

УДК 619:618.162/.163-008.87:636.1

ЗАВАДСЬКА М.І., здобувач

ГАЛАТЮК О.Є., д-р вет. наук, **СОЛОДКА Л.О.**, канд. біол. наук

Житомирський національний аграрний університет

e-mail: zavadskamary@gmail.com

МІКРОФЛОРА СТАТЕВИХ ШЛЯХІВ КОБИЛ ЯК ІНДИКАТОР ОТРИМАННЯ ЗДОРОВИХ ЛОШАТ

Виявлено, що до складу мікробної асоціації статевих шляхів окремих кобил входять потенційно-патогенні ентеробактерії з надмірною інтенсивністю росту. Виділені ізоляти є імуногенними для організму тварин, що призводить до утворення антитіл у високих титрах. Зазначені потенційно небезпечні мікроби ефективно знешкоджуються антибіотиками ряду аміноглікозидів, цефалоспоринів та фторхінолонів.

Ключові слова: мікробна асоціація статевих шляхів, анаеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми, культуральні та морфологічні ознаки ізолятів, антигени, антибіотикочутливість.

Постановка проблеми. Конярство має високу рентабельність лише за умови отримання здорового, життєздатного молодняка. На здоров'я лошади впливає не тільки генофонд батьків, але й мікробний пейзаж статеві системи кобили. Бактерії та актиноміцети матері заселяють шлунково-кишковий тракт і дихальну систему новонародженого під час проходження ним родових шляхів. Наявність в складі мікрофлори потенційно-патогенних видів сприяє перевантаженню незрілої імунної системи тварин, захворюванню або загибелі молодняка.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Нерезультативне осіменіння кобил і народження нежиттєздатного молодняка є актуальними проблемами для конегосподарств України. Завдяки проведенню комплексних досліджень – газорідинної хроматографії клітинних ліпідів, генетичної паспортизації та біохімічної ідентифікації домінуючих культур – виявлено, що мікробний пейзаж шлунково-кишкового тракту новонароджених майже на 100% збігається зі спектром мікробів в родових шляхах матери [1,2]. Стандартними резидентними мікробами статевих шляхів кобил є представники родів *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Corinebacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium*, серед яких переважають анаероби. Потенційні патогени – це факультативно-анаеробні паличкоподібні бактерії (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella oxytoca*, *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus spp.*), кулясті бактерії (*Staph. aureus* та *Staph. albus*, *Strep. faecalis* та *Strept. zooepidermicus*), звивисті бактерії *Tayorella equigenitalis*, дріжджі *Candida albicans*, аеробні мікроскопічні гриби та актиноміцети [3-6]. За дисбіозу статевих шляхів кількісна частка аеробних мікроорганізмів збільшується приблизно в 3 рази.

Важливим і актуальним питанням і для вчених, і для практиків є питання підтримки гомеостазу і вибору ефективних протимікробних засобів для елімінації потенційних патогенів [7]. Використання необґрунтованих схем лікування може призвести до знищення корисних мікроорганізмів, появи резистентних штамів, що в майбутньому принесе величезні збитки.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – встановлення потенційної небезпечності представників мікробної асоціації статевих шляхів кобил для попередження появи слабких лошади в конегосподарствах України. Завданням роботи було виявлення кобил репродуктивного віку зі значним обсіменінням статевих шляхів, виділення відповідних мікробних культур, перевірка їх антигенності та антибіотикочутливості.

Матеріал і методика дослідження. Культури бактерій, які були виділені зі змивів статевих органів кобил 2002 та 2004 років народження в конегосподарстві «Райз-Максимко» (с. Нагірнянка Чортківського району, Тернопільська обл.), досліджували на кафедрі мікробіології, вірусології та епізоотології факультету ветеринарної медицини ЖНАЕУ. Суспензії мікроорганізмів висівали на загальні та диференційно-діагностичні середовища. На м'ясо-пептонному агарі (МПА) виділяли представників морфологічної групи бактерій, а на агарі Ендо та вісмут-сульфіт агарі (ВСА) – ентеробактерії. Надалі описували колонії накопичувальних культур та проводили мікроскопічні дослідження; виділяли чисті культури та накопичували біомасу бактерій для виготовлення антигенів; перевіряли їх антигенність в реакції мікроаглютинації із сироватками крові дослідних кобил та антибіотикочутливість ізолятів диско-дифузійним методом.

