



Авторы: **Д.Н. Масюк, С.Г. Коляда, А.В. Кокарев, Н.Ю. Неверковец,**  
Научно-исследовательский центр биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК, «BIOSAFETY CENTER»

# Современные представления о лабораторной диагностике **маститов у коров**

*Маститы являются одной из самых распространенных проблем в молочном скотоводстве, вследствие которых фермы несут значительные экономические убытки. Во всем мире, ежегодные потери из-за мастита составляют около 35 млрд. долларов США (Wellenberg G.J., 2012). Ущерб при заболевании маститами складывается из утилизации молока из пораженных долей вымени, снижения суточного удоя во время болезни, недополучения молока в период восстановления молочной железы, затрат на лечение и выбраковки животных.*

К факторам, повышающим вероятность заражения маститами, относятся: возраст коров (восприимчивость к маститам увеличивается с возрастом и достигает максимума в 4-6 лет); генетическая предрасположенность (резистентность, форма сосков, конституция, положение вымени, расстояние между сосками, уровень надоев и жирность молока); доильные аппараты (избыточное давление, использование некачественных расходных материалов приводит к травмам сосков); кормление (не сбалансированность рационов по витаминам А, Е, бета-каротину, минеральным веществам, приводит к нарушению обменных процессов); погодные и климатические условия (тепло, влажность, холод и сквозняки – предрасполагающие факторы); а также стадия лактации. Заболеваемость маститом в период лактации со 2 по 6 месяц составляет 47%, в период ранней лактации до 1 месяца – 23%, с 6 по 9 месяц лактации – 21%, и после 9 месяца лактации – 9% от общего числа выявленных маститов [1].

Этиологический спектр возбудителей маститов очень широк. Известно более 137 видов и подвидов потенциальных патогенов, которые могут вызывать воспаление молочной железы. Тем не менее, в молочных стадах, как правило, мастит бывает двух видов: экологический и контактный. Экологический мастит вызывается микроорганизмами, которые всегда присутствуют во внешней среде и являются представителями фекальной микрофлоры коров. Чаще всего отмечают колиформный мастит, который вызывают *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*. Инфекционные маститы вызывают патогенные микроорганизмы, которые передаются от одной коровы к другой с помощью доильных установок или рук доярки, во время доения – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*. Также достаточно часто маститы вызывают микоплазмы (*Mycoplasma bovis*) [3], дрожжи и водоросли (*Prototheca*) [2].

На сьогоднішній день найбільш розповсюдженими в світі збудителями маститів є збудителі, наведені в **Таблиці 1**:

**Таблиця 1. Основні збудителі маститів**

**Спектр збудителів:**

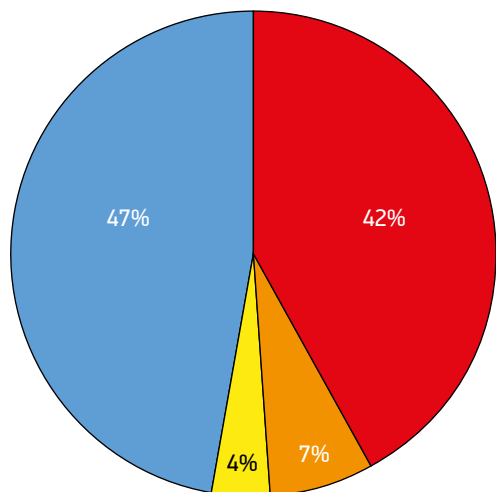
- Staphylococcus spp.**
- Staphylococcus aureus
- Streptococcus spp.**
- Streptococcus agalactiae
- Streptococcus dysgalactiae
- Streptococcus uberis
- Enterobactéries**
- Escherichia coli**
- Klebsiella spp.**
- Mycoplasma spp.**
- Mycoplasma bovis
- Pseudomonas spp.**
- Arcanobacterium (Trueperella) pyogenes**

**Высококонтагиозные збудители:**

- Mycoplasma bovis
- Staphylococcus aureus
- Streptococcus agalactiae
- Streptococcus uberis

По результатам бактеріологічних моніторингових досліджень, проведених в «BIOSAFETY CENTER» за останні кілька років встановлено, що частіше всього, в 53% випадків, мастити протікають як коінфекція, з них 42% випадків викликані двома збудителями, 7% – трьома і 4% – чотирма патогенами. В інших 47% випадків, мастити реєструються в формі моноінфекції (см. **Рисунок 1**).

