

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОГО ОБСЕМЕНЕНИЯ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ КОБЫЛ

Кривда М.И., Антонюк А.А.

УО «Житомирский национальный агроэкологический университет», г. Житомир, Украина

Бактериальный дисбиоз половой системы самок – этиологический фактор, повышающий риск развития нарушений репродукции и приводящий к недополучению здорового молодняка. В отличие от автохтонных микробов условно-патогенные представители биопленок макроорганизма способны (при снижении иммунной защиты) стать причиной развития клинически выраженных патологий. Подтверждением иммуногенности выделенных изолятов являются титры антител к ним на уровне 1:100 и выше. Мониторинг титров антител к бактериальным антигенам, наличествующих у поголовья хозяйства, может подтвердить или опровергнуть возможную патогенность исследуемых изолятов.

Bacterial dysbiosis female reproductive system is an etiological factor what increases the risk of reproduction's breaks and a shortfall healthy descendants. In contrast to the autochthonous microflora opportunistic representatives capable cause the clinically significant pathology if immune defence became weak. Confirmation immunogenicity isolates are antibodies titers 1:100 and higher. Monitoring of the antibodies concentration to bacterial antigens may indicate there transmission and confirm isolates's possible pathogenicity for the animals.

Ключевые слова: бактериальный дисбиоз, мочеполовая система, условно-патогенная микрофлора, иммуногенность.

Keywords: bacterial dysbiosis, urogenital system, conditionally pathogenic microflora, immunogenicity.

Введение. Одним из перспективных направлений современной микробиологии является изучение биопленок, существующих в организмах людей и животных: их состав, изменения в норме и при патологии. Особенный интерес представляет отслеживание персистенции условно-патогенной микрофлоры, способной длительное время не вызывать развития клинически выраженных патологий. Автохтонные представители биопленки активизируются только при снижении иммунитета и благоприятных для развития заболевания внешних факторах. Интересным является тот факт, что в 83% случаев нарушение микробиоценоза сопровождается аллергическими реакциями и замедлением регенеративных процессов [12, 13].

Дисбиозы половой сферы, преимущественно, изучаются специалистами гуманной медицины. В то же время в ветеринарии, в частности в коневодстве, причины таких неспецифических нарушений репродукции, как перегулы, часто остаются не диагностированными.

В норме в половых путях самок содержится множество микроорганизмов. Их количество определяется значением 10^9 клеток в 1 г вагинальной слизи. Автохтонная микрофлора репродуктивного тракта обеспечивает обмен поверхностных липидов и аминокислот, поддержание физиологичной кислотности половых путей (для лошадей рН = 3,8-4,5) [8, 9]. Бактериальный вагиноз же являет собой мультифакторный синдром, при котором микробиоценоз влагалища нарушается в результате воздействия как экзогенных, так и эндогенных факторов. Данная патология сама по себе не представляет прямой угрозы здоровью самки, но при этом в нижних отделах полового тракта накапливаются условно-патогенные бактерии, актиномицеты и грибы. Основным признаком субкомпенсированного или декомпенсированного бактериального вагиноза является увеличение общей микробной обсемененности влагалищного биотопа в тысячи раз (с преобладанием грамотрицательных бактерий и минимальным содержанием лактобактерий) [1, 4-7].

Бактериальный вагиноз сопряжен с изменением характера иммунного ответа. Возникающее воспаление характеризуется рецидивирующим течением, торможением восстановления функции пораженных органов. При диагностике бактериального вагиноза отмечают параллельное нарушение баланса кишечной и уrogenитальной микрофлоры [1, 12, 13]. Следует особо подчеркнуть, что на фоне развития дисбаланса микробного биоценоза резко увеличивается риск активации латентной вирусной инфекции, что приобретает особое значение во время вынашивания потомства. Это связано с тканевой гипоксией при бактериальном вагинозе и высокими показателями кислотности вагинального содержимого.

Доказано, что условно-патогенные бактерии имеют много антигенов, родственных тканевым антигенам организма хозяина. В частности, они вырабатывают фосфолипазы, аналогичные фосфолипазам амниоального эпителия, которые являются биохимическими активаторами родов. Поэтому попадание микробов в околоплодные воды может быть не только фактором риска инфицирования плода, но и стать причиной преждевременной родовой деятельности [1-3, 7].

