



УДК 619:542.2/001/53:616.[07:9]:579

Безбородова Н.А., с.н.с., к.в.н.

Ким Н.А., с.н.с.

ФНБНУ Уральский НИВИ, г. Екатеринбург

## СРАВНЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ПАТОГЕННЫМИ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

**В** настоящее время патогенные и условно-патогенные бактерий все чаще становятся причиной заболеваний сельскохозяйственных животных, что может стать причиной, способствующей более ранней выбраковке животных, увеличению сухостойного периода, снижению воспроизводительной функции. Для преодоления данных проблем, необходима ранняя и более точная диагностика бактериальных заболеваний, которая имеет большое значение при постановке более точного диагноза назначения и проведения адекватной терапии [2,4].

В современных условиях диагностика инфекционных болезней сохраняет все свои традиционные черты, сформировавшиеся за последние десятилетия. В то же время диагностика характеризуется непрерывным совершенствованием уже найденных приемов и методов распознавания болезней и поисками новых, более эффективных [2,6].

В последние десятилетия наблюдается непрерывное изменение, как клинической картины инфекционных заболеваний, так и особенностей их патогенеза. Например, известные достаточно опасные возбудители могут вызывать стёртые формы болезней или наоборот: условно-патогенные или считавшиеся непатогенными микроорганизмы становятся причиной тяжелых форм [5,8]. Меняется тропность патогенных микроорганизмов и, как следствие, появляются новые формы инфекционных процессов. Возникают хронические, персистирующие формы инфекций и изменяется антигенная структура возбудителей, микроорганизмы переходят в некультивируемое состояние [2,4,6].

Для обнаружения и идентификации возбудителя болезни у сельскохозяйственных животных применяются разные лабораторные методы. Для определения в биологическом материале условно-патогенных и патогенных микроорганизмов используются микробиологические методы исследования и ПЦР-диагностика. Микробиологические исследования позволяют с высокой степенью точности и достоверности подтвердить или опровергнуть факт присутствия в организме возбудителей инфекционных заболеваний. Также такой анализ является эффективным способом выявления уровня чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам [2,3,7,10].

На сегодняшний день одной из перспективных направлений развития лабораторной диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР — метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе) [2,5,7]. В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). В результате на-

рабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции. В отличие от традиционных микробиологических методов, метод ПЦР позволяет проводить идентификацию генетических детерминант резистентности микроорганизмов, в том числе сложно культивируемых бактерий, в течение 4 часов. Он отличается высокой точностью и меньшими требованиями к забору материала, не требует наличия питательных сред, дисков с антибиотиками и дополнительных реактивов. Определение антибиотикорезистентности с помощью ПЦР позволяет прогнозировать появление устойчивости к различным группам антимикробных препаратов, а также оценить распространение резистентных штаммов на локальном и региональном уровнях. Поэтому обнаружение антибиотикорезистентности методом ПЦР является отличным дополнением к традиционному микробиологическому тестированию [5,7,8].

В настоящее время устойчивость к антибиотикам стала актуальной проблемой в сельском хозяйстве [3]. Инфекции, вызванные резистентными штаммами *Salmonella*, *E.coli* и *Campylobacter*, могут вызывать у животных тяжелое протекание болезней. Вирулентность условно-патогенных микроорганизмов повышается с каждым годом всё больше и больше. Бесконтрольное поголовное применение антибиотиков способствует формированию резистентности и повышению уровня патогенности. Поэтому так необходимы методы диагностики, такие как устойчивость, к антимикробным препаратом патогенных и условно-патогенных микроорганизмов дисконфузионным методом и резистентность, которая определяет точечные мутации к целому ряду групп антибиотиков [3,8,10].

### Цели и задачи.

Провести сравнительный анализ двух методов диагностики (микробиология, ПЦР) для определения и идентификации в биологическом материале от крупного рогатого скота патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, с определением резистентности и чувствительности к антимикробным препаратам.

### Материалы и методы.

Исследования проводились в 2016 году в отделе ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ Уральского НИВИ. На исследование поступило 10 проб молока и 5 проб влагалищной слизи от коров. Пробы были направлены на микробиологическое исследование с определением чувствительности к антимикробным препаратам и на ПЦР-диагностику с постановкой резистентности.

Микробиологические исследования биологического материала проводили согласно общепринятым методикам. В работе использовались накопительные и дифференциально-диагностические питательные

среды (МПБ, среда Плоскирева, среда Эндо, Энтерококк агар и т.д.). Идентификацию бактерий осуществляли методом пересева на «пестрые ряды», приготвления и окраски мазков по Грамму. Дополнительно использовали пластины биохимические, дифференцирующие для энтеробактерий – ПБДЭ (идентификация по 20 диагностическим признакам), ООО НПО «Диагностические системы», Россия. У всех выделенных бактерий определяли антибиотикорезистентность при помощи диско-диффузионного метода.

ПЦР-диагностику осуществляли с использованием реагентов для выделения ДНК из биологического материала «ДНК сорбент» и тест-системы «Ветсептоскрин», наборов на определение резистентности по наличию генетических маркеров к цефалоспорином 1-2 группы (выявление генов CTX-M, MecA), к карбапенемам 1 группы (выявление гена VIM) и макролидам 1 группы (выявление гена ErmB), ООО «НПФ Литех», Россия. ПЦР исследования осуществлялись в режиме реального времени с применением анализатора Rotor-Gene 3000, Австралия.

