

ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ РАНЕВОГО СОДЕРЖИМОГО И ГНОЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН И ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ У КОРОВ

В. А. Журба, В. М. Руколь, А. А. Гласкович (ВГАВМ)

Для достижения успеха в лечении гнойно-некротических поражений необходимо добиться полного уничтожения патогенных микроорганизмов в ране. С этой целью необходимо подбирать такие антисептики и лекарственные вещества, в таких дозах и концентрациях, при которых они, не снижая активности иммунобиологических реакций организма, инактивировали бы микробов, подготавливая их к уничтожению самим организмом. Достичь эффективного действия препарата можно только изучив микробный состав раны и действие на них применяемого лекарственного средства.

С этой целью проводилось исследование видового состава микрофлоры из раневого содержимого, полученного из инфицированных ран и гнойно-некротических поражений в дистальном участке конечностей от крупного рогатого скота. Лабораторному исследованию подвергался патматериал от 20 голов крупного рогатого скота в возрасте 3-7 лет, принадлежащих совхозу «Пламя» Сенненского района Витебской области. Все животные находились в одинаковых условиях кормления и содержания.

Материал брали с соблюдением правил асептики и антисептики стерильным ватным тампоном, свернутым на одном конце тонко выструганной палочки, вмонтированной в ватную пробку и вставленной в стерильную пробирку. При взятии пробы пробирку открывали, тампон пропитывали гноем и вновь вставляли в пробирку. Перед проведением микроскопии патматериал высевали на питательные среды, затем готовили мазки (на предметное стекло наносили каплю фи-

зиологического раствора, бактериологической петлей в нее вносили каплю экссудата и растирали). Мазки после высушивания и фиксации окрашивали по Граму, Михину и Ольту (на наличие капсул).

При микроскопировании в смывах обнаруживали грамположительно окрашенные кокки (диаметр 0,5—1,5 мкм), располагающиеся небольшими гроздьевидными скоплениями. Некоторое количество их содержалось в цитоплазме лейкоцитов. Часть микроорганизмов имели капсулы (*Staphylococcus aureus*), а другие – нет (*Staphylococcus epidermidis*).

Микроскопированием обнаруживали также грамположительные стрептококки, которые в мазках из гноя располагались в форме длинных или коротких цепочек (*Streptococcus pyogenes*) и полиморфные палочки с закругленными концами длиной 1-3, шириной 0,3-0,6 мкм, располагающиеся одиночно и реже парно, спор не образующих, подвижных и неподвижных сероваров. Некоторые выделенные грамотрицательные микроорганизмы образовывали капсулы. По Ольту микробная клетка окрашивалась в красно-коричневый цвет, а капсула – в желтый. При окраске по Михину бактерии окрашивались в синий, а капсулы – в сиреневый цвет (*E. coli*).

Мазки из экссудата и гноя также содержали мелкие грамотрицательные палочки длиной 1,0-3,0 мкм, шириной — 0,4-0,6 мкм, не образующие капсул и спор (*Proteus vulgaris*).

При микроскопии мазков из исходного патматериала (окрашенных по Граму и метиленовой синью Лёффлера) обнаруживали короткие с закругленными

ми концами овоидные палочки-биполяры (преимущественное окрашивание бактерий по полюсам) и мелкие грамотрицательные коккобактерии длиной от 0,3 до 5,0 мкм и шириной от 0,15 до 1,2 мкм. Микроорганизмы неподвижны, спор и капсул не образовывали (*Pasteurella multocida*).

В зафиксированных и окрашенных по Граму мазках были также обнаружены прямые и слегка изогнутые грамотрицательные палочки с закругленными концами, размером 1-3 мкм в длину и 0,5-1 мкм в ширину, располагающиеся одиночно, парами и короткими цепочками, подвижные, спор и капсул не образующие (*Pseudomonas aeruginosa*).

