

На правах рукописи

**КАРАБАНОВА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА**

**РАЗРАБОТКА И ИСПЫТАНИЕ  
СЕЛЕКТИВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ  
СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
АСТИНОВАЦИЛЛУС ПЛЕУРОПНЕУМОНΙΑЕ**

Специальность 16.00.03 - Ветеринарная микробиология,  
вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

МОСКВА 2004

Работа выполнена на кафедре микробиологии и иммунологии Московского государственного университета прикладной биотехнологии.

**Научный руководитель:** - доктор ветеринарных наук, профессор  
**Д.И. Скородумов**

**Официальные оппоненты:** - доктор ветеринарных наук  
**Н.Т. Татаринцев (МГУПБ)**

- доктор ветеринарных наук  
**Л.Д. Демидова (ВНИИВСГЭ)**

**Ведущая организация** — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ).

Защита диссертации состоится *«27» февр.* 2004г. в *«14»* часов на заседании Диссертационного совета Д 212.149.03 при Московском государственном университете прикладной биотехнологии по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д.33.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУПБ.

Автореферат разослан *«23» сев* 2004г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор ветеринарных наук



Смирнова И.Р.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Среди респираторных инфекций свиней широко распространены болезни, вызываемые представителями семейства Pasteurellaceae. В пределах данного семейства, наряду с *P. multocida*, значительную роль в инфекционной патологии свиней играет *Actinobacillus pleuropneumoniae* - возбудитель актинобациллезной пневмонии свиней (М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов, 1986; Л.Я. Романова, В.Ф. Финенко, 1987; М.А. Сидоров, Ш.М. Мицаев Д.И. Скородумов, 1989; F. Touil, R. Higgins, 1988; J. Hommer, E.M. Kamp, W.L.A. Lioeffen et.al., 1999).

В основе борьбы с любой инфекционной болезнью лежит эффективная диагностика. Методы серодиагностики актинобациллезной пневмонии свиней (РСК, РА, иммуноферментный метод) большинство авторов рассматривают как групповые, полезные преимущественно при оценке эпизоотической ситуации в хозяйстве. Основным методом лабораторной диагностики актинобациллезной пневмонии свиней остается бактериологическое исследование (М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов, Н.И. Лаврентьев, 1981; Л.Я. Романова, В.Ф. Финенко, 1987; A. Gunnarson, 1979; K.R. Mittal, R. Higgins, 1984; R. Nielsen, 1988).

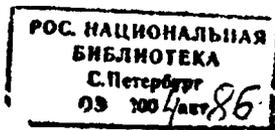
При острых вспышках болезни и исследовании свежих легочных поражений изоляция культуры возбудителя не представляет особой сложности. Труднее выделить *A. pleuropneumoniae* из старых пневмонических очагов и особенно из миндалин, носовой и трахеобронхиальной слизи из-за сильного загрязнения материала сопутствующей микрофлорой. Многие аспекты экологии *A. pleuropneumoniae* недостаточно ясны, их изучение требует исследования материалов, содержащих значительное количество бактериальных контаминантов (М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов, 1978; М.Ф. Мильков 1987; F. Castryck, 1984; T. Gram, 1996; U. Hinrichs, V.F. Ohlinder, S. Pesh et. al., 1999). Таким образом, для повышения эффективности бактериологической диагностики актинобациллезной пневмонии свиней и изучения экологии возбудителя необходимо применение питательных сред с селективными свойствами. В зарубежной литературе имеются единичные сообщения о попытках конструирования и использования питательных сред подобного типа (К.А. Gilbride, 1983; M.J. Jacobsen, 1995).

Отечественные бактериологи целенаправленных исследований в данном направлении не проводили. В связи с изложенным, мы поставили перед собой задачу по конструированию и испытанию селективных питательных сред для культивирования *A. pleuropneumoniae*.

**Цель и задачи исследования.** Разработать жидкую среду обогащения (накопительную) и плотную селективную среду для диагностического культивирования *A. pleuropneumoniae*.

Для достижения поставленной цели были определены следующие

з а д а ч и : —



- оптимизировать состав жидкой и плотной питательных сред для диагностического культивирования *A. pleuropneumoniae*, с использованием в качестве основы доступных отечественных коммерческих питательных сред;
- определить качественный состав и оптимальное количественное соотношение противомикробных веществ в селективных питательных средах для культивирования *A. pleuropneumoniae*;
- провести оценку разработанных селективных питательных сред по основным параметрам, характеризующим рост *A. pleuropneumoniae*, и селективным свойствам;
- испытать сконструированные селективные питательные среды для выявления *A. pleuropneumoniae* в животных тканях.

**Научная новизна.** Научно обоснованы:

- оптимальный состав жидкой и плотной питательных сред для диагностического культивирования *A. pleuropneumoniae* с использованием в качестве основы доступных отечественных коммерческих микробиологических сред;
- качественный состав и оптимальное количественное соотношение противомикробных веществ в селективных жидких и плотных питательных средах для *A. pleuropneumoniae*;
- использование жидкой накопительной и плотной селективной питательных сред в схеме бактериологического исследования на актинобациллезную пневмонию свиней.

**Практическая ценность работы.** Разработаны жидкая накопительная и плотная селективная питательные среды для культивирования *A. pleuropneumoniae*.

Определена целесообразность использования сконструированных селективных питательных сред для выделения *A. pleuropneumoniae* из материала, контаминированного сопутствующей микрофлорой.

Предложена схема бактериологического исследования на актинобациллезную пневмонию свиней, предусматривающая применение жидкой и плотной селективных питательных сред.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на: межкафедральном заседании сотрудников ветеринарно-санитарного факультета МГУПБ (2003) и Международной научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», Шелково, (2003).

