

ПОШИРЕНІСТЬ КОНТАГІОЗНИХ ЗБУДНИКІВ МАСТИТУ КОРІВ У ЗРАЗКАХ ЗБІРНОГО МОЛОКА

Р. В. ЗАРІЦЬКИЙ, аспірант, <https://orcid.org/0000-0003-1074-3118>

Ю. В. ЖУК, кандидат ветеринарних наук, доцент,
<https://orcid.org/0000-0002-8827-6313>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
[https://doi.org/10.31548/dopovidi.2\(108\).2024.017](https://doi.org/10.31548/dopovidi.2(108).2024.017)

Анотація. Мастит є одним з найпоширеніших захворювань на молочних фермах і завдає значних економічних збитків, які пов'язані з витратами на лікування хворих корів, зниженням надоїв та якісних показників молочної продукції, а також ризиком передчасного вибракування тварин. Збудників маститу поділяють на дві групи, серед яких найважливіше значення мають контагіозні патогени, які передаються переважно від однієї корови до іншої, особливо через доїльне обладнання, що, в свою чергу, може призвести до інфікування всього дійного стада. Тому, встановлення поширеності контагіозних збудників маститу на сьогоднішній день є досить актуальним.

Метою цього дослідження було ідентифікувати та встановити поширеність контагіозних збудників маститу у зразках збірного молока з використанням бактеріологічних та молекулярно-генетичних (ПЛР-РЧ) досліджень.

Результатами досліджень контагіозних збудників маститу в зразках збірного молока методом ПЛР-РЧ встановлено, що найпоширенішими є *Streptococcus agalactiae* 36 % і *Streptococcus uberis* – 35 %. Дослідження зразків збірного молока бактеріологічним методом, показав, що найпоширенішими детектованими контагіозними збудниками є *Streptococcus agalactiae* – 55 % і *Streptococcus uberis* – 28 %.

Ключові слова: ПЛР-РЧ, бактеріологічний метод, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*

Актуальність та постановка проблеми. Власники фермерських господарств та виробники молочної продукції зазнають значних економічних збитків через різні хвороби заразної і незаразної етіології, серед яких однією з основних – є запалення молочної залози. Мастит за своєю природою є складним, досить поширеним і дороговартісним захворюванням

корів на молочних фермах (Saidi, et al., 2019). Економічні збитки за маститу пов'язані з витратами на лікування хворих корів, зниження їх молочної продуктивності та якості отриманого молока, а також ризиків передчасного вибракування високопродуктивних тварин (Kaczorek, et al., 2017; Gomes, & Henriques, 2015; Zhang, et al., 2018). Згідно даних (Cheng, & Han, 2020), загальна вартість витрат, зумовлених

Заріцький Р. В., Жук Ю. В.

маститом великої рогатої худоби, оцінюється в середньому у 147 доларів США на корову на рік.

Збудники маститу поділяються на дві групи: контагіозні та енвайронментальні. Контагіозні патогени передаються переважно від однієї корови до іншої, особливо через доїльне обладнання, тоді як енвайронментальні – потрапляють у молочну залозу із зовнішнього середовища (через підстилку, мух, або навіть шкіру корови) (Chehabi, et al., 2019; Suleiman, Karimuribo, Mdegela, 2017).

До контагіозних збудників маститу відносять такі види як *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* та *Streptococcus uberis*, а також менш поширені – такі як *Mycoplasma bovis* та *Corynebacterium*, які локалізуються на вимені та шкірі. Енвайронментальні збудники, такі як *Escherichia coli*, проникають і розмножуються у вимені корови, індукують імунну відповідь і швидко елімінуються (Cheng, & Han, 2020).

В Україні дані щодо поширення контагіозних збудників маститу у збірному молоці корів не є системними, а в окремих випадках – взагалі відсутні, що свідчить про актуальність даного питання.

Мета дослідження – ідентифікування та встановлення поширеності контагіозних збудників маститу у збірному молоці з використанням бактеріологічних та

молекулярно-генетичних (ПЛР-РЧ) досліджень.

Матеріали і методи.

Дослідження зразків збірного молока на наявність контагіозних збудників маститу проводили бактеріологічним методом і ПЛР-РЧ у ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики» впродовж 2020-2023 рр. Збірні зразки молока з танків охолоджувачів надходили до лабораторії у 100 мл. стерильних пластмасових пробірках з гвинтовою кришкою після повного перемішування танку з 66 господарств різних областей України. Зразки доставляли до лабораторії за температури +4+8 °C впродовж 12 годин з моменту відбору. Для транспортування зразків використовували термобокс з хладагентами, в який поміщали запаковані в стерильних пробірках зразки молока.