#### Результаты исследований.

При исследовании методом ПЦР во всех пробах влагалищной слизи были обнаружены бактерии группы *Enterobacter* spp., в двух пробах *E. coli* и в одной пробе бактерии группы *Proteus* spp. Резистентность у обнаруженных бактерий к цефалоспорином 1-го ряда (цефазолин, цефалотин, цефалоксин, цефтриаксон, цефалодин) и к карбапенемам 1-го ряда (меропенем, имипенем, дорипенем и т.д.) была не обнаружена. В 5 пробах молока присутствовали *St. aureus* и *Streptococcus* spp.. Единично был обнаружен *E. faecalis*. В остальных пробах молока не были найдены патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. Резистентность у бактерий к цефалоспорином 1-го ряда (цефазолин, цефалотин, цефалоксин, цефтриаксон, цефалодин), к цефалоспорином 2-го ряда (цефуруксин, цефаклор), к карбапенемам 1-го ряда (меропенем, имипенем, дорипенем) была не обнаружена.

Микробиологические исследования выявили почти во всех пробах влагалищной слизи наличие *Enterococcus faecalis*, в двух пробах *Pseudomonas aeruginosa* и в одной пробе *St. aureus*. В 4 пробах молока был обнаружен золотистый стафилококк и энтерококк фекальный, в нескольких пробах синегнойная палочка и бактерии группы энтеробактер. Все обнаруженные виды микроорганизмов были чувствительны к антимикробным препаратам (ампициллин, амоксицилин, доксицилин, левомицетин, офлоксацин, рифампицин, цефтриаксон, ципрофлоксацин, меропенем).

#### Выводы.

Проведенные исследования двумя разными способами показали различия видового состава микробного фона в биологическом материале.

Методом ПЦР в пробах влагалищной слизи были обнаружены бактерии группы *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. и *E. coli*. Микробиологические исследования выявили наличие в пробах *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *St. aureus*. Данные патогенные и условно-патогенные бактерий могут быть причиной возникновения заболевания органов размножения, среди которых значительное место занимают эндометриты [5,9].

В пробах молока методом ПЦР были обнаружены бактерии: *St. aureus*, *E. faecalis* и *Streptococcus* spp.. Микробиологические исследования показали наличие в молоке бактерий: *St. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* и группу *Enterobacter* spp. Недопустимо попадание в молоко болезнетворных бактерий и микробов. Золотистый стафилококк мо-

жет приводить к воспалению молочных желез у коров, развитию маститов, а употребление такого молока к диспепсическим расстройствам желудочно-кишечного тракта и пищевым отравлениям, как у людей, так и у животных. В некоторых пробах присутствовали бактерии группы *Enterococcus* spp. Данные микроорганизмы могли попасть в пробу молока при несоблюдении правил отбора проб (грязные руки, инвентарь и т.д.) и норм гигиены содержания крупного рогатого скота.

Все обнаруженные виды патогенных и условно-патогенных бактерий были чувствительны к антимикробным препаратам и не имели резистентности к ним, что подтвердилось и ПЦР и микробиологическими исследованиями.

При исследовании биологического материала методами ПЦР и микробиологии были получены разные результаты. Невозможно сказать, что один из методов был не точен или не верен, так как в развитии лабораторной диагностики инфекционных заболеваний очевидна необходимость комплексного подхода, который заключается в использовании различных лабораторных методов для установления этиологического диагноза инфекционного заболевания. Разные методы, используемые в лабораторной практике должны сочетать друг друга, дополняя полноту исследования.

#### Литература:

1. Агольцов, В.А. Сравнительная диагностическая оценка серологического и молекулярно-генетического методов лабораторных исследований на лейкоз крупного рогатого скота / В.А. Агольцов, Е.С. Красникова, А.А. Щербаков // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. – № 4. – Т.90. – С. 56-59.
2. Дроботова, Д.Ю. Передовые решения для лабораторной диагностики в ветеринарии от компании ООО «Интерлабсервис» / Д.Ю. Дроботова // Farm Animals. – 2013. – № 3. – С.34-40.
3. Забровская, А.В. Чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства / А.В. Забровская // Farm Animals. – 2013. – №1. – С.78-83.
4. Комплексная программа по оздоровлению хозяйств от смешанных вирусно-бактериальных инфекций крупного рогатого скота / Под общей редакцией О.Г.Петровой, И.М.Донник, И.А.Шкуратовой / Екатеринбург. – 2006. – с.21.
5. Лаптев, Г.Ю. Исследование вагинальной слизи высокопродуктивных коров в послетельный период посредством ПЦР в реальном времени / Г.Ю. Лаптев, Н.А. Новикова, Л.А. Ильина // Сельскохозяйственные животные. – 2014. – №3. – С. 10-12.
6. Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Справочник, под редакцией проф. А.И. Карпищенко, 2001 год, «Интермедика», Санкт-Петербург.
7. Петрова, О.Г. Молекулярно-биологические методы диагностики внутриутробных инфекций крупного рогатого скота / О.Г. Петрова, Е.Ю. Белоусова, Е.В. Печура и др. // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2006. – № 8. – С. 176-177.
8. Ряпосова, М.В. Опыт усовершенствования методов лабораторной диагностики при оценке состояния здоровья высокопродуктивных коров / М.В. Ряпосова, А.И. Белоусов, Е.Н. Беспямятных // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2013. – Т.3. – №6. – С223-235.
9. Ряпосова, М.В. Распространение и этиология хронических эндометритов у коров в сельскохозяйственных организациях Свердловской области / М.В. Ряпосова, Е.Н. Шилова, О.В. Соколова // Ветеринария Кубани. – 2010. – № 6. – С. 8-9.
10. Турченко А.Н., Коба И.С. Проблема акушерско-гинекологической патологии у коров // Актуальная проблемы современной ветеринарии / Краснодарский науч.-исслед. вет. ин-т. – Краснодар, 2011. – Ч. 2. – С. 216-221.