

УДК: 636.1:636.082

ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОФЛОРИ СТАТЕВОЇ СИСТЕМИ КОБИЛ

М. І. Кривда, О. Є. Галатюк, Л. О. Солодка
 zavadskamary@gmail.com

Житомирський національний агроекологічний університет,
 вул. Старий бульвар, 7, м. Житомир, 10008, Україна

На сьогодні вивчення кількості мікробних клітин та видового складу біоплівки макроорганізму — прогресивний напрям, вивченням якого займаються не лише ветеринарні мікробіологи, але й фахівці гуманної медицини. Вченими всього світу доведено, що і кількісні, і якісні порушення зв'язків між представниками мікробного консорціуму можуть призвести до розвитку патологічного процесу в тій чи іншій системі організму тварини або людини: у дихальних шляхах, кишково-шлунковому тракті, статевій системі тощо. Нами було поставлено мету дослідити мікробний пейзаж статевих шляхів кобил. У статті подані результати проведеної роботи в напрямку дослідження потенційних патогенів — факультативно-анаеробних колонізаторів репродуктивного тракту коней.

Порівняння спектру мікробів, виділених зі змивів зі статевієї системи клінічно здорових кобил та особин з патологіями, показало переважання паличковидних мікроорганізмів у клінічно здоровій тварини (57 %), тоді як у кобил з порушеннями ця тенденція зберігалась не завжди (44–55 %). Особливо інформативним виявився аналіз співвідношення кількості мікроорганізмів, що виділялись зі змивів із шийки матки кобил. Так, загальне обсіменіння цервіксу у клінічно здоровій кобилі було в 2–6,5 раз меншим порівняно з тваринами, у яких спостерігались порушення. Для наочного відображення якісного різноманіття у складі біоплівки статевієї системи коней представлений аналіз культуральних та морфологічних властивостей виділених мікроорганізмів. Вони віднесені до таких груп, як кулясті бактерії, неспороутворюючі паличковидні бактерії, бацили, а також актиноміцети.

Після вивчення швидкості (інтенсивності) росту, культуральних та морфологічних ознак ізолятів була досліджена їх чутливість до протимікробних препаратів різних фармакологічних груп. Такі дані стануть у пригоді при виникненні клінічних проявів дисбіозів та дозволять оптимізувати схему лікування тварин.

Ключові слова: КОНЯРСТВО, МІКРОБІОЛОГІЧНА ОЦІНКА, БАКТЕРІАЛЬНА КОНТАМІНАЦІЯ, ОБСІМЕНІННЯ, СТАТЕВА СИСТЕМА, МОРФОЛОГІЧНІ ГРУПИ, АНТИБІОТИКО-ЧУТЛИВІСТЬ

RESEARCH OF THE EQUINE REPRODUCTIVE SYSTEM MICROFLORA

M. Krivda, A. Galatuk, L. Solodka
 zavadskamary@gmail.com

Zhytomyr National Agroecological University,
 Staryi bulvar st., 7, Zhytomyr, 10009, Ukraine

Research of the microbial cells amount and species of composition in the biofilms is a progressive direction nowadays. It became studied not only by veterinary microbiologists, but experts of humane medicine. Scientists from all the world proved that quantitative and qualitative disturbances of microbial consortium can lead to the pathological process of an animal or humans organism systems (respiratory tract, gastrointestinal tract, reproductive system and so on). The goal of our research was to study the microbial landscape of the mare's genital tract. This article presents the results of the study of potential pathogens — facultative anaerobic colonizers of horse reproductive tract.

Comparison of the spectrum of microbes isolated from swabs of genital system of healthy mares and animals with deflexion from well being allowed to establish the nature of microbial contamination of reproductive tract epithelium. Comparing the microbe's spectrum isolated from swabs of the genital system of clinically healthy mares and individuals with pathologies showed prevalence of rod-shaped organisms in clinically healthy animals (57 %), while in mares with deregulation this trend was not always preserved (44–55 %). The analysis of the microorganisms, isolated from cervical of mares, was particularly informative. So

overall contamination of the uterus cervix in clinically healthy mares was 2–6,5 times less than in animals in which deregulation had been observed. For visualisation of qualitative diversity of the composition of mare's reproductive system biofilm the cultural and morphological qualities of extracted microorganisms were analyzed. These microorganisms were assigned to such groups as coccus bacteria asporogenous rod bacteria, bacillus and actinomycetes.

