

УДК 619:616-093/098.636.2

РОЛЬ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОНЕЧНОСТЕЙ У КОРОВ

Улько Л.Г., Фотина Т.И., Березовский А.В.

Сумский национальный аграрный университет, г. Сумы, Украина

В статье изложены результаты изучения культурально-морфологических и патогенных свойств микрофлоры, изолированной из гнойно-некротических очагов дистального отдела конечностей у коров.

The article presents the results of studying cultural-morphological and pathogenic properties of the microflora isolated from pyo-necrotic foci of the distal extremities of cows.

Введение. Заболевания дистального отдела конечностей у высокопродуктивных коров на сегодня являются одной из важных проблем животноводства. Эти болезни наносят значительный экономический ущерб в связи с высокой частотой проявления, преждевременной выбраковкой, снижением продуктивности животных и затратами на их лечение.

Патология негативно сказывается на состоянии всех систем организма животного, что приводит к снижению иммунного и антиоксидантного статуса и дестабилизации обмена веществ [4, 5].

Исследованиями последних лет установлено, что этиопатогенез гнойно-некротических заболеваний конечностей имеет сложный многокомпонентный характер, и в их возникновении значительную роль играют как биотические (бактерии, вирусы и грибы), так и абиотические факторы (условия содержания и кормления) [1-3, 6, 7]. Механизм развития и течение этих болезней зависит от состояния органов и систем организма. При гнойно-некротическом воспалении развивается общая интоксикация в результате действия на организм животного бактериальных токсинов, протеолитических ферментов, биологически активных веществ, продуктов перекисного окисления липидов [5].

Целью нашей работы было изучить морфологические, антигенные и патогенные свойства микрофлоры изолированной с гнойно-некротических поражений дистального отдела конечностей у коров и выяснить значение ассоциаций микроорганизмов в этиологии и патогенезе заболеваний конечностей, которые протекают с признаками гнойно-некротического воспаления.

Материалы и методы. Исследования выполнены на кафедрах ветсанэкспертизы, микробиологии, зоогигиены, безопасности и качества продуктов животноводства, терапии, фармакологии и клинической диагностики Сумского национального аграрного университета, в условиях

АФ «Владана» Сумского района, Сумской области. Для определения распространения заболеваний дистального отдела конечностей проводили обследование поголовья коров. Учитывали возраст, молочную продуктивность, характер поражения, тяжесть патологического процесса и его локализацию, постановку конечностей, их форму и размер. Животных с поражениями копыт отделяли, проводили клиническое обследование и лечение.

Исследование конечностей проводили в следующей последовательности:

1. Осмотр в состоянии покоя. При этом учитывали постановку конечностей, характер постановки и состояние конечностей.

2. Осмотр при движении. Определяли тип, степень и характер хромоты.

3. Пальпация пораженной конечности, определение консистенции тканей, местной температуры, чувствительности, размеров и характера поражения. От животных с гнойно-некротическими поражениями конечностей было отобрано 24 пробы патологического материала. Патматериал отбирали на границе здоровой и пораженной ткани. Из патматериала делали мазки и окрашивали их по Граму. Для установления и идентификации микроорганизмов осуществляли первичный посев на питательные среды. В качестве питательных сред для первичного посева использовали мясопептонный агар, мясопептонный бульон и среду Китта-Тароцци. Для выделения чистых культур использовали метод дробного посева на плотные питательные среды с целью получения изолированных колоний и посев на селективные и дифференциально-диагностические среды. Изучали изолированные колонии и проводили отбивку чистых культур. При идентификации культур помимо морфологических и культуральных признаков изучали биохимические, антигенные свойства, определяли патогенность.

Результаты исследования. При изучении распространения гнойно-некротических болезней копыт среди поголовья животных АФ «Владана» Сумского района Сумской области было обследовано 320 дойных коров. При этом патология в области копыт обнаружена у 38 животных (11,9%). В 22,2% случаев это был отек и гиперемия кожи межкопытной щели, у 24 (66,7%) коров обнаружены гнойно-некротические поражения в области межкопытной щели, венчика и подошвы. У 83% животных с выявленной патологией в области копыт наблюдали хромоту, выраженную в разной степени. Трещины, расслоение и заламывание копытного рога регистрировали у 4 коров.

В мазках из патологического материала, взятого на границе здоровой и некротизированной ткани, среди кокковой микрофлоры, грамположительных и грамотрицательных палочек обнаруживали *Fusobacterium necrophorum* в виде тонких нитей.

Параллельно с бактериологическими исследованиями проводили заражение кролика суспензией патологического материала на

физиологическом растворе 1:10 в дозе 0,5 мл. Суспензию вводили подкожно в средней трети наружной поверхности уха. Наблюдением за зараженным животным установлено, что введение суспензии патологического материала не сопровождалось некрозом. Тем не менее после постановки биопробы у кролика возникали множественные подкожные абсцессы в области спины.



