

## ИНДИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ОСНОВЫ КОЖИ В ОБЛАСТИ КОПЫТЕЦ У КОРОВ МЕТОДОМ ПЦР

**Марьин Евгений Михайлович**, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Хирургия, акушерство, фармакология и терапия»

**Ермолаев Валерий Аркадьевич**, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Хирургия, акушерство, фармакология и терапия»

ФБГОУ ВО Ульяновская ГСХА, 432017, г. Ульяновск, бульвар Венец, 1; тел.: (8422) 55-95-98; e-mail: evgenimari@yandex.ru, e-mail: ermwa@mail.ru

**Ключевые слова:** коровы, микроорганизмы, ПЦР-диагностика, некробактериоз.

В данной статье приведены результаты выделения микроорганизмов, у больных гнойным пододерматитом коров при использовании метода ПЦР. Для проведения ПЦР использовался комплект для ПЦР-диагностики СЕПТОСКРИН и НУКЛЕАПОЛ. В пробах раневого экссудата методом Rial-Time PCR выделены следующие микроорганизмы: *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus faecalis* и *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* Возбудителя некробактериоза в течение всего экспериментального периода не обнаружено.

### Введение

Для увеличения количества продукции животноводства в настоящее время особое внимание уделяется вопросам интенсификации производства и выведению высокопродуктивных пород крупного рогатого скота. Как известно, высокопродуктивные коровы болеют намного чаще, это обусловлено выведением из организма с молоком большого количества питательных веществ и микроэлементов, что и влияет на снижение резистентности и реактивности организма [1].

Проведенный мониторинг и ортопедическая диспансеризация поголовья крупного рогатого скота показали, что за период проводимой работы на хирургические заболевания приходилось 45...57% от поголовья, а в некоторых хозяйствах – 57...75%, при этом на болезни дистального отдела конечностей приходилось 65...70% среди хирургических патологий [2, 3, 4, 5, 6].

При болезнях конечностей пораженный орган постоянно контактируется с почвой и другими объектами окружающей среды, и наличие небольших повреждений целостности кожного покрова приводит к обсеменению раны различной бактериальной флорой и возникновению воспалительного процесса [7].

Целью данной работы явился сравнительный анализ состава микроорганизмов, выделяемых у больных гнойным пододерматитом коров методом Rial-Time PCR.

### Объекты и методы исследований

Экспериментально-клинические исследования проводили в племенном хозяйстве ООО ПСК «Красная Звезда» с. Большие Ключищи Ульяновского района Ульяновской области, а молекулярно-биологические исследования осуществляли на базе малого инновационного предприятия ООО «Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии» ФБГОУ ВО Ульяновская ГСХА.

Животных, подобранных для эксперимента, по принципу парных аналогов разделили на 3 группы - по 10 животных в каждой, возраст 4...6 лет, масса 450...500 кг, с диагнозом «гнойный пододерматит».

Животным первой группы (далее в работе – контрольная) – после хирургической обработки накладывалась стерильная салфетка с порошком Островского, после чего проводилось наложение бинтовой повязки, с последующей её заменой через каждые 3 дня, до исчезновения гнойных выделений и образования крупнозернистой грануляции. Во второй фазе на стерильную салфетку наносили 3% тетрациклиновую мазь, вплоть



**Рис. 1 – Гнойный пододерматит**

до выздоровления животного. Лечение проводилось до полного клинического выздоровления животного.

Во второй группе (далее в работе первая опытная) – также после хирургической обработки накладывалась стерильная салфетка с опытным порошком, состоящим из природного сорбента – диатомита, сульфата цинка, стрептоцида и борной кислоты, далее накладывалась бинтовая повязка. Осмотр проводился через каждые 3 дня, после осмотра происходила смена повязок, после окончания фазы гидратации применялась мазь Левомеколь. Перевязки проводились до полного клинического выздоровления животного.

В третьей группе (далее в работе вторая опытная) – после хирургической обработки накладывалась стерильная салфетка с опытным порошком, состоящим из природного сорбента – диатомита, сульфата меди, перманганата калия и фурациллина, далее накладывалась бинтовая повязка. Осмотр проводился через каждые 3 дня, после осмотра происходила смена повязок, после окончания фазы гидратации применялась мазь Левомеколь. Перевязки проводились до полного клинического выздоровления животного.

Молекулярно-биологические исследования проводили до начала лечения и

в конце лечения. Отбор проб проводили при помощи специального стержня с накопчиком из гигроскопичного материала, которым делали мазок с поверхности патологического очага и затем помещали в стерильные пробирки с физиологическим раствором.

Для диагностики некробактериоза биологическим материалом для исследований являлись гнойно-некротические наложения, которые соскабливали ложкой Фолькмана с пораженных тканей до здоровых слоев ткани. Отбор проб осуществляли согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза» [8].