After studying the intensity (speed) of microbial growth, cultural and morphological characteristics their sensitivity to antimicrobial medications of different pharmacological groups was investigated. This information will be useful in case of clinical symptoms of dysbiosis for optimizing animal treatment.

Keywords: EQUINE, MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT, CONTAMINATION, BACTERIAL CONTAMINATION, REPRODUCTIVE SYSTEM, MORPHOLOGICAL GROUP, ANTI-BIOTIC SENSITIVITY

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ КОБЫЛ

М. И. Крывда, А. Е. Галатюк, Л. А. Солодка
zavadskamary@gmail.com

Житомирский национальный агроэкологический университет,
ул. Старый бульвар, 7, г. Житомир, 10008, Украина

В наше время изучение количества микробных клеток и видового состава биоплёнок макроорганизма является прогрессивным направлением, изучением которого занимаются не только ветеринарные микробиологи, но и специалисты гуманной медицины. Учёными всего мира доказано, что и количественные, и качественные нарушения взаимоотношения представителей микробного консорциума могут стать причиной развития патологического процесса в системах организма животных и человека: дыхательных путях, желудочно-кишечном тракте, половой системе. Нами была поставлена цель изучить микробный пейзаж репродуктивных органов кобыл. В статье представлены результаты проведённой работы в исследовании потенциальных патогенов — факультативно-анаэробных колонизаторов репродуктивного тракта лошадей.

Сравнительный анализ спектра микробов, выделенных из смывов с половой системы клинически здоровых кобыл и конематок с патологиями, позволил установить превалирование палочковидных микроорганизмов клинически здорового животного (57 %), тогда как у кобыл с перегулами эта тенденция сохранялась не всегда (44–55 %). Особенно информативным оказался анализ соотношения количества микроорганизмов, которые выделялись из смывов с шейки матки. Так, общее обсеменение цервикса клинически здоровой кобылы было в 2–6,5 раз меньше в сравнении с животными, у которых регистрировались перегулы. Для отображения качественного разнообразия состава биоплёнок половой системы лошадей представлен анализ культуральных и морфологических особенностей выделенных микроорганизмов. Они относятся к таким морфологическим группам: кокковые бактерии, неспорообразующие палочковидные бактерии, бациллы, а также актиномицеты.

После изучения скорости (интенсивности) роста, культуральных и морфологических признаков изолятов была исследована их чувствительность к противомикробным препаратам разных фармакологических групп. Результаты этих исследований будут актуальными в случае клинических проявлений дисбиозов и позволят оптимизировать схему лечения.

Ключевые слова: КОНЕВОДСТВО, МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА, БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ, ОБСЕМЕНЕНИЕ, ПОЛОВАЯ СИСТЕМА, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ГРУППЫ, АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для підтримки благополуччя конегосподарств ветеринарним спеціалістам доводиться контролювати різні аспекти нагляду за тваринами, регулярно запобігати патологіям або усувати їх [1]. Порушення в роботі дихальної або травної систем зазвичай проявляються досить швидко, тоді як дисфунк-

ції статеві системи найчастіше стають помітними лише у період злучної кампанії.

Нерідко причиною функціональних відхилень у роботі сечостатевого тракту є зміна симбіотичних відносин між резидентними мікроорганізмами різних морфо-фізіологічних груп, які мешкають у цій системі органів.

При цьому в наявній мікробній асоціації може простежуватися і кількісний, і якісний дисбаланс, який виявляється методами мікробіологічної чи серологічної діагностики [2, 3].

Зазначена робота може проходити двома способами. У першому варіанті дослідженню підлягає матеріал від тварин із патологіями і роботи спрямовуються на пошук певного збудника чи збудників. У другому випадку проводять планові дослідження груп коней для виявлення спектру мікроорганізмів, характерного для тварин у господарстві, і встановлення титру антитіл. Цей варіант потребує проведення масштабних досліджень і є досить затратним. Саме тому ветеринарні лікарі конегосподарств лише в окремих випадках приділяють увагу лабораторній діагностиці, хоча своєчасна діагностична корекція доклінічних порушень у статевій системі могла би стати важливим етапом процесу отримання здорових лошат [4–6]. Тому початковим і, безперечно, актуальним етапом фундаментальних досліджень у конярстві повинне стати виявлення домінантних мікробних клітин з певною патогенністю, які є резидентними представниками мікробної асоціації статевих шляхів господарства, області чи регіону.