Рисунок 1. – Место введения суспензии патматериала



Рисунок 2. – Абсцессы в области спины после подкожного введения суспензии патматериала

Бактериологическими исследованиями из всех проб патматериала от коров с гнойно-некротическими поражениями выделены культуры *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* и *Proteus vulgaris*. Кроме вышеуказанных микроорганизмов из 6 проб изолирован *Proteus mirabilis*, из 9 - *Streptococcus faecalis*. Из 33,3% и 8,3% проб изолированы *Fusobacterium necrophorum* и *Dichelobacter nodosus*. *Clostridium septicum* и *Clostridium oedematiens* присутствовали в 8,3% проб, *Klebsiella pneumoniae* – в 4,2%.

При изучении биологических свойств изолированных эшерихий мы установили, что они были представлены грамотрицательными палочками с закругленными концами. Некоторые культуры имели коковидную форму. Палочки располагались отдельно или попарно. На МПБ изолированные культуры образовывали равномерное помутнение с беловатым осадком, который разбивался при встряхивании. Некоторые культуры на поверхности МПБ формировали пленку (25%).

На МПА культуры формировали рост в виде круглых серовато-белых колоний с гладкой, блестящей поверхностью. На среде Эндо большинство изолятов образовывали ярко-красные с металлическим блеском колонии (83,3%).

В биохимическом отношении изолированные культуры были активными: сбрасывались с образованием кислоты и газа или только кислоты, сахара и многоатомных спиртов; 79,2% изолированных эшерихий имели типичные биохимические свойства, 20,8% были атипичными, имели отклонения по одному или нескольким показателям.

С целью изоляции микроорганизмов рода *Proteus* мы использовали метод Шукевича. На среде Плоскирева изолированные микроорганизмы

формировали рост в виде больших полупрозрачных колоний, имевших характерный запах. На висмут-сульфитном агаре колонии имели черно-коричневый цвет. На МПА образовывали "ползучий рост". Большинство изолированных культур нами были отнесены к *Proteus vulgaris*.

Кокковая микрофлора была представлена грамположительными кокками. На глюкозо-кровяном агаре стрептококки имели рост в виде мелких колоний, которые имели зону гемолиза. Стафилококки образовывали круглые, выпуклые колонии лимонно-желтого цвета. *Staphylococcus aureus* на МПБ образовывал слизистый осадок, который при встряхивании поднимался в виде косички. На МПБ *Streptococcus faecalis* давал придонный рост, который при встряхивании разбивался на хлопья. *Staphylococcus aureus* дифференцировали от *Streptococcus pyogenes* посредством каталазной пробы и роста на МПБ с добавлением 10% хлорида натрия. *Streptococcus pyogenes* на данной среде не давал роста, а *Staphylococcus aureus* вызывал помутнение с образованием слизистого осадка.

Clostridium perfringens окрашивались по Граму положительно, имели вид толстых палочек с круглыми концами, были неподвижны. На среде Китта-Тароцци возникали помутнения и интенсивное газообразование, на глюкозо-кровяном агаре Цейслера образовывались , круглые, гладкие, выпуклые, серовато-зеленые колонии, которые вызвали сильный гемолиз грязно-коричневого цвета.

С целью изоляции чистой культуры использовали метод посева по Вейону-Вильялю. Изолированные культуры *Clostridium perfringens* на 2-4 суток разжижали желатин, не выделяли сероводород, сворачивали молоко, ферментировали маннит.

Для идентификации и изучения морфологических свойств *F. necrophorum* и *D. nodosus* использовали бульон Китта-Тароцци, среды Цейслера и кровяной сахарный агар.

При выявлении характерных для возбудителей некробактериоза колоний производили отсев на среду Китта-Тароцци. Отсеянные культуры через 24-36 часов давали удовлетворительный рост на среде Китта-Тароцци.

В мазках из свежих культур преобладали длинные зернисто окрашенные переплетающиеся нити. Некоторые нити имели шаровидные вздутия, которые находились в середине или конце и превышали ее толщину в 4-5 раз.

В мазках из старых культур *F. necrophorum* имела форму грамотрицательных палочек длиной 0,7-3 мкм и шириной 0,3-0,5 мкм и коротких нитей с 4-5 палочек. Выделенные и изученные нами штаммы спор и капсул не образовывали, были неподвижны, росли только в анаэробных условиях. По Граму окрашивались отрицательно, как правило, неравномерно по всей длине палочек встречались бесцветные участки, что создавало видимость зернистости.

При изучении культуральных свойств выделенных штаммов на кровяном агаре Цейслера через 2-3 суток после посева отмечали рост в виде росинки, а в дальнейшем колонии увеличивались до 3 мм в диаметре и имели хорошо очерченные формы и края.

На среде Китта-Тароцци культуры давали рост через 24-36 часов сначала в виде помутнения в нижних слоях, а потом всей среды. В некоторых культурах регистрировали газообразование. У всех культур через 36-48 часов происходила самоагломинация: кусочки печени покрывались серым налетом. Через 7-10 суток наступало полное просветление среды.