Для выделения ДНК с отобранного с копытец биоматериала использовали «Комплект реагентов для выделения ДНК из биопроб» (Литех, г. Москва), в основе метода лежит лизис бактериальных клеток, сорбция ДНК на силикагеле и отмывка ДНК спиртово-солевым буфером. Для исследований использовался комплект для ПЦР-диагностики СЕПТОСКРИН (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus faecalis* и *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*) и комплект для ПЦР-диагностики НУКЛЕАПОЛ – РВ (*Fusobacterium*).

Для проведения ПЦР использовали

Таблица 1

## Исследование видового состава микроорганизмов у ортопедически больных коров

Идентификатор пробирики	До лечения						В конце лечения					
	1 – опытная группа		2 – опытная группа		Контрольная группа		1 – опытная группа		2 – опытная группа		Контрольная группа	
	Ср, Fam	Результат	Ср, Fam	Результат	Ср, Fam	Результат	Ср, Fam	Результат	Ср, Fam	Результат	Ср, Fam	Результат
1 Strep		-		-		-		-		-		-
1 Staph		-	36,2	+	35,4	+		-		-		-
1 Enteroc	18,3	+	35,0	+	34,2	+		-		-		-
1 Pseu aer		-		-	35,4	+	19,3	+		-		-
1 Serr		-		-		-		-		-		-
1 Prot		-		-		-		-		-		-
1 Ent, Kleb	14,5	+	36,1	+	36,4	+		-		-		-
1 E.coli	36,2	+	35,7	+		-		-		-		-
2 Strep		-		-	29,3	+		-		-		-
2 Staph		-		-	34,0	+		-		-	22,3	+
2 Enteroc		-	26,5	+	22,1	+		-		-		-
2 Pseu aer		-		-	29,8	+		-		-		-
2 Serr		-		-		-		-		-		-
2 Prot	23,1	+		-	34,0	+		-		-	20,1	+
2 Ent, Kleb		-		-		-		-		-		-
2 E.coli		-	32,3	+	36,1	+		-		-		-
3 Strep	26,1	+		-	28,8	+		-		-		-
3 Staph	23,1	+	28,5	+	34,5	+		-		-		-
3 Enteroc	30,3	+	34,6	+	28,4	+	21,3	+		-		-
3 Pseu aer		-	27,7	+	30,5	+		-		-		-
3 Serr		-		-		-		-		-		-
3 Prot	31,1	+	34,5	+		-		-		-		-
3 Ent, Kleb		-		-	36,3	+		-		-		-
3 E.coli	35,5	+	34,8	+	35,3	+		-		-		-
4 Strep		-		-		-		-		-		-
4 Staph	28,4	+	26,9	+		-		-		-	26,8	+
4 Enteroc		-	28,3	+	17,8	+		-		-		-
4 Pseu aer		-		-	25,8	+		-		-		-
4 Serr		-		-		-		-		-		-
4 Prot		-	27,8	+		-		-		-		-
4 Ent, Kleb		-		-		-		-		-		-
4 E.coli		-		-	31,2	+		-		-		-
5 Strep	27,3	+		-		-		-		-		-
5 Staph	34,1	+	34,8	+		-	20,6	+		-	17,7	+
5 Enteroc	22,5	+	19,0	+		-		-		-	18,3	+
5 Pseu aer	34,6	+	32,2	+	19,7	+		-		-		-
5 Serr		-		-		-		-		-		-
5 Prot	31,3	+	32,9	+	25,1	+		-		-		-
5 Ent, Kleb		-		-		-		-		-		-
5 E.coli	32,7	+		-		-		-	36,8	+	22,3	+
6 Strep		-		-		-		-		-		-
6 Staph		-		-		-		-		-		-
6 Enteroc		-	14,3	+	21,7	+		-		-		-
6 Pseu aer		-	13,3	+		-		-		-		-
6 Serr		-		-		-		-		-		-
6 Ent, Kleb	30,0	+		-		-		-		-		-
6 E.coli	24,1	+	15,8	+	24,9	+		-		-	24,6	+
6 Prot		-		-		-		-		-		-
7 Strep		-		-		-		-		-		-
7 Staph		-	33,8	+	29,3	+		-		-		-
7 Enteroc		-	21,2	+	22,3	+		-		-		-
7 Pseu aer	26,7	+	32,7	+		-		-		-		-
7 Serr		-		-		-		-		-		-
7 Prot		-		-		-		-		-		-
7 Ent, Kleb		-		-		-		-		-		-
7 E.coli		-		-	23,7	+		-	37,2	+	16,8	+
8 Strep	35,5	+	25,7	+		-		-		-		-
8 Staph		-	24,5	+		-		-		-		-
8 Enteroc		-	20,6	+		-		-		-		-
8 Pseu aer	33,7	+	28,4	+		-		-		-		-
8 Serr		-		-	18,4	+		-		-		-
8 Prot		-	33,7	+	25,3	+	20,8	+		-		-
8 Ent, Kleb		-		-	16,8	+		-		-		-
8 E.coli		-	36,6	+	21,4	+		-		-		-
9 Strep	35,3	+	27,3	+		-		-		-		-
9 Staph		-	28,0	+		-		-	36,8	+		-
9 Enteroc		-	25,7	+	17,5	+		-		-	19,3	+
9 Pseu aer		-	24,5	+		-		-		-		-
9 Serr	34,6	+		-		-		-		-		-
9 Prot		-		-	29,1	+		-		-	19,7	+
9 Ent, Kleb	34,8	+	36,6	+	17,3	+		-		-		-
9 E.coli		-	34,7	+		-		-		-		-
10 Strep	36,1	+		-		-		-		-		-
10 Staph		-	35,0	+	27,5	+		-		-		-
10 Enteroc		-	34,4	+		-		-		-		-
10 Pseu aer	19,1	+	33,7	+		-		-		-		-
10 Serr	29,6	+		-		-		-		-		-
10 Prot		-		-	26,0	+		-		-	15,8	+
10 Ent, Kleb		-		-		-		-		-		-
10 E.coli	33,6	+	33,0	+	23,8	+		-		-		-
K+ Strep	31,4	+	24,2	+	23,6	+	14,6	+	33,8	+	20,8	+
K+ Staph	23,5	+	23,8	+	21,2	+	20,9	+	34,8	+	26,5	+
K+ Enteroc	23,3	+	21,6	+	20,8	+	21,0	+	34,6	+	24,8	+
K+ Pseu aer	31,6	+	21,3	+	23,5	+	25,4	+	34,5	+	30,0	+
K+ Serr	22,9	+	23,8	+	23,7	+	24,0	+	36,7	+	29,8	+
K+ Prot	24,6	+	23,6	+	23,5	+	30,2	+	34,7	+	21,0	+
K+ Ent, Kleb	23,9	+	23,5	+	14,2	+	27,2	+	34,6	+	19,9	+
K+ E.coli	15,2	+	15,1	+	22,4	+	17,6	+	35,9	+	22,6	+
K-		-		-		-		-		-		-

детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва). Постановку полимеразной цепной реакции проводили в микропробирках емкостью 0,2 мл, использовали готовые реакционные смеси СЕПТОСКРИН и НУКЛЕАПОЛ – РВ, к которым добавляли по 10 мк ДНК-матрицы. Пробирки с готовой ПЦР-смесью встряхивали на смесителе, все капли со стенок осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек.

Переносили пробы в амплификатор и проводили реакцию. Параллельно с исследуемыми образцами ставили отрицательный контрольный образец (с деионизированной водой). Учет результатов осуществляли отдельно по каждому из каналов, в соответствии с инструкцией к прибору. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флюоресценции с установленной на соответствующем уровне (0,05) пороговой линией (treshhold) значения порогового цикла «Сt». Образец считали отрицательным, если значение «Сt» по каналу Fam отсутствовало.

#### Результаты исследований

При исследовании видового состава микроорганизмов, выделяемых с гнойно-некротических очагов в области копытцев, установлено (таблица 1), что в начале лечения в контрольной группе обнаружено *Streptococcus spp.* – в 2 пробах (20%), *Staphylococcus aureus* в 5 пробах (50%), *Enterococcus faecalis* и *E. faecium* в 5 пробах (50%), *Pseudomonas aeruginosa* в 7 пробах (70%), *Serratia spp.* в 1 пробе (10%), *Proteus spp.* в 5 пробах (50%), *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* в 4 пробах (40%), *Escherichia coli* в 7 пробах (70%).

Было идентифицировано 2 вида и 3 вида микроорганизмов у 3 животных соответственно. 4 вида и 6 видов микроорганизмов было обнаружено соответственно у 2 ортопедически больных коров.

В первой опытной группе до начала использования экспериментальной схемы лечения обнаружено *Streptococcus spp.* 6 пробах (60%), *Staphylococcus aureus* в 3 пробах (30%), *Enterococcus faecalis* и *E. faecium* в 2 пробах (20%), *Pseudomonas aeruginosa* в 4 пробах (40%), *Serratia spp.* в 2 пробах (20%),

*Proteus spp.* в 3 пробах (30%), *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* в 3 пробах (30%), *Escherichia coli* в 5 пробах (50%).

У 3 животных идентифицирован 1 вид микроорганизмов, у 3 коров – 2 вида микроорганизмов, у 2 животных – 3 вида микроорганизмов и по 5 видов и 6 видов микроорганизмов выделено у одного животного соответственно.