Условно-патогенные бактерии представляют потенциальную опасность для макроорганизма. Их элиминация происходит после активации ряда иммунных механизмов, таких как продуцирование антител

определенных классов и идиотипов. Титры антител, выявленные при иммунологической диагностике, могут стать показателем патогенности микробных агентов до проявления клинических симптомов. Известно, что титры антител к культурам транзитных или «полезных» микроорганизмов находятся в диапазоне от 0 до 1:50. Это связано с кратковременным пребыванием транзитных микробов или с длительной совместной эволюцией хозяина и автохтонных микроорганизмов [8-10].

В ветеринарии недостаточно изучены нарушения микробиоценоза половых путей самок, хотя наличие четких схем диагностики дисбиозов может повысить рентабельность не только коневодства, но и других отраслей животноводства. Так, коррекция состава микробной ассоциации перед осеменением способна повысить вероятность удачного оплодотворения, а на ранних сроках вынашивания потомства – обеспечить рождение здорового молодняка.

Поэтому нами была поставлена задача – изучить обсеменение половых путей кобыл, выделить отдельные изоляты доминантных факультативно-анаэробных микробов (частых возбудителей неспецифических инфекций мочеполовой сферы), провести их видовую идентификацию и определить потенциальную патогенность для организма лошадей.

Материалы и методы исследований. Исследования микробной контаминации половых путей кобыл проведены на кафедре вирусологии, микробиологии и эпизоотологии факультета ветеринарной медицины Житомирского национального агроэкологического университета. Материалами для исследования стали смывы, отобранные от кобыл украинской верховой породы на одном из конных заводов Украины.

У пяти кобыл данного хозяйства стерильными аппликаторами были отобраны мазки из половых путей, пробирки со смывами помещены в термос со льдом и доставлены в лабораторию.

Микробные суспензии были высеваны на питательную среду общего назначения – мясопептонный агар (МПА) и на дифференциально-диагностическую среду для энтеробактерий – агар Эндо. Из первичных посевов были выделены две культуры, встречающиеся у всех животных в большом количестве.

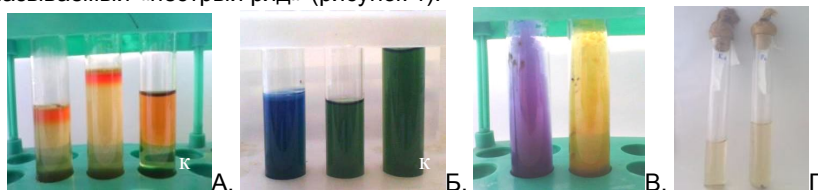
Первым шагом работы с изолятами стало изучение их культуральных свойств. На этом этапе была установлена принадлежность выделенных представителей к семейству Enterobacteriaceae. После анализа характера роста чистых культур на разных средах для проведения видовой идентификации был выбран ряд биохимических реакций: тест с метиловым красным, выделение индола при расщеплении триптофана, способность к росту на цитратном агаре Симмонса, ферментация сахарозы. Была определена подвижность исследуемых изолятов в разных температурных режимах культивации: 35⁰ и 22⁰ С.

Для определения иммуногенности исследуемых изолятов была сформирована группа животных из конного поголовья хозяйства: кобылы (29 особей) разных возрастных групп и 5 жеребцов, которые принимают участие в случной кампании. У животных были отобраны пробы крови.

Определение титра антител к бактериальным антигенам, выделенным из половых путей кобыл, было проведено путем постановки реакции микроагглютинации (РМА) на 72-луночных серологических панелях. Сыворотки крови лошадей конефермы, используемые для РМА, изготовлены в предыдущие годы (2009, 2010, 2011 и 2014), а бактериальные антигены – из суточных чистых культур микробных изолятов, доминирующих в посевах от кобыл. Для приготовления антигенов биомассу каждого из микроорганизмов смывали с агара физиологическим раствором с добавлением 1% формалина, выдерживали 24 часа в термостате. После проверки стерильности полученной суспензии (посев на МПА) взвесь стандартизировали на фотозлектрокалориметре (длина волны - 400 нм, синий фильтр, кювета - 10 мм) до оптической плотности 0,9. Результаты РМА в лунках с разным разведением учитывали в соответствии с выпадением характерного осадка, так называемого «зонтика», что свидетельствует о связывании 50 % антител с 50 %-тами антигенов.

Результаты исследований. Из доставленных в лабораторию смывов путем глубинного посева было выделено две культуры, которые в большом количестве встречались у всех исследованных животных. Изучение культуральных и морфологических свойств выделенных микробов позволило выявить в микроскопических препаратах мелкие грамнегативные палочки, расположенные одиночно, или собранные в короткие цепочки. По результатам роста на селективных средах культуры принадлежали к лактопозитивным представителям семейства Enterobacteriaceae.