**Публикации.** Материалы диссертации отражены в четырех опубликованных печатных работах.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Состав оптимизированных жидкой и плотной питательных сред для диагностического культивирования *A. pleuropneumoniae*.

- Состав жидкой накопительной и плотной селективной питательных сред для *A. pleuropneumoniae*.
- Схема бактериологического исследования на актинобациллезную пневмонию свиней с использованием жидкой и плотной селективных питательных сред.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 129 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, выводов и списка литературы, содержащего 166 библиографических ссылок, в том числе иностранных 85. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 26 рисунками.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнена в период с 2000 по 2003 гг. на кафедре микробиологии и иммунологии Московского государственного университета прикладной биотехнологии.

Материал для бактериологического исследования брали от убойных свиней на Таганском мясокомбинате и ЗАО «Кузнецовский свинокомплекс», а также от павших и убитых с диагностической целью животных из хозяйств, неблагополучных по респираторным болезням свиней (АОЗТ «Комплекс» Череповецкий район Вологодской области; СПК «Кушевский», Краснодарский край). Всего бактериологическому исследованию подвергнут материал от 42 свиней, в том числе от 19 клинически здоровых и 23 с явлениями пневмонии.

В опытах использовали референтные штаммы *A. pleuropneumoniae* ССМ 5869, ССМ 5870, ССМ 5871, М 62, К 17, К 98; штаммы из музеев бактериальных культур кафедр микробиологии и иммунологии МГУПБ и МГАВМиБ: *V. subtilis*, *S. aureus* NCTC 8530, *S. epidermidis* AFCC 14990, *S. typhimurium* № 415; '*E. coli* 02; *P. multocida* P19 (серовар D), а также *C. albicans*.

При конструировании питательных сред применяли: питательный агар для культивирования микроорганизмов, сухой (НПО «Питательные среды», г. Махачкала); агар для культивирования микроорганизмов, сухой (ГРМ-агар, МНПЦ ГИП г. Оболенск); питательный агар сухой АСД (Ставропольский НИИ вакцин и сывороток, г. Ставрополь); МПА; питательный бульон для культивирования микроорганизмов, сухой (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), бульон на переваре Хоттингера с содержанием 120 мг/% аминного азота; МПБ.

В качестве добавочных ростовых и антиоксидантных компонентов питательных сред использовали дрожжевой экстракт, глюкозу, стерильную сыворотку крови крупного рогатого скота (ООО «Биолот», Санкт-Петербург).

В качестве селективных факторов применяли: кристалвиолет (фабрика химреактивов, г. Львов); раствор бриллиантового зеленого 1%-й (ОАО «Московская фармацевтическая фабрика»); Амфотерицин В (АКО «Синтез», г. Курган); Bacitracin, В — 5150; Tylosin, PA 9503; Cloxacillin sodium 106HO826; Nistatin (Sigma chemical CO). Для определения чувствительности *A. pleuropneumoniae* к антибиотикам использовали также стандартные бумажные диски с 27 антибиотиками.

Чувствительность *A. pleuropneumoniae* к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с применением стандартных бумажных дисков и методом серийных разведений в жидких питательных средах (М.Д. Биргер, 1973). Ингибирующее действие красителей выявляли методом предельных разведений. Общее количество бактериальных клеток устанавливали при помощи стандарта мутности ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича и нефелометрически. Количество жизнеспособных бактериальных клеток определяли методом посева серийных десятикратных разведений исследуемой взвеси бактерий на поверхность плотной питательной среды, а также методом предельных разведений в жидкой питательной среде с вычислением концентрации микробных клеток методом наиболее вероятных чисел (Н.С. Егоров, 1986).

Выбор оптимального соотношения исследуемых компонентов в составе базовых и селективных питательных сред осуществляли согласно методу В.В. Бирюкова (1968).

Оценку качества сконструированных питательных сред проводили по следующим показателям: чувствительность питательной среды; скорость роста, период генерации; выход бактериальных клеток на 1 мл среды; селективные свойства среды; сохранение стабильности биологических свойств культивируемого микроорганизма (Методические рекомендации к контролю питательных сред по биологическим показателям, 1980).

При исследовании материалов от свиней выделены и идентифицированы на уровне рода или вида 156 культур бактерий.

На первоначальном этапе идентификации, после установления формы клетки и окраски по Граму, использовали идентификационные схемы Р.Д. Quinn и соавт. (1994). В случае необходимости у бактерий, отнесенных к определенному роду или группе родов, изучали дополнительные ферментативные характеристики с использованием рутинных тестов, а также пластин биохимических для дифференциации энтеробактерий (ПБДЭ) производства Нижегородского НИИЭМ.

Зависимость бактерий от НАД определяли в тесте "сателлитного" роста на сывороточном питательном агаре. Полученный цифровой материал обрабатывали, используя общепринятые методы математической статистики (И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев, 1962; Н.С. Ростова, 1977).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Сравнительная оценка ростовых свойств всеупотребительных коммерческих жидких и плотных питательных сред**

На первом этапе исследований провели сравнительную оценку доступных для диагностических лабораторий коммерческих плотных и жидких питательных сред с целью выбора наиболее оптимальных, как основы для конструирования селективных питательных сред. О ростовых свойствах испытанных питательных сред судили по выходу бактериальных клеток *A. pleuropneumoniae* на 1 мл среды. Результаты исследований показали, что в испытанных жидких питательных средах накопление клеток в 1 мл сред через 20 ч инкубирования колебалось в пределах 8,86 - 9,12, в плотных - 9,17—9,27 (log). Исходя из представленных результатов, в качестве базовых питательных сред, как доступных и достаточно эффективных, для дальнейшей работы взяли питательный бульон и питательный агар производства НПО «Питательные среды» г. Махачкала.