Определение культуральных свойств проводили на втором этапе исследования. Микроорганизмы хорошо росли на простых питательных средах: МПА и МПБ с pH 7,2—7,8 при температуре 35—37°C. Проводили посев так же на МПА и МПБ с 10% сывороткой крови лошади и 1% глюкозы, МПБ с 5% дефибринированной кровью и 1% глюкозой, МПБ с 6,5% NaCl, МПБ с 40% желчью, МПБ с pH-9,0.

Для получения изолированных колоний стафилококков материал (1—2 капли смывов), нанесенный на поверхность среды (молочно-солевой агар и солевой кровяной МПА с 8—10% поваренной соли и 5% дефибринированной кровью; кровяной МПА), втирали шпателем последовательно в 2—3 чашки так, чтобы он распределялся равномерно тонким слоем по всей поверхности среды. Посевы выдерживали в термостате при 37 °C. Применение молочно-солевого и кровяного солевого агара проводили с целью дифференциации стафилококков от других микроорганизмов. Этот метод основан на способности стафилококков выдерживать высокие концентрации NaCl (до 10 %).

Высокое содержание соли используют для задержки роста посторонней микро-

флоры, а присутствие молока активизирует образование пигмента.

На второй день просматривали посевы исследуемого материала для выявления характерных особенностей исследуемых микроорганизмов. При этом на плотных питательных средах обнаруживали колонии микроорганизмов размером 1—4 мм. Форма колоний была круглая, слегка выпуклая, края ровные, поверхность влажная, глянцевая. Цвет колоний был эмалево-белый и золотистый.

Таким образом, на МПА и молочно-солевом агаре, эмалево-белый цвет колоний свидетельствует о выделении эпидермального стафилококка (*Staphylococcus epidermidis*), а золотистый – золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*).

На кровяном солевом агаре вокруг колоний обнаруживали зону бета-гемолиза (зона просветления).

Помимо селективной среды (солевой кровяной агар), посевы делали на МПБ. Культуральные свойства стафилококков на МПБ характеризовались помутнением и обильным осадком. Отмечено появление пристеночного кольца или серовато-белой пленки.

Изолированную колонию с солевого кровяного агара пересекали в пробирки со скошенным МПА и в МПБ; выросшую чистую культуру идентифицировали. Из части колонии готовили мазки, окрашивали по Граму и Михину (на наличие капсулы) и микроскопировали.

Для выделения стрептококков использовали МПА с сывороткой крови и 1% глюкозой. Обнаружили серо-белые, мелкие, росинчатые колонии, а на кровяном агаре колонии микроорганизмов окружены прозрачной зоной бета-гемолиза. Микроорганизмы не давали роста на МПБ с 6,5% NaCl, МПБ с 40% желчью и МПБ с pH 9,0 (*Streptococcus pyogenes*).

При бакисследовании одновременно со стафилококками и стрептококками выделяли и кишечную палочку *E. coli*.

Этот микроорганизм является факультативным анаэробом, хорошо растет при 37-38 °С, pH 7,0-7,4 на обычных питательных средах – МПА, МПБ, среде Эндо и Левина. На МПА через 24 часа появлялись сочные, круглые, с ровными краями и гладкой поверхностью (S-формы) серо-белого цвета колонии. На МПБ – интенсивное помутнение среды и наличие незначительного осадка, легко разбивающегося при встряхивании (*E. coli*).

При культивировании на МПА и МПБ обнаруживали микроорганизмы, которые давали рост, сопровождающийся неприятным гнилостным запахом. Культуральные свойства на МПА характеризовались образованием вуалеобразного налета без образования отдельных колоний (феномен роения). Данный феномен характерен для *Proteus vulgaris*.

При бакисследовании, одновременно с *E. coli* и *Proteus vulgaris*, выделяли *Pasteurella multocida* и *Pseudomonas aeruginosa*. Пастереллы на жидких питательных средах с добавлением 10% сыворотки крови лошади давали рост вначале со слабым помутнением, а через 24-36 часов среда просветлялась и на дне пробирки образовывался осадок, при встряхивании поднимающийся в виде косички. На сывороточном агаре рост пастерелл характеризовался образованием прозрачных, до 3 мм, округлых с ровными краями колоний слизистой консистенции, серого цвета.