Схема видовой идентификации изолятов была разработана с помощью справочника «Определитель бактерий Берги». Материал чистых культур тестировали в 4 биохимических реакциях, составляющих так называемый «пестрый ряд» (рисунок 1).



А - тест с метиловым красным (к – контроль); Б - рост на агаре Симмонса (к – контроль); В - утилизация сахарозы; Г - выделение индола.

Рисунок 1 – Биохимические тесты «пестрого ряда»

Дополнительно была изучена способность исследуемых представителей энтеробактерий к образованию жгутиков при температуре 35⁰ С и 22⁰ С. Так, у изолята «Р1» подвижность сохранялась при культивировании в двух температурных режимах. Изолят «К1» был подвижен лишь при культивировании в

условиях 35° С и теряет подвижность при 22° С. Потеря способности активно передвигаться при культивировании микроорганизмов при 22° С является характерной особенностью.

Согласно совокупности результатов биохимических реакций (таблица 2) и теста на подвижность, бактериальные изоляты принадлежат к виду *Citrobacter freundii* и *Budvicia aquatica* семейства Enterobacteriaceae.

Таблица 2 – Результаты биохимических тестов для изучаемых культур

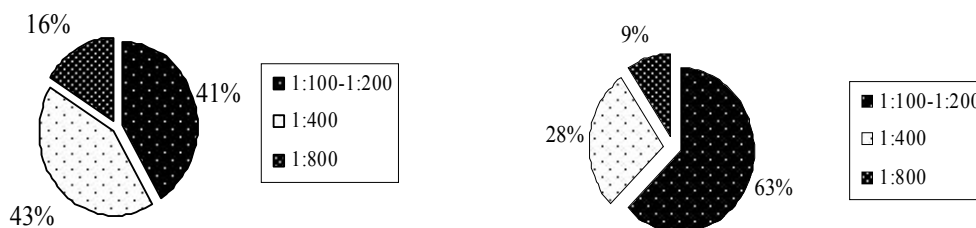
Название биохимического теста	Культура К1	Культура Р1
Выделение индола	-	-
Ферментация сахарозы	+	+
Реакция с метиловым красным	+	+
Рост на агаре Симмонса	-	+
Ферментация лактозы	+	+

Вид *Citrobacter freundii* давно известен как условно-патогенный микроорганизм, *Budvicia aquatica* – малоизученный вид, открытый в последней четверти XX в. *B. aquatica* является контаминантом природных водоемов, выделяется из испражнений здоровых и больных людей, а также теплокровных животных. Соответственно, *B. aquatica* может быть возбудителем мочеполовых патологий.

Потенциальную опасность для макроорганизма составляют условно-патогенные бактерии, которые могут стать причиной возникновения патологических состояний. Они чужеродны для макроорганизма, а значит, провоцируют проявления иммунных реакций, в частности, такие гуморальные реакции, как продуцирование антител и накопление их в сыворотке крови. Титры антител являются диагностическим фактором и могут стать показателем условной патогенности микробных агентов до проявления клинических симптомов патологий.

Поэтому следующим шагом изучения выделенных изолятов стало определение реакции иммунной системы кобыл данного хозяйства на приготовленные бактериальные антигены. Поскольку выявленные микробы должны циркулировать в конюшнях конезфермы в течение нескольких (многих) лет, реакция агглютинации проводилась не только для животных, у которых первоначально были сделаны смывы из половых путей, но и для других лошадей хозяйства.

Результаты постановки реакции микроагглютинации показали, что титры антител в сыворотке крови лошадей конезфермы, отобранной в период 2009 – 20011 и 2014 г.г, находились на уровне 1:100 – 1:800 (рисунок 3).



А - культура *Budvicia aquatica*; Б - культура *Citrobacter freundii*
Рисунок 3 – Титры антител к бактериальным антигенам

Представленные на рисунке титры иллюстрируют средний уровень антигенности выделенных бактериальных изолятов для группы животных (кобылы и жеребцы, 4 года наблюдения). В течение нескольких лет высокие титры антител для культуры *Budvicia aquatica* поддерживались на уровне 58 %, в противовес 37 % к культуре *Citrobacter freundii*. Таким образом, исследуемые изоляты являются условными патогенами для организма лошадей данного хозяйства.