### **Конструирование оптимальной жидкой питательной среды для *A. pleuropneumoniae***

Исследовали влияние на рост *A. pleuropneumoniae* в базовой питательной среде добавочных компонентов: дрожжевого экстракта, сыворотки крови крупного рогатого скота, глюкозы. В качестве показателя выхода процесса использовали накопление общего количества бактериальных клеток в 1 мл питательной среды через 20 ч инкубирования при 37-38 °С. Для каждого единичного фактора предварительно определяли «лимитирующую», «стационарную» и «ингибирующую» области, путем варьирования его содержания в среде на фоне постоянного уровня остальных факторов. На рис. 1 приведены результаты испытания различных концентраций глюкозы. Аналогичным, образом исследовали влияние на рост *A. pleuropneumoniae* дрожжевого экстракта и сыворотки крови.

На следующем этапе определяли эффект совместного влияния дрожжевого экстракта, сыворотки крови и глюкозы на величину урожая микробных клеток.

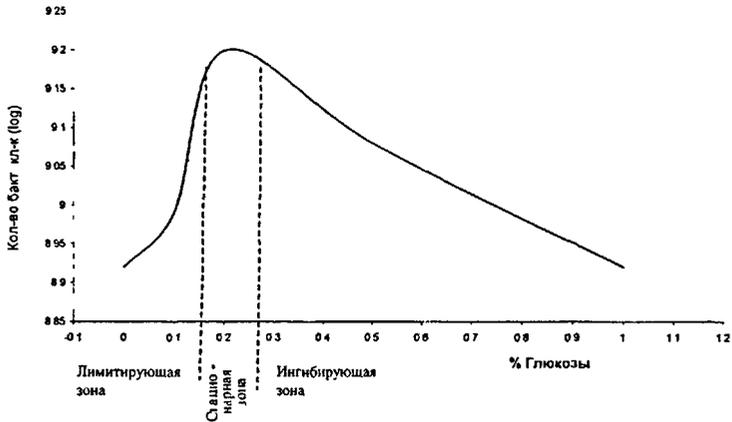


Рис. 1. Влияние концентрации глюкозы в жидкой питательной среде на рост *A. pleuropneumoniae*

Схемы планирования эксперимента для трех факторов на трех уровнях представлены в табл. 1 и 2. Анализ полученных данных показывает, что наибольший выход бактериальных клеток на 1 мл среды ( $1,3 \times 10^9$ ) был получен в питательной среде № 4, где компоненты находились на втором уровне. Увеличение или уменьшение содержания компонентов дает отрицательный эффект. В соответствии с полученными результатами для *A. pleuropneumoniae* в данной питательной среде оптимальное содержание дрожжевого экстракта и сыворотки крови крупного рогатого скота составляет 3,5% (объем/объем), глюкозы - 0,2% (вес/объем).

Таблица 1

**Схема планирования эксперимента для трех факторов на трех уровнях и накопление микробных клеток *A. pleuropneumoniae* в 1 мл жидкой питательной среды**

№ варианта питательной среды	Дрожжевой экстракт, %	Сыворотка КРС, %	Глюкоза, %	М.к./мл, $1 \times 10^9$
1	1,5	1,5	0,1	0,8
2	1,5	5,5	0,2	1,0
3	1,5	3,5	0,3	0,95
4	3,5	3,5	0,2	1,3
5	3,5	1,5	0,3	0,68
6	3,5	5,5	0,1	1,2
7	5,5	5,5	0,3	1,0
8	5,5	3,5	0,1	1,1
9	5,5	1,5	0,2	0,95

Таблица 2

**Влияние различных концентраций компонентов питательной среды на накопление общего количества клеток *A. pleuropneumoniae***

Компоненты питательных сред	Содержание компонентов питательной среды на различных уровнях		
	I уровень	II уровень	III уровень
Дрожжевой экстракт, %	1,5	3,5	5,5
эффект	-0,07	0,07	0,02
Сыворотка КРС, %	1,5	3,5	5,5
эффект	-0,18	0,13	0,08
Глюкоза, %	0,1	0,2	0,3
эффект	0,04	0,09	-0,11

**Конструирование жидкой накопительной питательной среды для *L. pleuropneumoniae***

После оптимизации состава жидкой питательной среды исследовали чувствительность *A. pleuropneumoniae* к некоторым антибиотикам и красителям с целью отбора веществ, не оказывающих существенного ингибирующего действия на рост *A. pleuropneumoniae*.

Для качественной оценки действия антибиотиков на рост *A. pleuropneumoniae* использовали метод диффузии в агар с применением стандартных бумажных дисков (27 антибиотиков различных групп). Из красителей были испытаны кристалвиолет и бриллиантовый зеленый.

Результаты исследования показали целесообразность дальнейшего испытания линкомицина, флуксациллина, тилозина, амфотерицина В, нистатина, бацитрацина и кристалвиолета. У этих антибиотиков и красителей была определена МПК. Результаты определения МПК антибиотиков представлены в табл. 3.

