

ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА "ЦЕФТИОКЛИН" НА *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МОЛОКА КОРОВ

Магистр ветеринарной медицины, А. Г. Левченко
Сумской национальный аграрный университет
E-mail: AnnLevchenko22.12@gmail.com

EFFECTS OF DRUG "CEFTIOKLIN" ON *ESCHERICHIA COLI*, ISOLATED FROM MILK COWS

Master of Veterinary Medicine, Levchenko A. G.
Sumy National Agrarian University
E-mail: AnnLevchenko22.12@gmail.com

Аннотация: Для лечения маститов бактериальной этиологии используется широкий спектр ветеринарных препаратов противомаститного действия, но большинство из них малоэффективны или дорогие. Впервые разработан отечественный антибактериальный препарат на основе цефтиофура гидрохлорида ("Цефтиоклин") для терапии мастита бактериальной этиологии у коров. Это позволяет получать молоко, которое не содержит остатков опасных веществ. Методом электронной микроскопии ("РЭМ – 106 И") изучали характер изменения клеточной стенки, размеров и формы культуры *Escherichia coli*, на которую действовали препаратом "Цефтиоклин" *in vitro*.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, цефтиофур гидрохлорид, мастит, бактериальная этиология, молоко, *in vitro*, антибактериальный препарат.

Annotation: For the treatment of mastitis using a number of different veterinary drugs anti-mastite action, but a number of them are ineffective or expensive. Domestic first antibiotic developed based ceftiofur hydrochloride ("Ceftioklyn") for the treatment of bacterial mastitis in cows etiology. This enables you to get milk that does not contain residues of hazardous substances. The method of electron microscopy ("SEM-106") examined changes in the nature of the cell wall, the size and shape cultures *Escherichia coli*, which operated drug "Ceftioklyn" *in vitro*.

Key words: *Escherichia coli*, ceftiofur hydrochlorid, mastitis, bacterial etiology, milk, *in vitro*, the antibacterial drug.

Актуальность темы: Сегодня, в пищевом балансе людей молоко и молочные продукты стали едва ли не самыми главными, а с точки зрения полного набора необходимых питательных веществ и объемов потребления – определяющими и влияющими на здоровье нации в целом. По данным организаций здравоохранения, молоко и молочные продукты должны составлять не менее 50 % в питании человека [1].

Обеспечение населения Украины высококачественной молочной продукцией является важной задачей. Особое значение приобретают меры, направленные на повышение продуктивности коров и получения достаточного количества молока-сырья. Важнейшую роль в решении этих задач должны играть меры, направленные на обеспечение производства молока, которое должно соответствовать международным стандартам качества и безопасности, быть свободным от остатков токсических веществ и патогенных микроорганизмов [2].

Одним из факторов, который существенно снижает производство молока, есть заболевание коров на мастит, которое вызывает снижение молочной продуктивности (до

40 %), сокращают продуктивный возраст коров (на 2 – 2,5 года) и количество рожденных телят.

Молоко – благоприятная среда для развития микрофлоры, что приводит к развитию мастита и ухудшение качества молока [4]. Другая проблема, связанная с маститом – наличие ингибирующих веществ в молоке во время и после лечения больных животных. Основная доля этих веществ приходится на антибиотики, которые содержатся в комплексных противомаститных препаратах и широко применяются в ветеринарной практике.

Их наличие в молоке приводит к развитию у потребителей аллергии, анафилактики, дисбактериоза, отравлений, а в молочной промышленности – к нарушению технологических процессов при производстве кисломолочных продуктов [5, 6].

Согласно с этим, актуальным является изучение и применение новых препаратов при разработке методов лечения больных маститом животных, получению высококачественного и безопасного для человека молока, максимальному восстановлению молочной продуктивности.

Цель исследования: действие препарата "Цефтиоклин" *in vitro* в отношении возбудителя *Escherichia coli*, выделенного из молока коров больных маститом бактериальной этиологии.

Задачи исследования: установить действие препарата "Цефтиоклин" на бактериальную клетку *Escherichia coli* по модифицированной методике электронной микроскопией.

Объект исследования – патология молочной железы коров.

Предмет исследования – *Escherichia coli* под действием препарата "Цефтиоклин" *in vitro*.

Методы исследования: микробиологический, электронномикроскопический.

Применен модифицированный нами метод для исследования с помощью электронной микроскопии характера изменений клеточной стенки, размеров и формы культуры *Escherichia coli* *in vitro* при действии препарата «Цефтиоклин».