Результати досліджень та їх обговорення. Першим завданням роботи був пошук ефективної методики, яка б дозволила виділити з одного зразка максимальну кількість мікробів різних груп, родів та видів. Тому для отримання накопичувальних культур факультативно-анаеробних мікроорганізмів на ряд зазначених вище середовищ були зроблені первинні висіви (у кількості 0,1 см³). Кількість колонієутворювальних одиниць (КУО) в накопичувальних культурах від різних тварин значно відрізнялась (табл. 1).

Таблиця 1 – Кількість колоній, виділених від тварин

Тварина	Кількість КУО / см ³ на МПА		Кількість КУО/см ³ на агарі Ендо	
	поверхневі	глибинні	поверхневі	глибинні
Фотохімія, 2002 р.	1770 шт.	10660 шт.	535 шт.	500 шт.
Багама, 2004 р.	510 шт.	3410 шт.	360 шт.	410 шт.
Тайна, 2002 р.	95 шт.	16585 шт.	3 шт.	0 шт.

Наявність глибинних колоній не викликала значного занепокоєння, адже фізіологічно в 1 г піщового слизу містяться мільярди анаеробних мікробів. Проблему могли представляти тільки аеробні представники консорціуму, кількість яких відрізнялась у окремих тварин в 160-170 разів.

Найбільше нас зацікавили домінуючі культури, які добре розвивались на поверхні агару Ендо і могли належати до умовно-патогенних ентеробактерій (ізоляти – К1, П1 та Р1). Концентрично-кільцеві, вростаючі в агар, колонії культури К1 мали не зовсім правильну форму, кратероподібний профіль, нерівний з піднятим валом та випинами край, інтенсивно пігментований в рожевий колір плаский центр та опущену периферію, розмір 1-3 мм. Культура П1 була представлена округлими, гладенькими, блискучими, напівпрозорими, біло-рожевими, з темним центром і прозорим валом по краю, колоніями, розміром 2-5 мм. Колонії ізоляту Р1 були слизуваті, блискучі, непрозорі, гладенькі, мали інтенсивно рожевий колір, нерівні краї та щільний центр.

Матеріал із колоній накопичувальних культур пересівали на МПА, агар Ендо і ВСА. Зовнішній вигляд і отриманих штрихів, і колоній дозволив стверджувати, що всі ізоляти належали до різних видів. На МПА штрихи відрізнялись блиском, слизуватістю поверхні, формою країв. Принциповою відмінністю росту на ВСА були інтенсивність забарвлення в коричневий колір, вигляд центральної частини штриха та форма їх країв (рідкі лопастні вирости у Р1, часті – у К1, гладенький край – у П1).

Кількість колоній у висівах дозволяла припустити, що імунна система дослідних тварин не в змозі легко знищити бактерії. У разі дії на тварин стрес-факторів різної етіології саме вони можуть відігравати певну роль у розвитку патологічних процесів у статевій системі кобил. Для відповіді на питання щодо імуногенності виділених ізолятів проводили реакцію аглютинації (РА), за якої антигени із чистих культур взаємодіяли з антитілами (АТ) сироваток крові окремих кобил із конегосподарства. Через 14-16 годин після змішування реагентів в лунках, де зв'язались 50% антитіл з 50% антигенів, були виявлені певні титри АТ (табл.2).