**Рисунок 1. Сочетанное действие збудителів маститів**

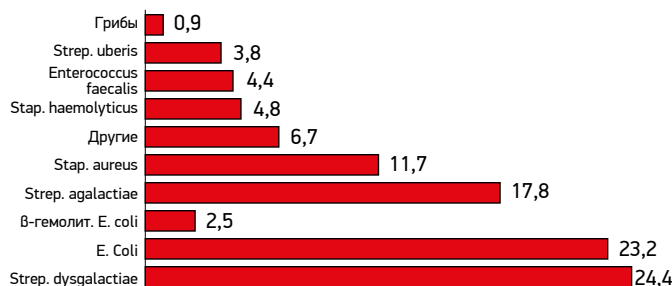


- 1 збудитель
- 2 збудителя
- 3 збудителя
- 4 і більше збудителів

Як видно з **Рисунка 2**, превалюючими патогенами при моноінфекції запалення молочної залози є E. Coli і Streptococcus dysgalactiae, які виділяються з проб молока в 25,7% і 24,4% випадків. При цьому E. coli в 9,7% випадків мала β-гемолітичні властивості. Також досить часто зустрічаються мастити, спровоковані Streptococcus agalactiae (17,8%) і Staphylococcus aureus (11,7%). Такі збудителі, як Staphylo-

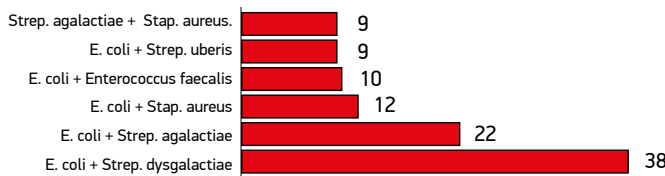
coccus haemolyticus, Enterococcus faecalis і Streptococcus uberis викликають моноінфекцію молочної залози в 4-5%.

**Рисунок 2. Бактеріальний спектр збудителів маститів при моноінфекції**



В разі комбінованої або коінфекції (см. **Рисунок 3**) частіше всього, в 38% випадків, реєструється комбінація E. coli і Streptococcus dysgalactiae і в 22% – E. coli і Streptococcus agalactiae. Менше часто (9% – 12%) зустрічається комбінація E. coli і Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, або Streptococcus uberis, а також Streptococcus agalactiae і Staphylococcus aureus.

**Рисунок 3. Бактеріальний спектр комбінованих або асоційованих збудителів маститів при поліінфекції**



Следователно, частіше всього, етіологія маститів у корів пов'язана з такими бактеріями як Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus agalactiae, E. coli і Staphylococcus aureus, при цьому всі ці бактерії можуть викликати як моно, так і поліінфекції молочної залози.

**Методи діагностики маститів**

Діагностика маститів ґрунтується на аналізі анамністичних даних, виявленні клінічних ознак і проведенні лабораторних досліджень.

Ключовим ланкою в діагностиці запалення молочної залози є застосування лабораторних методів дослідження, які дозволяють не тільки діагностувати мастити на ранніх (субклінічних) стадіях, але й визначити їх етіологічний спектр, виявляти превалюючих і супутуючих в патологічному процесі збудителів, а також визначити ступінь їх чутливості до антибактеріальних препаратів. Все це дає можливість ефективно скорректировать систему лікувально-профілактичних заходів.

Незважаючи на інтенсивні дослідження, які історично ґрунтуються на виявленні бактеріальних патогенів вимени, близько 20-35% клінічних випадків мастита у корів залишаються невідомої етіології. Встановлено, що вірусні інфекції можуть грати пряму або косвенну роль в етіології мастита великої рогатої худоби.

Поэтому, их значение и их влияние на экономику требует постоянного мониторинга по таким заболеваниям как – герпесвирус КРС 4-го типа (BoHV-4), инфекционный ринотрахеит (BoHV-1), вирусная диарея (BVDV), парагрипп-3 (PI-3), лейкоз (BLV).