Материалы и методы: С помощью электронной микроскопии на приборе "РЭМ –106 И" изучали характер изменений клеточной стенки, размеров и формы культур *Escherichia coli*, на который действовали препаратом "Цефтиоклин" *in vitro*. Для исследования использовали суточную культуру *Escherichia coli*, которую выделяли от коров, больных маститом. Стандартные разведения культур, изучаемых готовили по схеме: сначала делали посева на МПА, выдерживали в термостате при температуре 37 °С 16 – 18 часов. В пробирку с дистиллированной водой вносили хорошо изолированную колонию микроорганизмов и по стандарту мутности 0,5 ЕД McFarland определяли концентрацию микробных клеток в 1 см³. Концентрация в 1 см³ составляла *Escherichia coli* 42,0 ± 0,3 КОЕ/см³. Концентрацию микроорганизмов определяли путем посева десятикратных разведенных суспензии культуры на МПА.

Весь процесс разделили на 5 этапов: 1. Подготовка образцов для электронномикроскопического исследования по общепринятой методике (Уикли К., 1975 г.) в нашей модификации (подбирали оптимальное время фиксации и интенсивность оборотов центрифугирования). В каждую пробирку в равном соотношении (1 см³) 1: 1: 1 вносили дистиллированную воду, суспензию *Escherichia coli* и препарат "Цефтиоклин". Время экспозиции данной смеси было 5 и 20 минут, соответственно для каждого возбудителя, встряхивая каждые 15 – 20 секунд пробирки.

Для контроля в равном соотношении 1:1 вносили дистиллированную воду и разведенную смыв с агаровой культуры *Escherichia coli*.

2. Фиксация микроорганизмов. Проводили в 4 этапа:

2.1. Предварительно готовили глютаральдегидный фиксатор на фосфатном буфере Миллонига.

2.2. Процесс фиксации микроорганизмов. Образцы микроорганизмов после центрифугирования, заливали фиксатором, после чего центрифугировали, надосадочную жидкость сливали. После этого меняли фиксатор.

2.3. Отмывка от фиксатора: образцы микроорганизмов после центрифугирования заливали буфером, суспендировали и центрифугировали. Надосадочную жидкость сливали, проводили обезвоживание микроорганизмов.

2.4. Проводка по спиртам (добавляли в соотношениях 1:10 50%, 60%, 70%, 80% спирты, выдерживали по 5 минут, после чего надосадочную жидкость сливали в эксикатор. Вносили 96 % спирт, центрифугировали, надосадочную жидкость сливали. Вносили 100 % спирт, выдерживали 15 минут после чего центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, оставляя несколько капель для получения суспензии для дальнейшего нанесения на двустороннюю липкую углеродистую ленту (рис. 1).

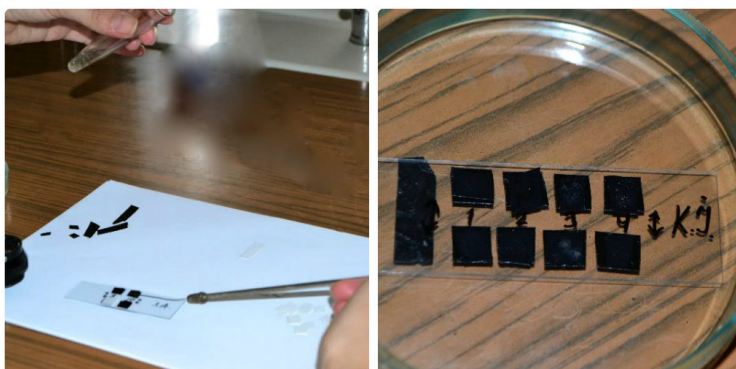


Рис.1. Процесс нанесения (слева) и нанесены микроорганизмы (справа) на столики с двусторонней липкой углеродистой лентой

После нанесения на двустороннюю липкую углеродную ленту, проводили напыление серебром на "ВУП – 5М", исследуемых микроорганизмов. Далее микроскопирование на приборе "РЭМ – 106 И".

Результаты исследований: При электронной микроскопией обнаружили, что бактериальные клетки расположены отдельно друг от друга в несколько слоев, форма клеток палочковидная, края клеток закруглены. Длина и ширина бактериальных клеток соответствует показателям этого вида (рис. 2 а). Все бактериальные клетки, которые есть в поле зрения целые, поверхность гладкая, нет признаков повреждения. Все перечисленные признаки соответствуют норме.