Якби зазначені бактерії були транзитними або корисними мікробами, величини титрів мали знаходитись в межах 0-1:50. Виявлення значної кількості титрів на рівні 1:400 – 1:800 (57% для Р1; 58 % для К1, 92% для П1) показує потенційну небезпечність бактерій для тварин, свідчить про обов'язкове формування імунної відповіді за умов їх проникнення в організм кобил.

Таблиця 2 – Антигенність виділених ізолятів ентеробактерій

Дослідні тварини	Титр антитіл до виділених бактеріальних культур в сироватках крові дослідних тварин		
	Ізолят №1, К1 кільцева концентрична	Ізолят №2, Р1 рожева	Ізолят № 3, П1 прозора
Фархада 2003	1:200	1:200	1:400
Зархана 2005	1:200	1:400	1:800
Бархатна 2005	1:200	1:400	1:800
Герга 2005	1:100	1:800	1:800
Булава 2000	1:100	1:400	1:400
Фогохімія 2002	1:400	1:200	1:200
Трахея 2003	1:400	1:200	1:400
Біва 2000	1:400	1:400	1:400
Братіслава 2002	1:800	1:400	1:800
Гербера 2002	1:400	1:200	1:800
Тайна 2002	1:400	1:400	1:400
Кагорга 2003	1:400	1:400	1:400

Прогнозована небезпечність виділених ізолятів робить доцільним визначення їх антибіотико-чутливості диско-дифузійним методом (ДДМ). Висновки про дієвість антибіотиків різних фармакологічних груп (пеніциліни, цефалоспорини, тетрацикліни, аміноглікозиди, лінкозаміди, фторхінолони та нітрофурані), були зроблені після зіставлення діаметрів зон пригнічення росту чистих культур ізолятів з нормативними діаметрами зон для кожного антибіотика (табл. 3).

Ізоляти демонстрували різну інтенсивність появи стабільних мутантних штамів: у К1 та П1 мутації відбувались у випадку 2-х антибіотиків, а у Р1 – у випадку п'яти. Нечутливість окремих культур проявлялась, в основному, до бензилпеніциліну, поліміксину, фуразолідону та лінкоміцину. Таким чином, із 12 випробовуваних препаратів для ізоляту К1 ефективними виявились 58%, для П1 – 50%, а для Р1 – 33%. В нашому досліді на всі три культури ефективно діяли аміноглікозиди (гентаміцин та канаміцин), цефалоспорини (цефтріаксон) та фторхінолони (енрофлоксацин). Відомо, що антибіоти-

ки, вибрані для впливу на мікроорганізми, мають бути зручними для застосування, здатними створювати високий протимікробний ефект в мінімальних дозах, бути нетоксичними та сумісними. Тому оптимальним комплексом, який можна за потреби використовувати для лікування дисфункцій статевої сфери кобил, пов'язаних з надмірним розвитком умовно-патогенної мікрофлори, є поєднання енрофлоксацину (фторхінолони) та гентаміцину (аміноглікозиди).

Таблиця 3. – Діаметри зон затримки росту ізолятів ентеробактерій за результатами випробувань антибіотико-чутливості диско-дифузійним методом

№ п/п	Культура	Діаметри зон затримки росту бактерійних ізолятів (M±m), мм											
		Бензилпеніцилін	Цефтріаксон	Цефалотин	Стрептоміцин	Канаміцин	Гентаміцин	Ципрофлоксацин	Енрофлоксацин	Поліміксин	Лінкоміцин	Тетрациклін	Фуразолідон
1	K1	16±1,0	34±1,5	34±2,5	23,7±2	41±1,8	22±2,2	36±3,5	44,7±4	0	21±1,8	20,7±2	0
2	П1	0	41±3,2	20±0,5	26±2,8	23±2,5	30±2,5	37±2,0	40±2,0	16±2,5	17,5±1	0	11±1,5
3	P1	0	30,3±1	0	0	26±2,0	21,5±2	21±1,5	31,3±2	12,7±1	0	0	16,7±2
Д норм. для пом.-чутл. мікробів, мм			14-20	15-18	12-14	14-17	13-14	16-20	18-21	12-14	18-20	15-18	15-17
Д норм. для чутливих мікробів, мм		29	21	19	15	18	15	21	22	15	21	19	18

Висновки

1. За встановлення мікробного пейзажу статевих шляхів кобил висів зразків на МПА дозволяє виявити тварин з максимальним обсіменінням статевих шляхів, а на агар Ендо чи ВСА – виділити з мікробного консорціуму факультативно-анаеробних представників родини ентеробактерій.