Следует отметить, что лечение и профилактика маститов во многом зависит от состояния обменных процессов организма животного и состояния его иммунной системы. Известно, что при нарушениях углеводного, белкового, витаминного и других обменов, а также на фоне циркуляции в стаде вирусных инфекций в организме животного развивается иммунодепрессия, которая может способствовать хронизации мастита и, как следствие, выбраковке животного. Поэтому, для предупреждения развития иммуносупрессии, необходимо минимум два раза в год проводить биохимические и серологические исследования сыворотки крови от коров групп раннего и позднего сухостоя, а также от животных через 10 дней после отела и на 2-3 месяце лактации, что поможет оценить эффективность схемы иммунопрофилактики и качества кормления животных.

Стратегия скрининга маститов на ферме состоит из нескольких этапов. Первым этапом диагностики маститов является контроль количества соматических клеток в общей пробе молока (молоко из танка), этот этап осуществляется непосредственно на предприятии.

По данным Tiwari J.G. [1] уровень соматических клеток в молоке из танка тесно коррелирует с количеством маститных коров в стаде (см. **Таблицу 2**).

**Таблица 2. Корреляция концентрации соматических клеток в пробе молока из танка с количеством маститных коров в стаде**

Количество соматических клеток в 1 мл	Количеством маститных коров в стаде, %
100 000	до 10
200 000	до 15
400 000	до 35
700 000	до 70

Второй этап системы диагностики маститов заключается в определении спектра бактерий в молоке из танка, а также выявлении доминирующих групп, которые циркулируют на ферме. Осуществляется с помощью двух основных методов – классического бактериологического и современного молекулярно-генетического – полимеразная цепная реакция (ПЦР). Первый основан на культивировании микроорганизмов, содержащихся в исследуемых образцах с последующей их идентификацией до вида. Его преимуществами являются низкая стоимость исследования, широкий спектр одновременно выделяемых бактерий, а также возможность определения чувствительности выделенных бактерий к антибиотикам. Но данный метод не лишён недостатков, к которым можно отнести длительность исследования, трудоемкость, высокий риск контаминации, низкую чувствительность. Особенно важно в культивировании возбудителей маститов учитывать тот факт, что молоко или молозиво, из которого производятся посевы, богато иммунными компонентами, такими как

иммуноглобулины, лизоцим, комплемент, лейкоциты и др. Каждый из этих компонентов обладает бактериостатической и/или бактериолитической активностью, что может привести к ложно негативным результатам.

Второй метод диагностики маститов – это количественный ПЦР анализ (qPCR), суть которого заключается в выявлении и определении количества геном-эквивалентов уникальной последовательности ДНК или РНК бактерий и вирусов, которые вызывают развитие патологического процесса. Достоинствами этого метода является скорость проведения (в течении 4-8 часов), исключение влияния иммунных факторов молока или молозива на конечный результат, возможность идентифицировать возбудителя даже в случае его гибели, широкая панель возбудителей (10 патогенов), высокая степень чувствительности и специфичности (позволяет получать достоверные результаты даже при тестировании образцов молока из танка). Из недостатков этого метода стоит отметить относительно высокую стоимость и отсутствие возможности составления антибиотикограммы.

Следовательно, ввиду выше перечисленных особенностей, эти методы взаимодополняют друг друга, что обуславливает необходимость их одновременного применения для диагностики маститов и формирования схемы лечебно-профилактических мероприятий.

Третий этап заключается в ежемесячном скрининге дойного стада (с высоким содержанием соматических клеток) по целевым возбудителям маститов, которые были определены на втором этапе с помощью бактериологического и молекулярного методов. На этом этапе происходит отслеживание изменений в бактериологическом спектре маститоформных бактерий, что обуславливает изменения в стратегии применения антибактериальных препаратов.

Таким образом, для формирования на молочно-товарных фермах высокоэффективных программ по лечению и профилактике маститов у коров, необходимо 1 раз в 3-6 месяцев проводить контроль уровня обменных процессов организма животных и мониторинг инфекционных заболеваний, и ежеквартально осуществлять комплексное лабораторное исследование молока двумя основными методами – бактериологическим и qPCR.

Следует отметить, что большое значение в лабораторной диагностике имеет процедура отбора образцов, так как при ее нарушениях можно получить искаженные или вовсе ошибочные результаты. Особенно, для выявления патогенов, вызывающих мастит, важна техника отбора проб, способы их хранения и транспортировки.