Бактеріологічне дослідження проводили шляхом посіву 0,1 мл досліджуваного зразка молока на кров'яному агарі (COLUMBIA LAB-AGAR + 5 % KB «BioMaxima S.A.», Poland)), з послідуочим культивуванням в аеробних умовах за температури +37 °C, впродовж 24–48 годин. Якщо висівалось більше ніж три різних види мікроорганізмів, такий зразок вважали контамінованим і в подальшому не досліджували. На анаеробну мікрофлору зразки молока не досліджували. Ідентифікацію отриманих на кров'яному агарі

Заріцький Р. В., Жук Ю. В.

бактеріальних культур проводили методом MALDI-TOF на приладі VITEK®MS («BioMérieux», France) (Chen, et al., 2021). Для аналізу мас-спектрів використовували базу даних VITEK MS KB V3.2.0 US Version.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ). Увагу було зосереджено на контагіозних агентах, які викликають мастит у корів (Trevisoli, 2022): *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus uberis*.

Методика ПЛР для виділення генетичного матеріалу інфекційних агентів базується на екстракції нуклеїнових кислот із біологічного патологічно матеріалу, проведення реакції зворотної транскрипції РНК в кДНК (за потребою) та ампліфікації ДНК/кДНК з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією в режимі реального часу за рахунок багаторазового повторювання циклів денатурації в досліджуваній пробі, відпалу специфічних

олігонуклеотидних праймерів і зондів (мічених флуоресцентними барвниками), синтезу комплементарних ланцюгів за допомогою ферменту Tag-полімерази. Виділення нуклеїнових кислот проводили використовуючи автоматичну систему для виділення KingFisher Purification System з використанням набору MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для реакції ампліфікації виділених нуклеїнових кислот, використовували комерційні тест-набори VetMAX MastiType Micro4 Kit (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, США). Реакцію проводили на системі для детекції ПЛР продуктів в режимі реального часу на приладі QuantStudio5 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США).

Результати дослідження та їх обговорення. За молекулярно-генетичного дослідження 86 зразків збірного молока, позитивними на контагіозні збудники маститу виявлено 77 зразків, а 9 зразків – були з негативним результатом (рис. 1).

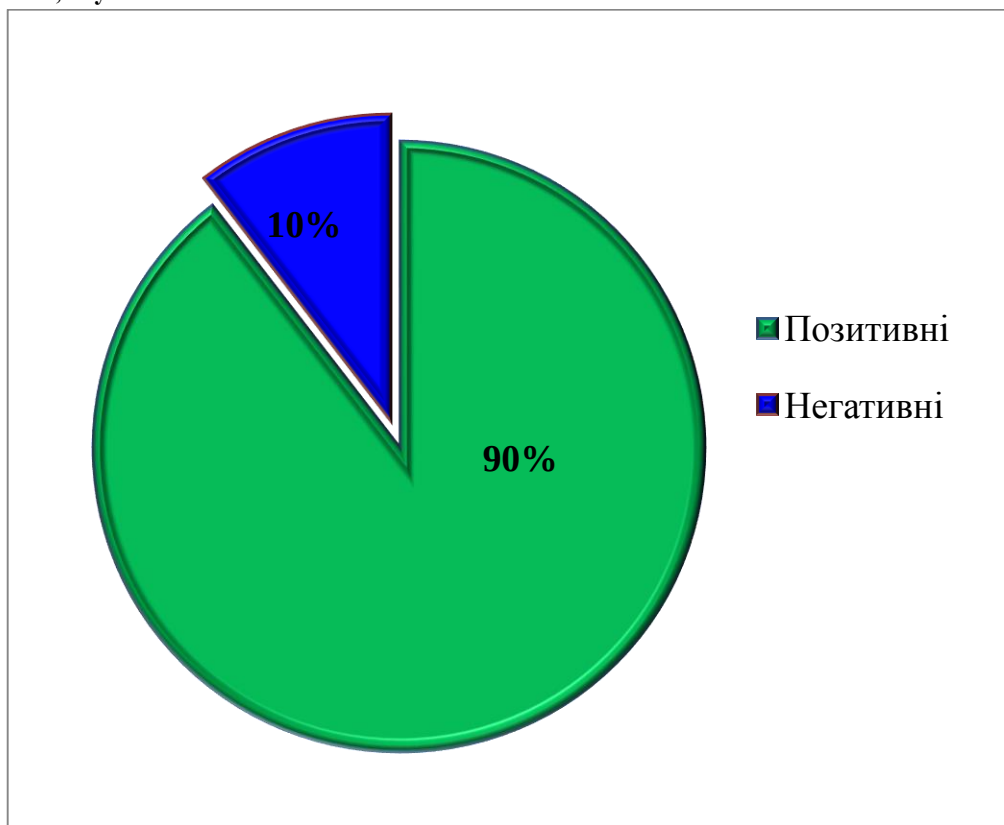


Рис. 1 Досліджені зразки збірного молока на наявність контагіозних збудників маститу

За період проведення експериментальних досліджень було детектовано 146 ізолятів контагіозних збудників маститу в зразках збірного молока (рис. 2).