Псевдомонады культивировали на МПА и МПБ с добавлением 1-2% глюкозы в аэробных условиях при 37-38°C в течение 24-48 часов. На МПА в чашках Петри вырастали округлые выпуклые колонии с изрезанными краями, блестящей поверхностью и кратерообразным углублением в центре, а на скошенном МПА микроорганизмы давали рост в виде блестящего налета. На МПБ через 24 часа псевдомонады вызывали помутнение бульона, с образованием сероватой плен-

ки на его поверхности и с осадком на дне пробирки. После 48 часов роста псевдомонады изменяли цвет питательной среды до сине-зеленого в связи с образование пигмента пиоцианина. На кровяном агаре *Pseudomonas aeruginosa* вызывал гемолиз эритроцитов.

Для обнаружения пигмента пиоцианина в пробирку с суточной бульонной культурой добавляли 4-5 капель хлороформа, энергично встряхивали и давали отстояться. Синее окрашивание осевшего на дне хлороформа свидетельствовало о наличии пиоцианина.

На третьем этапе изучали и производили видовую идентификацию микроорганизмов рода *Staphylococcus* на основании изучения комплекса биологических свойств выделенных чистых культур. Эти свойства изучали на основании выраженности биохимической активности - по выделению сахаролитических и протеолитических ферментов, расщеплению маннита (ферментация маннита свойственна патогенным видам), лактозы, сахарозы, глюкозы, фруктозы, мальтозы, ксилоты, глицерина с образованием кислоты без газа; восстановлению нитратов в нитриты, разложению крахмала, инулина, дульцита, салицина, рафинозы и образованию индола.

При исследовании обнаруживали хорошо выраженную биохимическую активность микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*) и (*Staphylococcus epidermidis*), т.к. они активно выделяли сахаролитические и протеолитические ферменты. Они расщепляли маннит, лактозу, сахарозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, ксилоту, глицерин с образованием кислоты без газа, восстанавливали нитраты в нитриты, не разлагали крахмал, инулин, дульцит, салицин, рафинозу, не образовывали индол. Выделяли аммиак и сероводород, продуцировали каталазу, уреазу, фосфатазу и аргиназу. Разжижали желатин, свертывали кровяную сыворотку, свертыва-

вали и пептонизировали обычное и лакмусовое молоко; продуцировали сероводород и аммиак.

В биохимическом отношении *Staphylococcus aureus* отличается от *Staphylococcus epidermidis* тем, что золотистый стафилококк расщеплял маннит и не ферментировал глицерин, а эпидермальный стафилококк был биохимически не активен по отношению к обоим вышеуказанным тестам.

Биохимическая активность *Streptococcus pyogenes* характеризовалась ферментацией лактозы, сорбита и маннита.

С целью выявления ферментативной активности *Proteus vulgaris* проводили посевы на дифференциально-диагностические среды. На висмутсульфитном агаре через 48 часов культивирования колонии протеи имели грязно-коричневый цвет, а после их снятия оставалась темно-коричневая редуционная зона. Протеи давали положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра. Протеи не ферментативировали маннит, лактозу, арабинозу, дульцит, не обладали декарбоксилазой лизина и дегидролазой аргинина, не лизировали малонат, ферментировали сахарозу, мальтозу, гидролизировали желатин, мочевины, вырабатывали индол и сероводород (*Proteus vulgaris*).

На третьем этапе так же изучали и проводили видовую идентификацию микроорганизма *E. coli*. Этот микроорганизм обладал высокой ферментативной активностью: ферментировал с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, маннит; не постоянно ферментировал сахарозу и дульцит, не изменял адонит и инозит, образовывал индол, не образовывал H_2S , желатин не разжижал; на среде Симмонса рост не наблюдался, давал положительную реакцию с метиловым красным (ярко-розового цвета), отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра (среда желтого цвета), мочевины не расщеплял. На

среде Эндо *E. coli* образовывали колонии темно-вишневого цвета с металлическим блеском, диаметром 2-3 мм. На среде Левина колонии были темно-фиолетового цвета.