Все изученные штаммы образовывали индол и сероводород, но не разжижали желатин и не сворачивали молоко.

Dichelobacter nodosus в мазках, окрашенных по Граму, была представлена грамотрицательными большими прямыми и несколько изогнутыми палочками длиной 6-8, шириной 1 мкм. Большинство из них имело утолщение на концах, были расположены одиночно, реже попарно. Таких палочек насчитывали по 6-12 в поле зрения микроскопа.

На плотной питательной среде культуры *Dichelobacter nodosus* росли в виде плоских прозрачных и сероватых, диаметром 3 мм, с вдавленным центром и неровными краями, бугристых, иногда с шероховатой поверхностью колоний. Некоторые колонии имели диаметр 1 мм, были с конусовидно приподнятым центром и ровными краями.

Изолированные штаммы *Dichelobacter nodosus* не расщепляли углеводы и многоатомные спирты, разжижали столбик среды, содержащей 10% желатина, сворачивали молоко. Все исследуемые культуры *D. nodosus* не владели гемолитической активностью, не образовывали зоны гемолиза на средах с кровью.

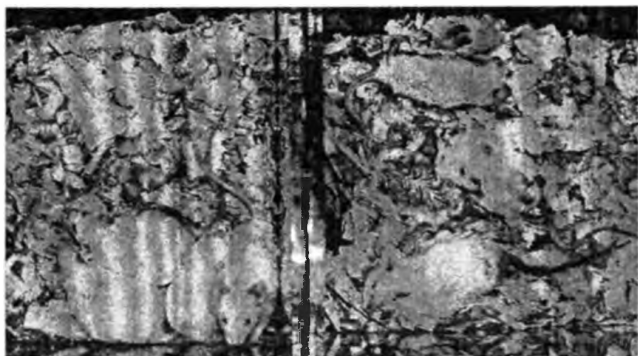


Рисунок 3 – Мыши, зараженные монокультурами (слева) и ассоциацией изолированных микроорганизмов (справа)

Микроорганизмы рода *Klebsiella* были представлены грамтрицательными неподвижными палочками овальной формы. На МПБ формировали рост с образованием гомогенной мутности. На МПА они образовывали пышный рост, большие, влажные колонии округлой формы.

Для определения патогенности изолированных культур белых мышей заражали интарперитонеально, смывами с суточных агаровых культур *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и бульонной культурой *Fusobacterium necrophorum* и *Clostridium perfringens*. Разведения культур делали на стерильном изотоническом растворе натрия хлорид. Концентрацию микробных клеток определяли по стандарту мутности. Смертность лабораторных животных, зараженных монокультурами, колебалась в пределах от 0% до 60%.

Ассоциация микроорганизмов, состоящая из *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* и *Proteus vulgaris* при внутрибрюшинном введении белым мышам вызывала 100%-ную гибель животных в течение 12 часов.

Заключение. В возникновении и развитии гнойно-некротических поражений дистального отдела конечностей у коров значительную роль играет ассоциация микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* и *Proteus vulgaris*, которая является патогенной для лабораторных животных.

Литература

1. Борисевич В.Б. Цитомегаловірусне ураження копитець великої рогатої худоби / В.Б. Борисевич, Б.В. Борисевич, В.Б. Борисевич // Ветеринарна медицина України — 2008. — № 11. — С. 19 - 22.
2. Іздєпський В.Й. Вплив пліснявих грибів на копитний ріг великої рогатої худоби / В.Й. Іздєпський, С.М. Кулініч, А.П. Каблучка // Ветеринарна медицина України. — 2008. — №1. — С. 40 – 43.
3. Козій В.І. Залежність рівня захворюваності у ділянці пальця від стану годівлі та рубцевого травлення у високопродуктивних корів / В.І. Козій, О.В. Чуб, В.В. Сахнюк // Вісник СНАУ. — 2004. — Вип. 7 (12). — С. 77 - 78.
4. Молоканов В.А., Семенов Б.С., Камсаев В.С. Болезни копыт сельскохозяйственных животных. — Челябинск: ЗАО «Конус», 2003. - 171 с.
5. Панько І.С. Гнійно-некротичні хвороби пальців у високопродуктивних корів / І.С. Панько, М.В. Петрик // Бібліотека ветеринарної медицини, 2007. — 63 с.
6. Попов Ю.Г. Значение условно-патогенной микрофлоры при массовых болезнях крупного рогатого скота // Актуальные вопросы микробиологии и инфекционной патологии животных: Мат. междунар. науч. – произв. конф. – СПб., 2004. – С. 103-104.
7. Фотіна Т.І. Вивчення видового спектру мікроорганізмів при гнійно-некротичних ураженнях копитець у великої рогатої худоби / Т.І. Фотіна, Улько Л.Г. // Мат. міжнар. каук. – практ. конф. – Миколаїв, 2008. – С. 299-303