Логично было бы предположить, что распространение бактерий происходит вследствие хаотичной случной кампании, так как на данном конном заводе практикуется естественный способ оплодотворения. Но тогда изученные бактерии должны быть характерными только для репродуктивного поголовья. Антитела к ним не должны встречаться у годовалых кобылок и двухлеток. В то же время у этих животных также обнаруживаются диагностические титры антител к исследуемым культурам (1:100 – 1:400). Это свидетельствует о наличии в хозяйстве факторных инфекций и передаче условно-патогенных микроорганизмов от матери к потомству, где они долгий период сохраняются, не вызывая клинических проявлений.

Закключение. Микробиологическая оценка обсеменения половых путей самок – способ прогнозирования успешности проведения случной кампании и получения здорового молодняка. Она позволяет выделить животных, имеющих нарушения в составе биопленок урогенитального тракта и требующих коррекции микробиоценоза репродуктивной системы.

Выделенные из смывов с половых путей микроорганизмы, согласно результатам «пестрого ряда», принадлежали к видам *Budvicia aquatica* и *Citrobacter freundii* – представителям семейства Enterobacteriaceae.

Исследуемые изоляты относятся к условно-патогенным колонизаторам мочеполового тракта. Согласно реакции агглютинации, титры антител в сыворотке крови лошадей к антигенам изучаемых бактериальных культур были зафиксированы на уровне 1:100 – 1:800. Высокие титры антител во всех возрастных группах свидетельствуют о наличии факторных инфекций у лошадей и вертикальном пути их передачи.

Литература. 1. Байрамова, Г. Р. Бактериальный вагиноз / Г. Р. Байрамова // Гинекология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 52–54. 2. Микроэкология влагалища. Коррекция микрофлоры при вагинальных дисбактериозах / Коршунов В.М., Володин Н.Н., Ефимов Б.А. [и др.]: Учебное пособие.– М., ВУНМЦ МЗ РФ, 1999.– 80с. 3. Gorbach S. Anaerobic microflora of the cervix in healthy women / S. Gorbach, K.Menda, H.Shadepall – "Amer.J.Obstet1973. – v.117 p. – 8. – P 1053. 4. Equine Stud Farm Medicine and Surgery / C Knottenbelt D., R Pascoe R., Lopate Ch., M LeBlanc M. – Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto : Elsevier Science Limited, 2003. – 402 p. 5. Анкирская А.С. Клиническая микробиология и антимикробная терапия. Неспецифические вагиниты: новые подходы к диагностике. Медицина для всех № 2 (17), 2000 – С. 13-15. 6. Копян Т.Э. Бактериальный вагиноз и вагинальный кандидоз у беременных (диагностика и лечение): Дис. канд. мед. наук : 14.00.01 / Акопян Тамара Эдуардовна. – М., 1996. – 142 с. 7. Khosravi AR, Eslami AR, Shokri H, Kashanian M. Zataria multiflora cream for the treatment of acute vaginal candidiasis. // Int J Gynaecol Obstet. 2008, 7(5): P. 75–80. 8. Thomason J.L., Gelbard S.M., Scaglione N.J. Bacterial vaginosis: current review with indications for asymptomatic therapy. // Amer J Obstet Gynecol. 2001, 165(4): P. 1210–1217. 9. Гинекология. Мочеполовые инфекции. Бактериальный вагиноз. Клиника (симптомы), диагностика, лечение бактериального вагиноза / Источник: Гинекология - национальное руководство под ред. В.И. Кулакова, Г.М. Савельевой, И.Б. Манухина 2009 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.medsecret.net. 10. Кира, Е. Ф. Бактериальный вагиноз (клиника, диагностика, лечение) : автореф. дис. д-ра мед. наук : акушерство и гинекология (14.01.01) / Е. Ф. Кира. – СПб., 1995. – 44 с. 11. Centers for Disease Control: Sexually transmitted diseases. // MMWR. 1998, 28(4): P. 61–63. 12. Abreu M.T. Immunologic regulation of toll-like receptors in gut epithelium. / Abreu M.T. // Current Opinion Gastroenterology – 2003. – 19. – P 559-564. 13. Похил С.І. Біологічні властивості та медичне значення ентеробактерій видів *Rahnella aquatilis*, *Pragia fontium*, *Budvicia aquatica* Дис. на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук, 03.00.07 / Пхил Сергій Іванович. – К., 2008. – 275 с.

Статья передана в печать 10.09.2015 г.