При исследовании биохимической активности *Pasteurella multocida* установлено, что пастереллы ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, маннозу, сахарозу, давали отрицательную реакцию с метилротом и Фогес-Проскауэра, не росли на средах с добавлением желчи крупного рогатого скота, не свертывали молоко, не разжижали желатин, редуцировали нитраты (*Pasteurella multocida*).

Выделенные культуры псевдомонад ферментировали в аэробных условиях с образованием кислоты без газа глюкозу, галактозу, арабинозу, свертывали и пептонизировали молоко (молоко приобретало желто-зеленый цвет, особенно в верхнем слое, вследствие образования пигмента пиоцианина), разжижали желатин.

Патогенные свойства микроорганизмов рода *Staphylococcus* определяли по реакции плазмокоагуляции.

Реакцию плазмокоагуляции ставили для выявления фермента коагулазы. Суточную агаровую культуру микроорганизмов суспендировали в 0,5 мл цитратной кроличьей плазмы. Результаты реакции регистрировали через 1, 2, 4 и 18 ч инкубации проб в термостате при 37 °C. Появление на дне пробирки студнеобразного сгустка свидетельствовало о наличии у изучаемого штамма фермента плазмокоагулазы. При исследовании обнаруживали положительную реакцию плазмокоагуляции уже через 1 час в чистых культурах, полученных как из колоний эмалево-белого, так и золотистого цвета.

Таким образом, культуры стафилококков - *S. epidermidis* и *S. aureus*, давшие положительную реакцию плазмокоагуляции, являлись патогенными.

Лецитиназную активность выделен-

ных стафилококков определяли на желточной среде. Для ее приготовления к расплавленному и охлажденному до 46°C МПА стерильно добавляли 20% желточной взвеси (желток куриного яйца в 200 мл физраствора). На этой среде вокруг колоний микроорганизмов, выделяющих лецитиназу, образовывалась зона помутнения с радужным венчиком на периферии (светящийся ореол). При исследовании обнаруживали положительную реакцию у части колоний, имеющих золотистый цвет, у колоний эмалево-белого цвета реакция – отрицательная. Таким образом, *Staphylococcus aureus* являлся лецитиназоактивным, а *Staphylococcus epidermidis* – лецитиназоотрицательным.

Для подтверждения патогенности выделенной кишечной палочки готовили смыв суточной агаровой культуры и вводили трем белым мышам весом 15-18 г в дозе 500 млн. м. к. внутрибрюшинно. *E. coli* считали патогенной, так как в течение 5 суток погибли все 3 белые мыши.

Патогенные свойства стрептококков определяли на 3 белых мышках массой 18 – 20 г, которых заражали в дозе 0,5 мл суспензией точной культуры, выращенной на скошенном МПА, с концентрацией бактерий, соответствующей 5 ед. по стандарту мутности. Культуру считали патогенной, так как в течение 3 суток погибли все 3 белые мыши (*Streptococcus pyogenes*).

Определение патогенности *Pasteurella multacida* проводили на 2 белых мышках, которым вводили внутрибрюшинно по 0,2 мл суточной бульонной культуры. Культуру пастерелл признали не патогенной, так как в течении 10 суток (срок наблюдения) не погибло ни одной белой мыши.

Для определения патогенности *Proteus vulgaris* 3 белые мыши заражали в дозе по 0,5 мл внутрибрюшинно культурой псевдомонад (из расчета 100-300 млн. м. к. суточной агаровой культуры

на физрастворе). Культуру признали патогенной, так как в течение 18 – 36 часов погибли все три белые мыши (*Proteus vulgaris*).

При проверке патогенности *Pseudomonas aeruginosa* суточную бульонную культуру в дозе 0,2 – 0,3 мл вводили подкожно двум белым мышам массой 18 – 20 г. Гибель мышей наступила через 3 суток, в результате чего культуру считали патогенной.

