.
	№ 3 контроль	-	-	+	<i>E. agglomerans</i> , <i>S. saprophyticus</i> , Д.Г.
806	№ 1	+	+	-	<b>Мyc.</b>
	№ 2	+	+	-	<b>Мyc.</b>
	№ 3 контроль	+	+	+	<b>Мyc.</b> , Д.Г.
1833	№ 1	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
	№ 2	-	-	+	<i>E. agglomerans</i>
	№ 3 контроль	-	-	+	<i>E. agglomerans</i> , Д.Г.

Примітки: \* – склад середовищ наведено в матеріалах і методах; с. м. – супутня мікрофлора; Д.Г. – дріжджоподібні гриби.

**Висновки.** 1. За умов використання різних середовищ для транспортування біологічного матеріалу (СТБМ) польові ізоляти мікоплазм були виділені від 30 до 50 % корів із патологіями репродуктивних органів.

2. Встановлено, що найбільш ефективним способом ізоляції мікоплазм великої рогатої худоби

й інгібування супутньої мікрофлори було застосування СТБМ із додаванням цефалоспоринів (50 мкг/см<sup>3</sup>), пеніциліну (1000 ОД/см<sup>3</sup>) та ністатину (500 ОД/см<sup>3</sup>), їх однодобової інкубації з подальшим пересівом на діагностичні живильні середовища.

### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Ветеринарні імунобіологічні препарати: довідник / За заг. ред. П.І. Вербицького, А.М. Головка. – К.: Реферат, 2004. – 400с.
2. Вологодская О.В. Ассоциативный урогенитальный микоплазмоз крупного рогатого скота (диагностика и лечение) / О.В. Вологодская. – Автореф. дисс... канд. вет. наук. – Омск, 2006. – 20 с.
3. Коромыслов Г.Ф. Микоплазмозы в патологии животных / Г.Ф. Коромыслов, Я. Месарош, Л. Штипкович. – М.: ВО Агропромиздат, 1987. – 304 с.
4. Орлов С.М. Вивчення інгібуючого впливу бета-лактамів на мікроорганізми та мікоплазми великої рогатої худоби при застосуванні середовищ для транспортування біологічного матеріалу // С.М Орлов, О.В. Обуховська, К.В. Глебова / Міжвід. темат. наук. зб.: Вет. медицина. – 2010, № 94. – С. 133-135.
5. Орлов С.М. Прижиттєва діагностика мікоплазмозу великої рогатої худоби із застосуванням різних схем підготування проб патологічного матеріалу // С.М Орлов, О.В. Обуховська, К.В. Глебова / Між-
- від. темат. наук. зб.: Вет. медицина. – 2009, № 92. – С. 389-394.
6. Самуйленко А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова [и др.]. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 2. – С. 331-471.
7. Смирнова Л.И. Выделение и дифференциация урогенитальных микоплазм от крупного рогатого скота // Л.И. Смирнова, К.В. Племяшов, Л.В. Темникова / Ветеринария. – 2008, № 8. – С. 9-10.
8. Страчунский Л.С. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. – М.: Боргес, 2002. – 432 с.
9. Четкина Н.П. Диагностика и система лечебно-профилактических мероприятий при смешанных инфекциях крупного рогатого скота вирус-бактериальной этиологии // Н.П. Четкина, М.П. Павленко, С.Н. Орлов [и др.] / Міжвід. темат. наук. зб.: Вет. медицина. – 2008, № 91. – С. 494-501.