Таблица 3

**МПК антибиотиков для *A. pleuropneumoniae* (n=6)**

№ п/п	Линкомицин (13-422 мкг/мл)	Бацитрацин (9,7-625 мкг/мл)	Тилозин (0,9-250 мкг/мл)	Флуксациллин (4,5-143 мкг/мл)	Амфотерицин В (1,2-19,5 мкг/мл)	Нистатин (3,5-30 мкг/мл)
1	53	> 312,5	31,2	18	> 19,5	> 30
2	26	> 312,5	62,5	20,1	> 19,5	> 30
3	26	> 312,5	62,5	17,25	> 19,5	> 30
4	13	> 312,5	31,5	28,7	> 19,5	> 30
5	13	> 312,5	31,2	18	> 19,5	> 30
6	26	> 312,5	62,5	17,25	> 19,5	> 30
X	26,1	> 312,5	46,85	19,8	> 19,5	> 30

Принимая во внимание, помимо ингибирующих свойств, спектр биологического действия, стоимость антибиотиков, удобство их растворения, для дальнейших испытаний взяли бацитрацин, тилозин, амфотерицин В и кристалвиолет.

Результаты оптимизации количественного соотношения указанных ингибиторов в жидкой питательной среде представлены в табл. 4 и 5. В качестве базовой жидкой питательной среды использовали среду с оптимизированным составом добавочных компонентов.

Из табл. 4 видно, что максимально близкий к контролю показатель выхода процесса наблюдали в среде №8; сходный с ним показатель - в среде № 1. Однако расчет эффектов (табл. 5) свидетельствует об оптимальности только компонентного состава среды №8 (кристалвиолет в разведении 1:1 000 000; бацитрацин - 220 мкг/мл; тилозин - 1 мкг/мл; амфотерицин В - 5 мкг/мл).

Таблица 4

**Схема планирования эксперимента для четырех факторов  
на четырех уровнях и накопление микробных клеток  
в 1 мл жидкой накопительной питательной среды**

№ варианта питательной среды	Кристалвиолет (разведения, г/мл)	Бацитрацин, мкг/мл	Тилозин, мкг/мл	Амфотерицин В, мкг/мл	М.к./мл $1 \times 10^9$
1	1:1200 000	55	1	20	1
2	1:1200 000	110	11	5	0,73
3	1:1200 000	165	16	15	0,59
4	1:1200 000	220	6	10	0,69
5	1:1000 000	110	6	20	0,9
6	1:1000 000	55	16	10	0,55
7	1:1000 000	165	11	15	0,59
8	1:1000 000	220	1	5	1,06
9	1:800 000	165	11	10	0,54
10	1:800 000	220	1	15	0,89
11	1:800 000	55	6	5	0,78
12	1:800 000	110	16	20	0,44
13	1:600 000	220	16	5	0,27
14	1:600 000	165	6	20	0,37
15	1:600 000	110	1	10	0,42
16	1 600 000	55	11	15	0,30
17	-	-	-	-	1,1 контроль

Таблица 5

### Влияние различных концентраций ингибиторов на накопление общего количества клеток *A. pleuropneumoniae*

Компоненты питательной среды	Содержание компонентов питательной среды на различных уровнях			
	I уровень	II уровень	III уровень	IV уровень
Кристалвиолет, г/мл эффект	$\frac{1:1200\ 000}{0,12}$	$\frac{1:1000\ 000}{0,15}$	$\frac{1:800\ 000}{0,03}$	$\frac{1:600\ 000}{-0,29}$
Бацитрацин, мкг/мл эффект	$\frac{55}{0,03}$	$\frac{110}{-0,01}$	$\frac{165}{-0,10}$	$\frac{220}{0,10}$
Тилозин, мкг/мл эффект	$\frac{1}{0,21}$	$\frac{6}{0,05}$	$\frac{11}{-0,09}$	$\frac{16}{-0,17}$
Амфотерицин В, мкг/мл эффект	$\frac{5}{0,08}$	$\frac{10}{-0,08}$	$\frac{5}{-0,04}$	$\frac{20}{0,05}$

### Сравнительная оценка ростовых свойств оптимальной жидкой и накопительной питательных сред

На данном этапе работы провели сравнительную оценку разработанных жидкой накопительной и базовой оптимальной питательных сред.

При культивировании на каждой из питательных сред определяли следующие параметры роста *A. pleuropneumoniae*: продолжительность лаг-фазы и экспоненциального роста, время генерации, чувствительность питательной среды. Также исследовали частоту диссоциации *A. pleuropneumoniae* на этих средах.

На рис. 2 представлены графики, выражающие зависимость количества колониеобразующих единиц (КОЕ) от времени культивирования в базовой и накопительной питательных средах.

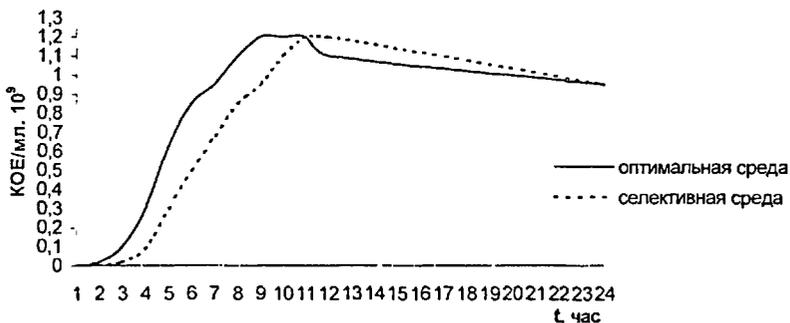


Рис. 2. Кривая роста *A. pleuropneumoniae* на оптимальной и селективной жидких питательных сред

При росте в оптимальной питательной среде лаг-фаза составляла два часа, экспоненциальная фаза занимала 7 ч, время генерации равнялось 1,01 ч. При развитии популяции на накопительной питательной среде отмечаются те же закономерности, но продолжительность лаг-фазы в среднем увеличивалась до трех часов, время генерации равнялось 1,35 ч; КОЕ достигает своего максимума на 1-2 ч позднее, чем на оптимальной среде.