Матеріали і методи

На кафедрі мікробіології, вірусології та епізоотології факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агро-екологічного університету вивчали мікробний пейзаж цервіксу та зовнішніх статевих органів у кобил української верхової породи, приділяючи основну увагу факультативно-анаеробним мікроорганізмам. Матеріалами для дослідження були змиви від 3-х тварин, що утримувались у господарстві «Райз-Максимко» Чортківського району Тернопільської області. Як контроль використовувалася кобила, що регулярно приходила в охоту та приводила здорових лошат, і дві конематки з перегулами. Об'єкти досліджень — культури аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, виділені з вагінальних змивів кобил.

Зразки від тварин висівали глибинним методом на низку поживних агарових середовищ. Далі у домінуючих (за чисельністю або швидкістю росту) ізолятів факультативних анаеробів, вирощених у накопичувальних та чистих культурах, реєстрували культуральні та морфологічні ознаки [7, 8]. Антибіотикочутливість культур визначали стосовно препаратів декількох фармакологічних груп: аміноглікозиди (стрептоміцин, канаміцин, гентаміцин), лінкозаміди (лінкоміцин), фторхінолони (норфлоксацин), глікопептиди (ванкоміцин), поліпептиди (поліміксин) [9]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми MS Office Excel.

Результати й обговорення

Після висіву зразків на поживні середовища і аналізу специфічних властивостей колоній, росту типових патогенних мікроорганізмів, що вражають статеву систему коней (а саме — дріжджів *Candida albicans*, бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* та *Tayorella equigenitalis*) виявлено не було.

Культуральні і морфологічні ознаки виділених ізолятів дозволили віднести їх до таких морфологічних груп, як бактерії (бацили, дрібні неспороутворюючі палички, стафіло- та ентерококи) і актиноміцети. Всього у статевих шляхах кобил було виділено 21 культуру: 3 належали до кулястих бактерій, 12 — до паличковидних, 6 — до актиноміцетів. У здорової кобили і в кобил з перегулами більша частина виділених ізолятів були паличковидними бактеріями (здорова — 57 %, кобили з перегулами — 44 % та 55 % відповідно).

Розподіл культур факультативних анаеробів між зовнішніми статевими шляхами та цервіксом був принципово різним (Табл. 1).

Аналіз Таблиці 1 дозволяє стверджувати, що обсіменіння зовнішніх статевих органів у здорової тварини та кобил із розладами репродукції було приблизно однаковим (5–6 культур). Але в цервікальних змивах від тварин з перегулами виділялось в 2–6 разів

Таблиця 1

Спектр мікроорганізмів на статевих шляхах дослідних тварин

Показник	Характеристика дослідних тварин		
	№ 1 (контроль)	№ 2 (перегули)	№ 3 (перегули)
Кількість ізолятів на зовнішніх статевих шляхах	5	5	6
Кількість ізолятів з цервіксу	2	4	13
Загальна кількість індивідуальних культур	7	8*	18*
3 них ізолятів актиноміцетів (% від загальної к-ті культур)	2 (28,6 %)	3 (33,3 %)**	5 (27,7 %)
3 них ізолятів коків (% від загальної к-ті культур)	1 (14,3 %)	1 (11,1 %)	3 (16,6 %)
3 них ізолятів бацил (% від загальної к-ті культур)	4 (57,1 %)	2 (22,2 %)	6 (33,3 %)**
3 них ізолятів неспороутворюючих бактерій (% від загальної к-ті культур)	0	2 (22,2 %)	4 (22,2 %)

Примітка: *На зовнішніх статевих шляхах та в цервікальних змивах зустрічаються однакові культури.

**Один ізолят актиноміцетів у кобили № 2 та ізолят бацили у кобили № 3 трапляється у змивах із зовнішніх статевих шляхів та з цервіксу

більше культур, ніж від здорової кобили, і були наявні принципові відмінності у спектрі паличковидних бактерій.

Обрахунки кількості колоній або їх розмірів у посівах дозволили встановити, що з 21-ї виділеної культури здатність до інтенсивного росту мали лише 9 (43 %), характеристики яких описані в Табл. 2.