### Процедура отбора проб молока

При сборе образцов молока должна соблюдаться абсолютная асептика, для предотвращения загрязнения микроорганизмами, обнаруженными на коже, вымени и сосках коров; руках оператора; и в помещении. Загрязненные образцы влекут за собой ложную постановку диагноза, увеличение объема работы и расходов. Загрязнения можно избежать, следуя правилам, описанным ниже.

#### Инвентарь для отбора проб:

- Стерильные флаконы или пробирки;
- 70% спирт (этиловый или изопропиловый);
- Ватные диски или марлевые тампоны, смоченные в 70%



спирте, или специальные готовые индивидуально упакованные спиртовые тампоны;

- Лед или аккумуляторы холода для охлаждения образцов;
- Штативы для пробирок;
- Средство для дезинфекции сосков;
- Бумажные или тканевые полотенца;
- Несмываемые маркеры, самоклеящиеся этикетки для идентификации образцов.

#### Техника отбора проб:

- Пробирки маркируют до отбора проб (дата, ферма, № коровы, четверть);
- Тщательно вымыть и высушить загрязненные соски и вымя перед отбором проб;
- Слить несколько струек молока из сосков и отобрать молоко у коров со всех сосков с признаками клинического мастита. Записать все наблюдения клинических признаков;
- Соски тщательно протереть индивидуальной/одноразовой салфеткой;
- Провести дезинфекцию сосков (начинать нужно с дальних сосков). Протереть ватными или марлевыми тампонами, смоченными в 70%-ном спирте (не мокрыми!!). Один ватный тампон использовать на один (!) сосок. Не касаться чистых сосков. Избегайте контакта чистых сосков с грязными конечностями;
- Сбор образцов начинают с ближних сосков. Снимите колпачок с пробирки или флакона, но не ставьте крышку на пол и не касайтесь внутренней поверхности крышки. Всегда держите открытую пробирку концом вниз. Поддерживайте пробирку или флакон приблизительно под углом 45 градусов во время взятия пробы. Не допускайте касания кромки пробирки к кончику соска. Соберите  $\approx 15$  мл молока и немедленно плотно закройте крышку. Не наливайте под самый верх пробирки, особенно если образцы нужно замораживать;
- Для объединенной пробы (молоко из всех четырех четвертей сдаивают в 1 пробирку) начинают сбор образцов с ближних сосков и двигаются к соскам на дальней стороне вымени. Отбор молока ( $\approx 10-20$  мл) из каждой четверти вымени;
- Если пробы берутся в конце доения или между доениями, соски нужно обработать бактерицидным средством;
- Образцы следует хранить на льду. Если исследование будут проводить более чем через 48 часов – сразу заморозить.

#### Транспортировка образцов:

Образцы для исследования на ПЦР могут быть охлажденные или замороженные, с консервантом или без него. Есть три способа доставки образцов:

1. Отправить образцы сырого молока. Образцы нужно охладить и отправить на льду или аккумуляторах холода. Образцы нельзя долго хранить до отправки в лабораторию.
2. Образцы заморозить на месте сбора и позже отправить на льду или аккумуляторах холода в лабораторию (замороженные).
3. В образцы вносят консервант на месте сбора, их можно хранить в течение какого-то времени, а затем отправить в лабораторию (без льда). Для консервации проб используют на 100 мл молока 1 мл 10% раствора

двухромовоокислого калия или 1-2 капли 40% раствора формалина.

Для проведения лабораторных исследований объём образца молока для исследования должен быть не менее 50-100 мл.



## Выводы

Для своевременной диагностики, эффективного лечения и профилактики маститов необходимо проводить комплексные лабораторные исследования, которые включают qPCR и классическую бактериологию, что позволяет идентифицировать возбудителей маститов и определить их чувствительность к препаратам антибактериального действия, а также осуществлять регулярный серологический и биохимический мониторинг основного стада для исключения нарушений обмена веществ и развитие иммуносупрессии, что может усугубить воспалительный процесс и затруднить его лечение. **i**

## Список литературы

1. Tiwari J.G., Babra C., Tiwari H.K., Williams V., Wet S.D., et al. (2013) Trends In Therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis: An Overview. *J Vaccines Vaccin* 4: 176.
2. Barkema H.W., Schukken Y.H., Lam T.J., Beiboer M.L., Wilmink H. et al. (1998) Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci* 81: 411-419. 29.
3. Fox L.K., Kirk J.H., Britten A. (2005) *Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52: 153-160.