Но, несмотря на некоторое отставание в росте во времени, количество колониеобразующих единиц на накопительной питательной среде в итоге достигает почти того же количества, что и на оптимальной питательной среде.

Чувствительность жидких оптимальной и накопительной питательных сред выясняли путем определения количества микробных клеток в одной и той же взвеси бактерий методом наиболее вероятных чисел (НВЧ) при посеве на эти среды. Чувствительность накопительной среды была на 13,4% меньше оптимальной, что для многих накопительных сред с выраженными селективными свойствами обычное явление.

Для изучения влияния ингибиторов жидкой накопительной питательной среды на частоту диссоциации *A.pleuropneumoniae* сопоставляли этот показатель при культивировании на жидких оптимальной и накопительной питательных средах. На оптимальной и накопительной питательных средах данный показатель в зависимости от штамма соответственно составил 2,2 % и 2,6 %, т.е. частота диссоциации *A.pleuropneumoniae* на сравниваемых средах существенно не отличалась.

### **Конструирование оптимальной плотной питательной среды для *A. pleuropneumoniae***

В качестве базовой среды использовали питательный агар производства НПО «Питательные среды» (г. Махачкала) на основе панкреатического гидролизата панциря криля. При выборе оптимальных соотношений в составе питательной среды дрожжевого экстракта, сыворотки крови крупного рогатого скота и глюкозы испытывали те же концентрации добавок, которые брали для жидкой питательной среды. Посевы инкубировали 20 ч при 37-38 °С.

Схема планирования опыта и полученные результаты представлены в табл. 6 и 7. По результатам данного исследования видно, что наибольшее накопление бактериальных клеток получено на средах № 6 и № 8. Однако оценка эффектов показала, что наивысшие их значения соответствуют содержанию в питательной среде дрожжевого экстракта и сыворотки крови на III уровне (5,5 %), а глюкозы на I уровне (0,1 %). Исходя из полученных результатов дополнительно была испытана питательная среда состава: глюкоза - 0,1 %, сыворотка крови и дрожжевой экстракт - 5,5 %. Плотная питательная среда данного состава обеспечила выход микробных

клеток в расчете на 1 мл среды выше, чем в питательных средах вариантов № 6 и № 8 -  $1,85 \times 10^9$  м.к./мл.

Таблица 6

**Схема планирования эксперимента для трех факторов на трех уровнях и выход бактериальных клеток *A. pleuropneumoniae* на 1 мл оптимальной плотной питательной среды**

№ варианта питательной среды	Дрожжевой экстракт, %	Сыворотка КРС, %	Глюкоза, %	М.к./мл $1 \times 10^9$
1	1,5	1,5	0,1	0,95
2	1,5	5,5	0,2	1,2
3	1,5	3,5	0,3	0,9
4	3,5	3,5	0,2	1,5
5	3,5	1,5	0,3	1,0
6	3,5	5,5	0,1	1,83
7	5,5	5,5	0,3	1,5
8	5,5	3,5	0,1	1,83
9	5,5	1,5	0,2	1,74

Таблица 7

**Влияние различных концентраций компонентов питательной среды на накопление общего количества клеток *A. pleuropneumoniae***

Компоненты питательных сред	Содержание компонентов питательной среды на различных уровнях		
	I уровень	II уровень	III уровень
Дрожжевой экстракт, %	1,5	3,5	5,5
эффект	-0,38	0,062	0,3
Сыворотка, %	1,5	3,5	5,5
эффект	-0,16	0,03	0,13
Глюкоза, %	0,1	0,2	0,3
эффект	0,16	0,09	-0,25

**Конструирование плотной селективной питательной среды**

В качестве базовой использовали оптимизированную плотную питательную среду. За основу был взят качественный состав и базовые уровни ингибиторов, использованные при конструировании жидкой накопительной питательной среды. Результаты исследований представлены в табл. 8 и 9.

Как видно, оптимальное соотношение антибактериальных веществ соответствует варианту среды №8, содержащей 220 мкг/мл бацитрацина; 1 мкг/мл тилозина; 5 мкг/мл амфотерицина В и кристалвиолета в разведении 1:1 000 000. Среда данного состава в наименьшей степени ингибирует рост *A.pleuropneumoniae*.

Таблица 8

**Схема опыта и результаты оптимизации количества антибактериальных веществ в плотной селективной питательной среде**

№ варианта питательной среды	Антибактериальные вещества				Накопление микробных клеток в расчете на 1 мл питательной среды $1 \times 10^9$ м.к./мл
	Кристалвиолет разведения, г/мл	Бацитрацин, мкг/мл	Тилозин, мкг/мл	Амфотерицин В, мкг/мл	
1	1:1200 000	55	1	20	1,72
2	1:1200 000	110	11	5	1,08
3	1:1200 000	165	16	15	0,74
4	1:1200 000	220	6	10	1,1
5	1:1000 000	110	6	20	1,15
6	1:1000 000	55	16	10	0,72
7	1:1000 000	165	11	15	0,83
8	1:1000 000	220	1	5	1,74
9	1:800 000	165	11	10	0,7
10	1:800 000	220	1	15	1,55
11	1:800 000	55	6	5	1,03
12	1:800 000	110	16	20	0,63
13	1:600 000	220	16	5	0,33
14	1:600 000	165	6	20	0,47
15	1:600 000	110	1	10	0,45
16	1:600 000	55	11	15	0,32
17	-	-	-	-	1,75(контр.)