Таким чином, у здорової кобили із 7 виділених культур до інтенсивного розвитку були здатні 2 (28,6 %), у кобил з перегулами цей показник коливався від 31,5 % (№ 3) до 37,5 % (№ 2). Виявилось, що у кобил з перегулами були наявні 2 спільні культури (актиноміцет 1k та куляста бактерія 3sk), які не виділялись у здорової тварини.

Таблиця 2

Характеристики ізолятів з максимальної інтенсивністю росту

Інтенсивність росту культур у дослідних тварин	Групи мікроорганізмів			
	Бацили	Неспорові бактерії	Кулясті бактерії	Актиноміцети
Здорова (контроль) 2 культури	3ℓ (зовнішні) ++	—	—	3k (цервікс) ++
№1 (перегули) 3 культури	—	—	3sk (зовнішні) +++	1k (зовнішні, цервікс) +++; 13p (цервікс) +++
№2 (перегули) 6 культур	5k (цервікс) +++	6p (зовнішні) +++	2sk (зовнішні) ++; 3sk(цервікс) +++	1k (цервікс) +++; 14p (цервікс) +++

Примітка: «—» — ріст мікроорганізмів відсутній; «++» — інтенсивний ріст ізоляту; «+++» — інтенсивний ріст та значне поширення ізоляту у досліджуваному зразку

Всі виділені актиноміцети (1k; 3k; 13p та 14p) мали непрозорі, сухі, з рівними краями та крихкуватою структурою колонії, що важко знімались з агару. Зрілі колонії мікроорганізмів, їх чисті культури, вирощені в м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) або на м'ясо-пептонному агарі (МПА), у певні терміни (24–96 год після пересіву культури) фарбували

за Грамом. Далі перевіряли вплив на чисті культури антибіотиків 5-ти фармакологічних груп. Зазначені вище культури актиноміцетів відрізнялись за низкою ознак (Табл. 3), що підтверджує їх належність до різних видів чи штамів.

За культуральними ознаками всі виділені бактерії, описані в Табл. 4, можна було розділити на 3 групи.

Таблиця 3

Специфічні ознаки актиноміцетів із статевих шляхів дослідних кобил

№ з/п	Ознаки	Шифри виділених культур			
		1k	3k	13p	14p
1	Форма і колір колонії	чорна	жовто-сіра	кругла сліпучо-біла	кругла сліпучо-біла, типу «гудзик»
2	Розмір, мм	3	7–8	6–7	3
3	Особливі ознаки колоній	концентричний ріст, тонкі кільця на поверхні	концентричний ріст, помутніння агару довкола колонії	концентричний ріст, кратероподібне підвищення у центрі колонії	заглиблення у центрі
4	Профіль	плаский з валиками на поверхні	сходинокоподібний	складний	кратероподібний
5	Вигляд у мікроскопічних препаратах	кулясті та паличковидні спори, окремі нитковидні структури в зрілих колоніях; тонкі гіфи після 48–96 годин росту	кулясті спори у вигляді ланцюжка в зрілих колоніях; тонкі гіфи після 24–96 год росту; в культурах віком 96 год — поява окремих спор	великі округлі спори у маленьких групах та довгі нитки-гіфи в зрілих колоніях; скудний ріст у перші 24–72 год (коротенькі нитки)	великі круглі спори в ланцюжках, довгі та короткі гіфи у зрілих колоніях; тонкі розгалужені гіфи з невеликою кількістю спор через 72 год
6	Антибіотико-чутливість (d зона пригнічення росту ³ мм)	канаміцин — 34 гентаміцин — 35 стрептоміцин — 32 ванкоміцин — 29 норфлоксацин — 30	канаміцин — 28 гентаміцин — 30 стрептоміцин — 30 ванкоміцин — 25	канаміцин — 38 гентаміцин — 39 норфлоксацин — 36	канаміцин — 30 гентаміцин — 30 стрептоміцин — 28 ванкоміцин — 30

До першої належали дрібні, непрозорі, блискучі, слизуваті колонії, клітини яких гинули після нагрівання (2sk; 3sk). У мікроскопічних препаратах, зроблених з культур різного віку, клітини мали вигляд коків, зібраних в невеликі групи або розміщені коротенькими ланцюжками.

