

ПРИНЦИПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ДИСБИОЗОВ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ КОБЫЛ

М.И. Кривда, А.Е. Галатюк

Житомирский национальный агроэкологический университет,
Украина, г. Житомир

(Поступила в редакцию 27.06.2014 г.)

***Аннотация.** Нарушение микробного консорциума половой системы кобыл может стать причиной нерезультативных осеменений, эндометритов, рождения нежизнеспособного молодняка. Поэтому вопрос своевременной диагностики и коррекции остаётся актуальным. Для выделения в условиях отечественных лабораторий чистой культуры (культур) и дальнейшей их идентификации предложена схема посевов на ряд питательных сред.*

***Summary.** Microbial consortium disorder of mares reproductive system can cause ineffective inseminations, weak young growth birth. Therefore its well-timed diagnostics and correction remain a topical question. The authors have offered laboratory sowing scheme on a number of nutrient medias with the aim of selection and identification of pure microbial culture (cultures).*

Введение. Зачастую животноводческие комплексы как в нашей стране, так и за рубежом, имеют проблемы, связанные с ассоциированным течением заразных болезней. Немаловажным аспектом при этом остаётся недополучение молодняка по тем или иным причинам. Доказано, что дисбиозы половой сферы препятствуют результативному осеменению, могут быть причиной прерывания вынашивания потомства или стать виновником рождения слабого молодняка [1, 2, 3]. Автохтонные микроорганизмы половых путей в норме создают гомеостатическую саморегулирующуюся среду с собственной кислотностью (рН на уровне 3,8-4,5) [3]. Защита половых путей, связанных непосредственно с внешней средой, многоступенчатая, и обеспечивается различными механизмами с целью создать оптимальные условия для защиты уязвимого зародка, а далее – плода. В общем, слизистые половых путей можно рассматривать как автономный орган иммунной системы, имеющий сложную структуру. Любая клетка слизистой оболочки является иммунокомпетентной и берёт активное участие в формировании и модуляции локальных иммунных реакций [8, 9].

При воздействии раздражающих факторов внешней среды в организме животного истощается гипоталамо-гипофизарно-адреналиновая система. Нарушается нейроэндокринная регуляция, а далее происходят морфологические изменения в тканях мочеполовой

системы и снижение устойчивости организма не только к патогенной, но и к условно патогенной микрофлоре [4, 5, 6]. Следует отметить, что флагманом среди инфекционных заболеваний животноводческих комплексов всего мира остаются факторные инфекции. Их стационарность свидетельствует о неизменном территориальном ареале неблагоприятных факторов. Как следствие такой очаговости происходят неспецифические изменения в организме животных. И чаще всего дисбиозы половой сферы протекают именно бессимптомно, а значит, могут оставаться незамеченными [10].

На сегодняшний день схемы диагностики подобных патологий не регламентированы. Поэтому возникают сложности с установлением причины перегулов и нерезультативных осеменений, возникновения патологий развития плода [3]. К тому же совместная персистенция патогенных и условно патогенных микроорганизмов в половых путях существенно осложняет терапию при возникновении клинических симптомов [4, 7]. Есть сведения про первоочередную роль в развитии подобных патологий прокариотных микроорганизмов. Во многих случаях основными патогенами становятся именно бактерии семейства *Enterobacteriaceae* [3, 4, 6].

Негативных последствий чрезмерного развития условно патогенной микрофлоры можно избежать путём своевременной диагностики и рациональной противомикробной терапии до осеменения или на ранних этапах вынашивания потомства [3]. Становится необходимой организация рациональной лабораторной диагностики дисбиозов половой сферы животных.

Цель работы – разработать оптимальную схему диагностики клинических и субклинических дисбиозов половой системы животных в условиях отечественных лабораторий.

Материал и методика исследований. Изучение данного вопроса проводилось на базе исследовательской лаборатории кафедры вирусологии, микробиологии и эпизоотологии факультета ветеринарной медицины Житомирского национального агроэкологического университета.

Для работы в условиях предприятия были отобраны смывы с шейки матки кобыл репродуктивного возраста Украинской верховой породы.