**Влияние различных концентраций селективных факторов плотной питательной среды на накопление общего количества клеток *A. pleuropneumoniae***

Компоненты питательных сред	Содержание компонентов питательных сред на различных уровнях			
	I уровень	II уровень	III уровень	IV уровень
<u>Кристалвиолет</u> эффект	<u>1 1200 000</u> 0,25	<u>1 1000 000</u> 0,2	<u>1 800 000</u> 0,07	<u>1 600 000</u> -0,51
<u>Бацитрацин</u> эффект	<u>55</u> 0,04	<u>110</u> -0,08	<u>165</u> -0,23	<u>220</u> 0,27
<u>Тилозин</u> эффект	<u>1</u> 0,46	<u>6</u> 0,03	<u>11</u> -0,18	<u>16</u> -0,3
<u>Амфотерицин В</u> эффект	<u>5</u> 0,14	<u>10</u> -0,17	<u>15</u> -0,05	<u>20</u> 0,08

**Сравнительная оценка ростовых свойств оптимальной и селективной плотных питательных сред**

Учитывали скорость роста *A. pleuropneumoniae*, выход бактериальных клеток на 1 мл среды, чувствительность питательной среды и ее влияние на биологические свойства возбудителя.

Результаты исследований показали, что на оптимальной плотной среде макроскопически видимый рост возбудителя появляется через 6,5 - 7,0 ч, на селективной - через 7,5 - 8,0 ч.

Выход бактериальной массы на оптимальной среде составил  $1,8 \times 10^9$  м.к./мл, на селективной -  $1,75 \times 10^9$  м кУмл. Плотная селективная среда незначительно уступает оптимальной по чувствительности.

С целью изучения возможности сочетанного применения жидкой накопительной и плотной селективной питательных сред провели последовательные пассажи культур *A. pleuropneumoniae* (3 штамма) на жидкой и плотной селективных средах, а также на аналогичных средах без ингибиторов. На плотной селективной питательной среде через 20 - 24 ч инкубирования определяли в популяции процент колоний с признаками диссоциации и ферментативную активность субкультур, отвитых из S-колоний.

Результаты опытов показали, что процент колоний с признаками диссоциации составил 4,8 % после пассажей на оптимальных питательных средах, на селективных - 5,1 %. Таким образом, последовательное культивирование *A. pleuropneumoniae* на селективных средах обоих типов не приводило к существенному увеличению частоты диссоциации.

Ферментативная активность культур в результате последовательно-го пассажирования через жидкую и плотную селективные питательные среды не изменилась.

Были проведены исследования по приданию плотной селективной среде дифференциально-диагностических свойств в результате добавления в нее мочевины и индикатора фенолрота. Установлено, что включение в состав среды 10 мл 20%-ного раствора мочевины и 0,6 мл 0,2%-ного раствора фенолрота (на 100 мл среды) позволяет выявить колонии *A. pleuropneumoniae* через 20 ч инкубирования за счет экстрацеллюлярного выделения фермента уреазы (среда вокруг колоний розовеет).

### Изучение селективных свойств сконструированных жидкой и плотной питательных сред

На следующем этапе исследовали селективные свойства сконструированных жидкой и плотной питательных сред.

Для изучения селективных свойств жидкой среды сравнивали ее чувствительность с чувствительностью оптимальной жидкой питательной среды без ингибиторов для следующих бактерий: *P. multocida*; *S. typhimurium*; *E. coli*; *B. subtilis*; *S. aureus*. Чувствительность среды определяли посевом одной и той же культуры с вычислением количества КОЕ методом НВЧ. Количество микробных клеток конкретного вида бактерий в исходной культуре, определенное посевом в оптимальную среду, принимали за 100 %. Исходя из данного показателя, выражали в процентах содержание этого же вида бактерий в исходной культуре, установленное посевом в среду с ингибиторами. Культуру *S. albicans* высевали только на селективные среды.

Анализ полученных данных показал, что жидкая накопительная среда практически полностью ингибирует рост грамположительных бактерий (рис. 3) и дрожжеподобного гриба. В меньшей степени выражены селективные свойства по отношению к грамотрицательным бактериям из семейства энтеробактерий и существенны по отношению к *P. multocida*.

Количество м. к. в 1 мл  
исходной культуры бактерий, %

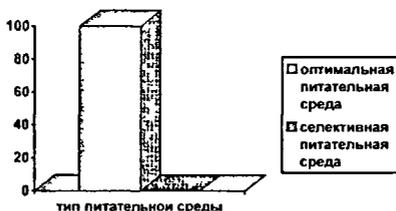


Рис. 3. Количество клеток *S. aureus* в исходной культуре, определенное посевом в жидкую селективную питательную среду

Определяли ингибирующие свойства селективной плотной питательной среды по отношению к грамотрицательным (*P.multocida*, *S.typhimurium*, *E.coli*) и грамположительным (*B.subtilis*, *S.aureus*) бактериям. Использовали те же штаммы, что и в предшествующем опыте. Выявлены аналогичные закономерности: полностью ингибирует рост бацилл, стафилококков и *S.albicans*, значительно угнетает рост *P.multocida* и в небольшой степени подавляет рост *S.typhimurium* и *E.coli*.

На следующем этапе исследовали селективные свойства сконструированной жидкой питательной среды путем культивирования в ней *A. pleuropneumoniae* в смешанной культуре с другими видами бактерий.