Другу групу становили великі за розмірами, складчасті, з нерівними краями та підвищеними центрами колонії, які після нагрівання мікробних суспензій та повторного висіву на МПА були віднесені до бацил (5k та 3ℓ). Мікроскопічне дослідження матеріалу показало, що в колоніях або суспензіях

Таблиця 4

Специфічні ознаки бактерій із статевих шляхів дослідних кобил

№ з/п	Ознаки	Шифри виділених культур				
		6p	2sk	3sk	3ℓ	5k
1	Форма і колір колонії	кругла, жовтувата	кругла, жовто-біла, непрозора	кругла, біла, непрозора	неправильна, схожа на штрих, жовтувата	неправильна, сіро-біла, напівпрозора
2	Розмір, мм	2–5	2–3	1	30	30–50
3	Особливі ознаки	рівні, пласкі краї, дещо підвищений центр	центр зрілої колонії синіє, край білий, вдавлений центр	ви pukлий профіль	виросли 2-х типів по краю, центр складчастий, вдвічі вищий за поверхню колонії	тоненькі виросли по краю
4	Антибіотико-чутливість (d зона пригнічення росту ³ мм)	канаміцин 38 гентаміцин 30 стрептоміцин 32 норфлоксацин 34	канаміцин 23 лінкоміцин 26	Норфлоксацин 30	канаміцин 30 гентаміцин 31 стрептоміцин 28 ванкоміцин 30 норфлоксацин 37	стрептоміцин 28 ванкоміцин 29 норфлоксацин 28

були наявні крупні (3ℓ) або невеликі за розмірами (5k) стрептобацили.

Культура бр мала жовтуваті, блискучі, з рівним краєм і шорсткою поверхнею колонії, складені із нестійких до температури мікробних клітин. У мазках були виявлені поодинокі, із загостреними кінцями палички.

Таким чином, не тільки виділені домінуючі актиноміцети, але й бактеріальні ізоляти за культурально-морфологічними ознаками та антибіотикочутливістю належали до індивідуальних культур. Для того, щоб довести, які з виділених факультативних анаеробів можуть стати причиною дисбіотичних порушень в статевій системі, обов'язково потрібно вивчити їх імуногенність для організму коней.

Висновки

1. У тварин дослідного господарства у цервікальних змивах спостерігались принципові відмінності мікробного пейзажу.

2. Кількість ізолятів з інтенсивним розвитком у тварин з перегулами склала 32–37 % від виділених культур. Серед них було виділено 2 культури, відсутні у здорової тварини.

3. За морфологічними, культуральними та окремими біологічними властивостями виділені домінуючі мікроби належать до різних видів.

Перспективи подальших досліджень.

Наступний етап роботи — проведення видової ідентифікації домінуючих ізолятів, а також встановлення їх імуногенності для організму коней шляхом отримання анти-

генів і постановки реакції аглютинації із сироватками крові тварин конегосподарства.

1. Tribal work in horses breeding. *Booklib.net*. Available at: <http://buklib.net/books/34269>. (in Ukrainian)

2. Labinska A. S. Microbiology and technique of the microbiologic researches. 4-th edition, revised and supplemented. Moscow, Medicine Publ., 1978, 394 p. (in Russian)

3. Equine Stud Farm Medicine and Surgery / Knottenbelt D., Pascoe R., Lopate Ch., LeBlanc M. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. Elsevier Science Limited, 2003., 402 p.

4. Equine Infectious Diseases / Alan J. Guthrie, Joanne Hardy, Christiane Herden [and other] : Edited by Debra C. Sellon, Maureen T. Long, 11830 Westline Industrial Drive. St. Louis, Missouri 63146, Elsevier, 2007, 653 p.

5. 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

6. Nuances of microbiota of the reproductive system. Available at: <http://med.uni.com/Microbiologi/rep/123/17-34.html>. (in Russian)

7. Kulakov V. I. Gynecology: national guide / V. I. Kulakov, G. M. Saveleva, I. B. Manuhin. Moscow, 2009, 596 p. (in Russian)

8. Osipov G. A. An invisible organ — human's microflora. Available at: <http://www.rusmedserv.com/microbdiag/invisibleorgan.htm>. (in Russian)

9. Methodical rules “Definition of microorganism's sensibility to antibacterial preparation: decree of DHP of Ukraine. № 167, 05.04.2007. (in Ukrainian)