2. Реєстрація в РА титрів антитіл до виділених ізолятів ентеробактерій на рівні 1:400 – 1:800 свідчить про їх потенційну небезпечність для тварин .

3. На ізоляти ентеробактерій ефективно діють аміноглікозиди (гентаміцин та канаміцин), цефалоспорины (цефтріаксон) та фторхінолони (енрофлоксацин), які і слід застосовувати для попередження дисфункцій статевої системи кобил в господарстві.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Никонюк Т.Р. Бактериальный вагиноз. Современные подходы к диагностике и лечению// Т.Р. Никонюк, В.О. Бенюк // Медицина сегодня. – 2007. – №1 (205). – С.35-38.
2. Ньюансы микробиоценоза половых органов [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://med.uni.com/Microbiologi/rep/123/17-34.html>
3. Галатюк О.Є. Антигенні властивості паличкоподібних бактерій, виділених зі статевих шляхів кобил / О.Є. Галатюк, Л.О. Солодка, Г.М. Карпович [та ін.]. // Проблеми екології ветеринарної медицини Житомирщини: наукові статті міжнародної науково-виробничої конференції. – Житомир: Полісся, 2005. – С. 147-149.
4. Gorbach S. Anaerobic microflora of the cervix in healthy women / S. Gorbach, K.Menda, H.Shadepall – Amer. J. Obstet 1973. – V. 117 p. – 8. – P.1053.
5. Мікробіота статевої сфери кобил [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://meduniver.com/Medical/egui_mb/10-17.html
6. Галатюк О.Є Вплив мікроорганізмів різних морфологічних груп на статеву систему кобил /О.Є. Галатюк, Л.О. Солодка, О.О. Качуровський Ю.О. Кондратюк// Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків, 2011.– Випуск: ТОВ фірма «НТМТ». – С. 98-99.
7. «Коктейль» з антибіотиків – потреба чи вигода? [Електронний ресурс] – За матеріалами компанії КРКА, Словенія. Режим доступу до статті <http://AgroTimes.mht>

Микрофлора половых путей кобыл как индикатор возможностей получения здоровых жеребят

М.И. Завадская, А.Э. Галатюк, Л.А. Солодкая

В состав микробной ассоциации половых путей отдельных кобыл входят потенциально патогенные энтеробактерии со чрезмерной интенсивностью роста. Выделенные изоляты являются иммуногенными для организма животных, что вызывает продукцию антител в высоких титрах. Эти потенциально опасные микробы эффективно обезвреживаются антибиотиками ряда аминогликозидов, цефалоспоринов и фторхинолонов.

Ключевые слова: микробная ассоциация половых путей, анаэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, культуральные и морфологические свойства изолятов, антигены, антибиотикочувствительность.

Microflora of genital tracts of mares as indicator of possibilities of receipt of healthy foals

M. Zavadská, O. Galatuk, L. Solodka

It is deduced that in the complement of microbial association of genital tracts of separate mares enter potentially pathogenic enterobacteriales with excessive intensity of height. The distinguished isolates are immunogenic for the organism of animals, that results in formation of antibodies in high titles. Dangerous microbes are marked potentially effectively rendered by harmless by the antibiotics of row of aminoglycosides, cephalosporins and fluoroquinolones.

Key words: microbial association of genital tracts, anaerobic and optionally-anaerobic microorganisms, culture and morphological properties of isolates, antigens, antibiotic sensitiveness.