С указанной целью штаммы *A. pleuropneumoniae* засевали в виде чистой культуры и в сочетании с *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. multocida*, *E. coli*, *S.typhimurium* в жидкую оптимальную и накопительную питательные среды. В процессе культивирования, через 6, 8, 10, 12, 24 и 48 ч производили подсчет КОЕ *A. pleuropneumoniae* в чистых и смешанных культурах. Результаты некоторых опытов представлены на рис. 4 и 5.

КОЕ/мл *A.pleuropneumoniae*  
( $1 \times 10^3$ )



Рис. 4. Влияние *S.aureus* на рост *A.pleuropneumoniae* в жидкой оптимальной питательной среде

Результаты опытов показали, что испытанные гетерологичные виды бактерий в смешанных культурах на оптимальных жидких питательных средах тормозят рост *A.pleuropneumoniae*.

КОЕ/мл *A. pleuropneumoniae*  
( $1 \times 10^8$ )



Рис. 5. Влияние *S.aureus* на рост *A.pleuropneumoniae* в жидкой накопительной питательной среде

Использование жидкой накопительной питательной среды позволяет практически полностью избежать антагонистического влияния грамположительных бактерий. Для минимизации отрицательного влияния на рост *A. pleuropneumoniae* грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. multocida*), высев из жидкой накопительной среды на плотную, по нашему мнению, целесообразно проводить через 7 - 8 ч инкубирования, т.е. в конце фазы логарифмического роста

#### **Результаты испытания сконструированных селективных питательных сред для выделения *A. pleuropneumoniae* из животных тканей**

С целью изучения влияния на рост *A. pleuropneumoniae* бактерий, наиболее часто обнаруживаемых в верхних дыхательных путях, мы подвергли бактериологическому исследованию миндалинам 19 клинически здоровых убойных свиней. По одной схеме исследования тканевый гомогенат инкубировали в течение 8-9 ч в жидкой питательной среде без ингибиторов и затем рассеивали на аналогичную плотную питательную среду. По второй схеме материал последовательно культивировали на жидкой и плотной селективных питательных средах. Результаты исследований представлены в табл. 10

Как видно, в миндалинах убойных свиней обнаруживаются с различной частотой представители 14 родов бактерий. При использовании жидкой накопительной и плотной селективной питательных сред полностью подавляется рост грамположительной микрофлоры, увеличивается частота изоляции актинобацилл

**Результаты бактериологического исследования миндалин убойных свиней (n= 19)**

Род или вид бактерии	Схема посева материала и количество выделенных культур бактерий			
	Сывороточно-дрожжевой бульон, высев на плотную оптимальную среду		Накопительная жидкая питательная среда, высев на плотную селективную среду	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Micrococcus sp.</b>	3	15,7	-	-
<b>Staphylococcus sp.</b>	19	100	-	-
<b>Streptococcus sp.</b>	16	84,2	-	-
<b>α- и β-гемолитич.</b>				
<b>Bacillus sp.</b>	3	15,7	-	-
<b>Corynebacterium sp.</b>	6	31,6	-	-
<b>E.rhusiopathiae</b>	1	5,3	-	-
<b>E.coli</b>	6	31,6	6	31,6
<b>Actinobacillus sp.</b>	3	15,7	5	26,3
<b>Haemophilus sp.</b>	1	5,3	0	-
<b>Bordetella sp.</b>	1	5,3	2	10,5
<b>Klebsiella sp.</b>	2	10,5	2	10,5
<b>Enterobacter sp.</b>	1	5,3	1	5,3
<b>Neisseria sp.</b>	2	10,5	2	10,5
<b>Pasteurella sp.</b>	2	10,5	1	5,3

Для исследования характера действия микрофлоры естественных микробиоцинозов миндалин на рост *A.pleuror pneumoniae* тканевый гомогенат миндалин от пяти животных с наиболее типичной микрофлорой (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Actinobacillus sp.*, *Pasteurella sp.*, *E.coli*) искусственно контаминировали *A.pleuror pneumoniae*. Затем такой материал вносили в жидкие селективную и неселективную питательные среды, инкубировали 7 ч и высевали из накопительной среды на плотную селективную, а из обычной жидкой среды на плотную среду без ингибиторов. Из 5 проб, посеянных на оптимальные среды без ингибиторов, *A.pleuror pneumoniae* выделили в 20 % случаев, из тех же проб на селективных питательных средах *A.pleuror pneumoniae* выделили в 100 % случаев.

Как видно, бактериальная микрофлора миндалин при культивировании на оптимальных питательных средах без селективных факторов, существенно подавляет рост возбудителя, и при заведомом наличии в материале *A.pleuror pneumoniae* реизолировать культуру удастся не всегда. Таким образом, применение селективных питательных сред значительно увеличивает вероятность выделения *A.pleuror pneumoniae* из материала, контаминированного сопутствующей микрофлорой.

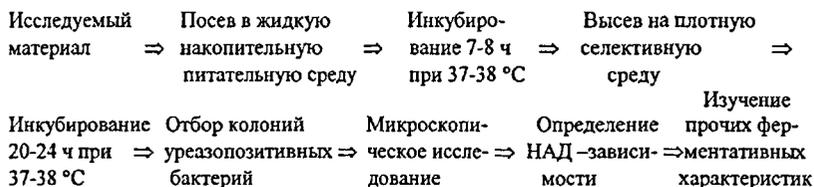
На следующем этапе испытывали разработанные селективные питательные среды для выделения *A. pleuropneumoniae* из материала от свиней, больных пневмонией (n=23). Результаты этих исследований приведены в табл.11. Как видно, максимальное количество культур *A. pleuropneumoniae* было изолировано из различных материалов по схеме исследования с посевом в накопительную жидкую питательную среду и последующим высевом через 7-8 ч инкубирования на плотную селективную среду. При исследовании миндалин и бронхиальной слизи частота изоляции *A. pleuropneumoniae* в этом случае увеличивается в 1,8 раза.