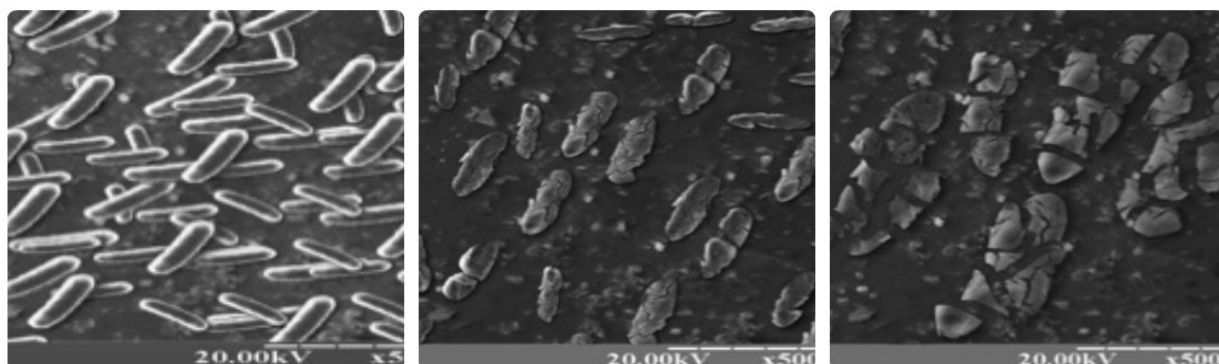


Рис. 2. *Escherichia coli* под электронным микроскопом

Примечание: * - а – норма, б – микроорганизмы после 5-минутной, в – микроорганизмы после 20-минутной экспозиции с препаратом "Цефтиоклин"

На рис. 2 б представлена электронная структура культуры *Escherichia coli*, которая находилась 5 минут под действием цефтиофура гидрохлорида. Количество бактериальных клеток уменьшилась, они расположены только в один слой отдельно друг от друга. Практически все клетки в поле зрения сохраняют палочковидную форму с закругленными краями. Размер клеток увеличился из-за частичного разрушения клеточной стенки, в которой хорошо видно продольные и поперечные трещины. Причем в части клеток количество трещин велика, что свидетельствует о частичном или полном отшелушивании клеточной стенки, а часть клеток поделена поперечными трещинами на 2 – 3 фрагмента. Фон фотографии содержит элементы неправильной формы, которые, на наш взгляд, являются обломками разрушенных бактериальных клеток (клеточный детрит). Все перечисленные признаки свидетельствуют о разрушении бактерий под действием препарата.

На рис. 2 в представлена электронная структура культуры *Escherichia coli*, которая находилась 20 минут под действием цефтиофура гидрохлорида. В поле зрения нет целых бактериальных клеток, а только их обломки. Некоторые обломки клеток находятся близко друг к другу, что позволяет сделать вывод о палочковидной форме разрушенных бактерий. Разрушение бактериальных клеток полное, так как некоторые элементы клеток полностью отделены друг от друга, причем количество таких элементов, которые образовались из одной клетки, колеблется от 3 – 4 до 10-и. Фон фотографии содержит большое количество элементов неправильной формы, которые являются обломками разрушенных бактериальных клеток. Все перечисленные признаки свидетельствуют о полном необратимом разрушении бактерий под действием препарата.

Таким образом, препарат "Цефтиоклин" после пяти и 20-минутной экспозиции разрушает возбудитель *Escherichia coli* полностью, в поле зрения нет целых бактериальных клеток. Все перечисленные признаки свидетельствуют о полном необратимом разрушении бактерий под действием данного препарата.

Вывод:

Электронной микроскопией по усовершенствованной нами методике установлено, что препарат "Цефтиоклин" после пятиминутной экспозиции приводит к изменению морфологии кишечной палочки, которые проявляются деформацией стенки возбудителя, а 20-минутное действие препарата разрушает возбудителя полностью.

Использованная литература:

1. Дойтц А. Здоровье вымени и качество молока / А. Дойтц, В. Обритцхаузер // Диагностика. Профилактика. Лечение болезней: практическое пособие. – К. : Агро Медиен Украина, 2010. – С.19.
2. Найкус Т. Досвід боротьби з маститом корів в Україні за допомогою вакцини Старвак / Т. Найкус // Сучасна ветеринарна медицина. – № 4. – 2013 – С. 42.
3. Biggadike H. J. Evaluations of measurements of the conductivity of quarter milk samples for early diagnosis of mastitis / H. J. Biggadike, I. Ohstad, R. A. Laven // Veterinary Record. – 2002. – Vol. 150, N 21. – P. 655 – 658.
4. Краевский А. И. Бактериальный мастит у коров: Монография / А. И. Краевский, М. В. Рубленко, Г. П. Дюльгер. – Сумы, 2014. – С.12 – 29.
5. Лікування корів, хворих на мастит/В. Б. Борисевич, Б. В. Борисевич, В. Г. Каплуненко та ін.//Ветеринарна медицина України. – 2009. – № 7. – С. 20 – 22.
6. Фотіна Т. І. Визначення гострої токсичності препарату "Цефтиоклин" в експерименті./Т. І. Фотіна, А. Г. Левченко/Аграрний вісник причорномор'я. – Одеса, 2013. – Випуск 68. – С. 291 – 297.

Відомості про автора

а) прізвище, ім'я, по-батькові: Левченко Анна Григорівна

б) науковий ступінь: к.вет.н.

в) місце роботи: СНАУ, факультет ветеринарної медицини, кафедра епізоотології та паразитології

г) адреса для листування: 40000, Україна, м. Суми, вул. Г. Кондратьєва, 160, к. № 3, кафедра епізоотології та паразитології