Во второй опытной группе до начала лечения обнаружено *Streptococcus spp.* 2 пробах (20%), *Staphylococcus aureus* в 8 пробах (80%), *Enterococcus faecalis* и *E. faecium* в 10 пробах (100%), *Pseudomonas aeruginosa* в 7 пробах (70%), *Proteus spp.* в 4 пробах (40%), *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* в 2 пробах (20%), *Escherichia coli* в 7 пробах (70%). *Serratia spp.* не выявлены.

У 1 животного идентифицировано 2 вида микроорганизмов, у 3 животных – 3 вида микроорганизмов и 4 вида микроорганизмов соответственно. 5 видов микроорганизмов выделено у 1 коровы, больной гнойным пододерматитом, и 6 видов микроорганизмов у 2 животных.

В результате проведенного лечения в контрольной группе были выявлены *Staphylococcus aureus* в 3 пробах (30%), *Enterococcus faecalis* и *E. faecium* в 2 пробах (20%), *Proteus spp.* в 3 пробах (30%), *Escherichia coli* в 3 пробах (30%). У 4 животных идентифицирован 1 вид микроорганизмов, у 2 животного 2 вида микроорганизмов и у 1 животного – 3 вида микроорганизмов.

В первой опытной группе после проведенной терапии гнойных пододерматитов были обнаружены: *Staphylococcus aureus* в 1 пробе (10%), *Enterococcus faecalis* и *E. faecium* в 1 пробе (10%), *Pseudomonas aeruginosa* в 1 пробе (10%) и *Proteus spp.* в 1 пробе (10%). У 4 животных идентифицирован 1 вид микроорганизмов.

Во второй опытной группе в конце экспериментального лечения обнаружено *Staphylococcus aureus* в 1 пробе (10%) и *Escherichia coli* в 2 пробах (20%). У 3 животных опытных групп идентифицировано по 1 виду микроорганизмов.

Исследование проб на наличие бактерий рода *Fusobacterium* показало отсутствие

возбудителя некробактериоза у подопытных животных как до лечения, так и после.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что в 30 пробах, или 100%, отобранных с пораженных гнойно-некротических участков основы кожи копытец у всех подопытных больных коров до начала лечения, присутствуют следующие ассоциации микроорганизмов: *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus faecalis* и *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* После проведенного лечения отмечается снижение количества проб: в контрольной группе до 7, или 70%, в первой опытной группе до 4 проб, или 40% и во второй опытной группе до 3, или 30%. Возбудителя некробактериоза в течение всего экспериментального периода не обнаружено. Таким образом, использование экспериментального лечения при гнойных пододерматитах способствует снижению микробной обсеменности.

#### Библиографический список

1. Лабкович, А.В. Клинико-гематологический статус коров с язвенными поражениями кожи в дистальном участке конечностей при применении комплексного лечения / А.В. Лабкович // Ученые записки УО ВГАВМ, т.52, вып.1, 2016. – С. 53-56.
2. Болдырев, Д.Н. Ортопедическая и акушерско-гинекологическая патология у коров в условиях привязного содержания / Д.Н. Болдырев, В.А. Толкачев, А.Н. Елисеев // В сборнике: Актуальные вопросы инновационного развития агропромышленного комплекса материалы Международной научно-практической конференции, 2016. - С. 80-83.
3. Гимранов, В.В. Этиология, характер распространенности и особенности патологий в области пальцев у коров голштино-фризской породы / Гимранов В.В., Утеев Р.А., Гилязов А.Ф. // Аграрный вестник Урала. 2010. - № 3 (69). - С. 77-79.
4. Журба, В. А. Микробиоценоз гнойных пододерматитов у коров / В. А. Журба // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2014. - №4 – С. 110-113.
5. Марьин, Е. М. Болезни копытец у коров различных пород / Е. М. Марьин, В. А.Ермолаев. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - №30/1 - том 2. - С. 104-105.
6. Стекольников А.А. Профилактика и лечение специфической язвы подошвы у крупного рогатого скота препаратами Т-НЕХХ / А.А. Стекольников, М.А. Ладанова // Современные проблемы ветеринарной хирургии: Международная научно-практическая конференция, посвященная 90-летию кафедры общей, частной и оперативной хирургии УО ВГАВМ, Витебск, 3-4 ноября 2016 г. / УО ВГАВМ; ред. кол: А.И. Ятусевич (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2016. – С. 116-119.
7. Макаев, Х.Н. Профилактическая эффективность различных средств и методов лечения некротических поражений копытец крупного рогатого скота / Х.Н. Макаев, Д.А. Хузин, Р.М. Потехина, Н.А. Мухамметшин // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана, 2012. – Т. 209. - С.202-205.