Путем глубинного посева нативных образцов проанализирована общая микробная контаминация шейки матки животных. Далее при помощи селективных дифференциально-диагностических питательных сред были изучены культуральные и биохимические особенности доминирующих в смывах с шейки матки бактерий с высокой скоростью

роста. Именно такие представители в благоприятных условиях могут стать причиной возникновения не только скрытых, но и клинических, требующих соответственной терапии, нарушений в микробном консорциуме половых путей кобыл.

Результаты исследований и их обсуждение. Отобранные пробы от кобыл, имеющих перегулы, и конематок, регулярно приходящих в охоту, были высеяны на ряд питательных сред. При глубинном посеве смывов с шейки матки отчетливо видна разница в микробной контаминации образцов (табл. 1). В таблице 1 представлено среднее количество (из 5-ти повторностей) колониеобразующих единиц (КОЕ) на питательных средах двух типов: общего назначения – мясопептонный агар и селективной среды для энтеробактерий – агар Эндо.

Таблица 1 – Количественный подсчет аэробных КОЕ в первичных посевах

№ п/п	Кличка кобылы	Количество КОЕ, среднее	
		МПА	Агар Эндо
1.	Тайна	7	1
2.	Балка	17	2
3.	Богема	17	21
4.	Багама	27	43
5.	Фотохимия	177	54

Так, таблица 1 научно демонстрирует корреляцию количества аэробных микроорганизмов в образцах, которые в норме не должны содержать факультативно и облигатно аэробных агентов. Либо же их представители могут присутствовать в единичных случаях. Количество анаэробов в посеве не учитывалось, т. к. животные были клинически здоровы, а физиологично содержание анаэробных микробов достигает 10^8 в 1 г вагинальной слизи. Чаще всего именно факультативно аэробные бактерии становятся причиной клинических и скрытых патологических состояний в половой системе самок [1].

Особого внимания заслуживают бактерии, способные расти на селективном агаре для энтеробактерий Эндо, т. к. они являются потенциальными патогенами.

Из первичных посевов было выделено две доминирующие культуры с высокой скоростью роста, встречающиеся в каждом образце. Для определения потенциальной патогенности изолятов необходимой стала их видовая и родовая идентификация. Для этого была проведена микроскопия, которая подтвердила чистоту культур, а также показала их принадлежность к грамотрицательным небольшим палочкам (3-5 мкм) без капсул, вероятнее всего, относящимся к семейству Enterobacteriaceae. Последнее подтвердил рост обеих бактерий на питательных средах агар Эндо и Висмут-сульфит агар (ВСА). Далее был проведен

сравнительный анализ исследуемых представителей соответственно культуральным и морфологическим признакам. Для данного этапа нами разработана схема посевов параллельными штрихами, представленная на рисунке.

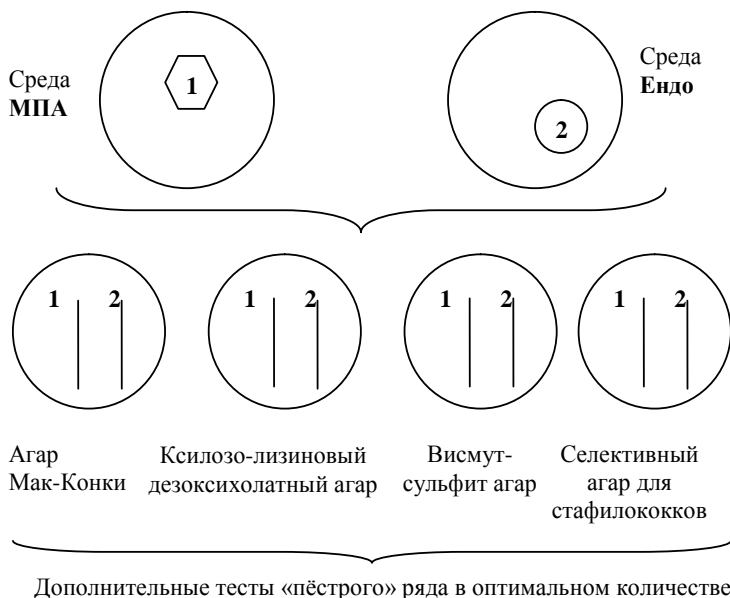


Рисунок – Схема дифференционного посева на селективные среды

Такая схема посевов микробного материала позволяет в краткие сроки сравнительно изучить культуральные признаки исследуемых энтеробактерий, что значительно упрощает анализ характера роста и сходности изучаемых изолятов.