Гемолитическую активность стафилококков определяли путем посева на кровяной агар с 5% дифибринированной крови кролика и солевой кровяной МПА с 10% NaCl и 5% дефибринированной крови. Чистую культуру, выросшую на скошенном МПА, пересекали на вышеуказанные среды в чашках Петри. Через 18 – 20 ч образовывалась зона бета-гемолиза (зона просветления), что свидетельствует о гемолитической активности у *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*.

Для определения гемолитической активности *E. coli* и *Proteus vulgaris* проводили посевы на 5% кровяной агар в чашках Петри. Культуры кишечной палочки и протей выделяли гемотоксин, т.е. микроорганизмы были гемолитически активными с образованием β -гемолиза (вокруг колоний обнаруживали бесцветную прозрачную зону). На кровяном агаре *Pseudomonas aeruginosa* также вызывали гемолиз эритроцитов. У *Pasteurella multacida* и *Proteus vulgaris* гемолитической активности не обнаружено.

Вывод

Из всех 20 проб патматериала – раневого экссудата и гноя, полученных из инфицированных случайных ран и гнойно-некротических поражений у крупного рогатого скота, в процессе бактериологического исследования выделены патогенные микроорганизмы из рода *Staphylococcus* – золотистый (*Staphylococcus aureus*) и эпидермальный (*Staphylococcus epidermidis*), *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Pro-*

teus vulgaris, Pasteurella multocida, Pseudomonas aeruginosa.

Microflora's species composition of wound contents and matter infectious wound and matter-necrosis detects in cow. Zhurba V.A., Rukol V.M., Glaskovich A.A.



АКУШЕРСТВО, ГИНЕКОЛОГИЯ

К ВОПРОСУ ОБ ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ ЭНДОМЕТРИТОВ

П. Б. Должанов (Управление ветеринарии Мурманской области)

Послеродовые эндометриты широко распространены среди молочного животноводства, в том числе и в хозяйствах Мурманской области. По литературным данным и нашим наблюдениям частота случаев возникновения эндометритов среди дойного стада может составлять от 50 до 90 и более процентов.

Большинство авторов считают, что послеродовой эндометрит является полиэтиологическим заболеванием.

К предрасполагающим факторам многие исследователи относят снижение защитных сил организма, или в результате неудовлетворительного кормления и содержания животных, или в результате чрезмерной нагрузки на организм при высокой молочной продуктивности [1, 4, 5].

К этиологическим факторам авторы относят условно-патогенную и патогенную микрофлору и вирусы [2, 3, 6].

Кроме того, некоторые авторы в возникновении эндометритов отмечают разбалансированность нервно-гормональной регуляции организма коров и, прежде всего, репродуктивных органов а также нарушение сократительной функции миометрия [5,7].

Учитывая важность проблемы поставались уточнить этиопатогенетические факторы возникновения и течения послеродовых эндометритов у коров в ряде хозяйств Мурманской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования провели в 3 животноводческих хозяйствах области на поголовье в 375 коров. При этом идентифицировали микрофлору, изолированную из полости матки, общепринятыми микробиологическим и фармакологическим (чувствительность к химиопрепаратам) методами. В крови животных существующими методами определяли показатели иммунологической защиты, учитывали условия кормления и содержания и продуктивность коров. Полученные материалы обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установили, что при клиническом исследовании 375 коров послеродовой эндометрит встречался в 71 % случаев во всех обследованных хозяйствах. Наибольшее количество коров, больных послеродовым эндометритом, регистрировали на фермах с наиболее высокой молочной продуктивностью, где заболело до 90 % обследованных животных. Чаше всего эндометриты протекали в форме катарально-гнойных воспалений.

Как правило, болезнь чаще регистрировалась у коров после задержания последа. В то же время, при других патологиях, таких как родильный парез, персистентное желтое тело, эндометрит развивался не у всех животных. Отметим, что субинволюция матки также регистрирова-