Таблица 11

**Результаты бактериологического исследования материалов от свиней с поражениями легких**

Характер исследуемого материала	Кол-во проб	Схема бактериологического исследования и количество выделенных культур <i>A. pleuropneumoniae</i>					
		Кровяной агар с "кормилкой"		Плотная селективная среда		Жидкая накопительная питательная среда с последующим высевом на плотную селективную среду	
		Схема I		Схема II		Схема III	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Пораженная легочная ткань	23	8	34,8	8	34,8	10	43,5
Бронхиальная слизь	23	5	21,7	6	26,1	9	39,1
Миндалины	11	4	36,4	5	45,5	8	72,7
<b>Всего</b>	<b>57</b>	<b>17</b>	<b>29,8</b>	<b>19</b>	<b>33,3</b>	<b>27</b>	<b>47,4</b>

Полученные результаты позволяют рекомендовать для выделения *A. pleuropneumoniae* из контаминированного посторонней микрофлорой материала сконструированные нами жидкую накопительную и плотную селективную питательные среды по схеме, приведенной ниже.



**Рис. 6. Схема бактериологического исследования контаминированного материала для выделения *A. pleuropneumoniae* с применением селективных питательных сред**

## ВЫВОДЫ

1. Наиболее пригодны в качестве основы при конструировании селективных питательных сред для культивирования *A. pleuropneumoniae*, из числа испытанных отечественных коммерческих сред, питательный бульон на основе панкреатического гидролизата кильки и питательный агар на основе панкреатического гидролизата панциря крыля производства НПО «Питательные среды», г. Махачкала.

2. Результаты исследования показали, что оптимальное содержание добавочных ростовых компонентов в базовом питательном бульоне следующее: дрожжевой экстракт и сыворотка крови крупного рогатого скота - 3,5 % (объем/объем), глюкоза - 0,2 % (вес/объем); в питательном агаре дрожжевой экстракт и сыворотка крови крупного рогатого скота - 5,5 % (объем/объем), глюкоза - 0,1 % (вес/объем).

3. В качестве ингибиторов посторонней микрофлоры в жидкие и плотные селективные питательные среды для *A. pleuropneumoniae* следует добавлять бацитрацин (220 мкг/мл), тилозин (1 мкг/мл), амфотерицин В (5 мкг/мл), кристалвиолет (1:1 000 000).

4. Для придания плотной селективной среде дифференциально-диагностических свойств в нее целесообразно вносить мочевины (10 мл 20 %-ного раствора) и фенолрот (0,6 мл 0,2 %-ного раствора), что позволяет дифференцировать колонии *A. pleuropneumoniae* от уреазонегативных бактерий.

5. Разработанные селективные питательные среды целесообразно использовать для выделения *A. pleuropneumoniae* по следующей схеме: посев исследуемого материала в накопительную питательную среду, инкубирование 7-8 ч при 37-38 °С, высев смешанной культуры на плотную селективную среду, инкубирование 20-24 ч, отбор колоний уреазопозитивных бактерий с последующим изучением свойств отвитых культур по стереотипной схеме.

6. Сконструированные селективные питательные среды при исследовании контаминированного посторонней микрофлорой материала (миндалины, бронхиальная слизь) позволяют увеличить частоту изоляции *A. pleuropneumoniae* в 1,8 раза.

## СВЕДЕНИЯ О ПРАКТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработаны и используются в учебном процессе:

1. Методы лабораторной диагностики пастереллеза и актинобациллезной пневмонии свиней: Методические указания к лабораторным занятиям для студентов специальности 310800 - Ветеринария. М.: МГУПБ, 2003.

2. Бактериологическая диагностика актинобациллезной пневмонии свиней с применением селективных питательных сред: Методические указания к самостоятельной работе для студентов специальности 310800 - Ветеринария. (Рассмотрены и одобрены на заседании Ученого совета ветеринарно-санитарного факультета МГУПБ от 24 декабря 2003 г., протокол № 3).

### **РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ**

Для выделения *A.pleuror pneumoniae* из контаминированного посторонней микрофлорой материала рекомендуем применять разработанные накопительную и плотную селективные питательные среды.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЕРТАЦИИ**

1. Карабанова О.В. Оптимизация состава питательных сред для культивирования *Actinobacillus pleuror pneumoniae* // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: Материалы международной научно-практической конференции. - Шелково, 2003. С. 88 -89.

2. Карабанова О.В. Разработка жидкой и плотной питательных сред с селективными свойствами для культивирования *Actinobacillus pleuror pneumoniae* // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: Материалы международной научно-практической конференции. - Шелково, 2003. С.90 - 92.

3. Скородумов Д.И., Карабанова О.В., Родионова К.П., Костенко Т.С. Дифференциация культур *Actinobacillus pleuror pneumoniae* второго биовара и сходных видов бактерий, выделяемых от убойных свиней // Все о мясе.2003,№2.С.37-39.

4. Скородумов Д.И., Родионова К.П., Карабанова О.В. Методы лабораторной диагностики пастереллеза и актинобациллезной пневмонии свиней // Методические указания к лабораторным занятиям для студентов специальности 310800-Ветеринария. - М.: МГУПБ, 2003.

Подписано в печать 12.01 2004. Печать лазерная.  
Объем 1,5 п.л. Тираж 100 экз Заказ 13 .  
ГУПП «Печатник» 109316, Москва, ул. Талалихина, 33.



**№ - 2131**

РНБ Русский фонд

2004-4

27456