На основе полученных данных можно сделать предварительные выводы о родовой, или даже видовой, принадлежности культур. И в дальнейшем облегчить выбор оптимального количества максимально информативных биохимических тестов для проведения окончательной видовой идентификации микробов.

В данной работе также был проведён анализ роста культур на дифференционно-диагностических средах. Принималась к особому сведению способность выделения сероводорода и восстановления висмута в металлический висмут микроорганизмами на среде ВСА. Учитывая культуральные и морфологические особенности изолятов, доминирующих в смывах, руководствуясь наставлениями к питатель-

ным средам и справочником «Определитель бактерий Берги» (том 1), стало возможным сужение круга потенциальных патогенов семейства Enterobacteriaceae с 28 до 6 родов.

Следующим этапом стал подбор биохимических тестов для окончательной видовой идентификации в кратчайшие сроки. Рассматривалась способность изучаемых бактерий утилизировать цитрат, ферментировать сахарозу и лактозу, выделять индол при расщеплении триптофана. Также была поставлена проба с метиловым красным. Результаты тестов «пёстро́го ряда» представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты тестов «пёстро́го ряда» для исследуемых культур

№ п/п	Исследуемый образец	Рост на агаре Симмонса	Ферментация сахарозы	Ферментация лактозы	Выделение индола	Проба с метиловым красным
1.	Культура 1	-	-	+	-	+
2.	Культура 2	+	+	+	-	+

Анализ способностей микроорганизмов выборочно утилизировать (расщеплять) те или иные компоненты питательных сред позволил определить видовую принадлежность тестируемых культур. Так, исходя из установленных биохимических особенностей, исследуемые бактерии принадлежат к видам *Budvicia aquatica* (первая культура) и *Citrobacter freundii* (вторая культура).

Заключение. Таким образом, представленная схема позволяет провести диагностику репродуктивных путей кобыл перед осеменением. Она демонстрирует аэробный микробный состав половых путей, что даёт возможность выбрать животных, требующих особого внимания и, возможно, терапевтической коррекции. Также становится возможным определение доминирующих контаминантов половой системы кобыл. На основе выделенных изолятов можно провести тестирование культур с высокой распространённостью в образцах на чувствительность к противомикробным препаратам, что позволит в дальнейшем, при необходимости, выбрать оптимальную схему терапии антибиотиками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нюансы микробиоценоза половых органов. [Электронный ресурс] – Режим доступа до статьи: <http://med.uni.com/Microbiologi/rep/123/17-34.html>.
2. Галатюк, О.С. Вплив мікроорганізмів різних морфологічних груп на статеву систему кобил / Солодка Л.О., Кочаровський О.О., Кондратюк Ю.О. // Ветеринарна медицина: міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків: НТМТ, 2011. – 98-99 с
3. Gorbach S. Anaerobic microflora of the cervix in healthy women / Gorbach S., Menda K., Shadepall H. “Amer. J. Obstet. Gynecol.” – 1973. – v.117. – N.8. – 1053 p.
4. Михайлов, Н.Н., Лучко, М.А., Коннова, З.С. Получение проб цервикальной слизи от коров // Ветеринария, 1967. – № 1. – 80 с.
5. Кудин, А.И., Борисова, Г.В., Губанов, Д.В. Пробиотик спорметрин для профилактики и лечения при эндометритах коров // Ветеринария, 2002. – №.11. – 28-29 с.

6. Михайлов, Н.Н. Условно-патогенная микрофлора и воспроизводительная функция самок / Н.Н. Михайлов, И.Я. Чистяков, Б. Муртазин // Ветеринария, 1970. – № 12 – 74-75 с.
7. Бойко, М.А., Бондарчук, І.Б., Солодка, Л.О. Дія антибіотиків на паличковидні бактерії виділені із статевих шляхів кобил. // Наукові праці міжнародної наукової конференції. – Львів, 2005. ч. 1, – 34-35 с.
8. Кузьменко, А.Є. Мікробіологічні, імунологічні та цитоморфологічні паралелі при інфекційно-запальних захворюваннях сечостатевих органів: автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (мікробіологія 03.00.07) / А.Є. Кузьменко. – ХАРКІВ, 2008. – 35 с.
9. Осипов, Г.А. Невидимый орган – микрофлора человека / Первый в России сайт, посвященный дисбактериозу. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.disbak.ru>