Найбільший відсоток контагіозних збудників маститу в зразках збірного молока, за результатами проведених досліджень припадав на *Streptococcus agalactiae* – 36 % і *Streptococcus uberis* – 35 % від усіх ізолятів. *Staphylococcus aureus* займає проміжне положення – 24% від усіх ізолятів, а на *Mycoplasma bovis* – припало лише 5 % ізолятів.

Проведений аналіз асоціацій контагіозних збудників маститу

показав (рис. 3), що найчастіше зустрічались наступні асоціації: *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* – 14 (29,8 %) зразках, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* – 10 (21,3 %), *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* – 9 (19,1 %), *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* – 7 (14,9 %), *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* та *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma bovis* – відповідно по 2 (4,3 %) зразки.

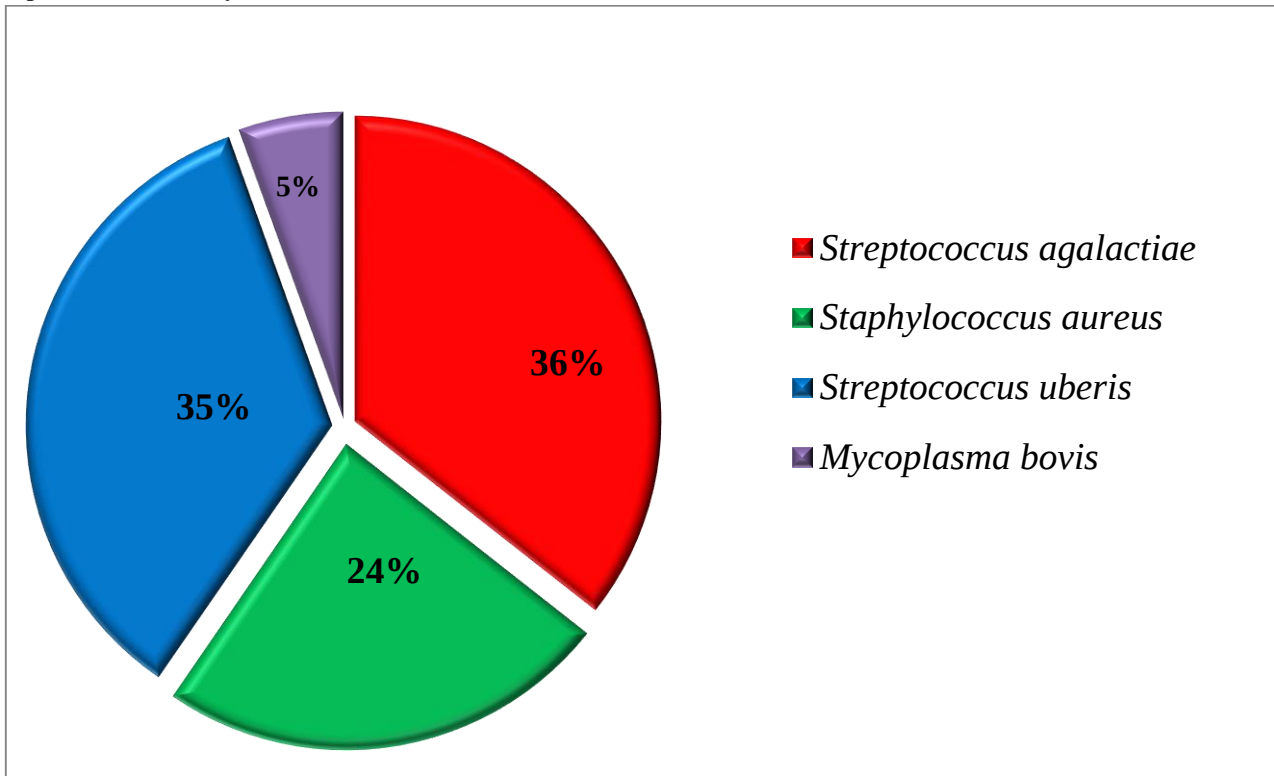


Рис. 2 Контагіозні збудники маститу детектовані методом ПЛР-РЧ в зразках збірного молока

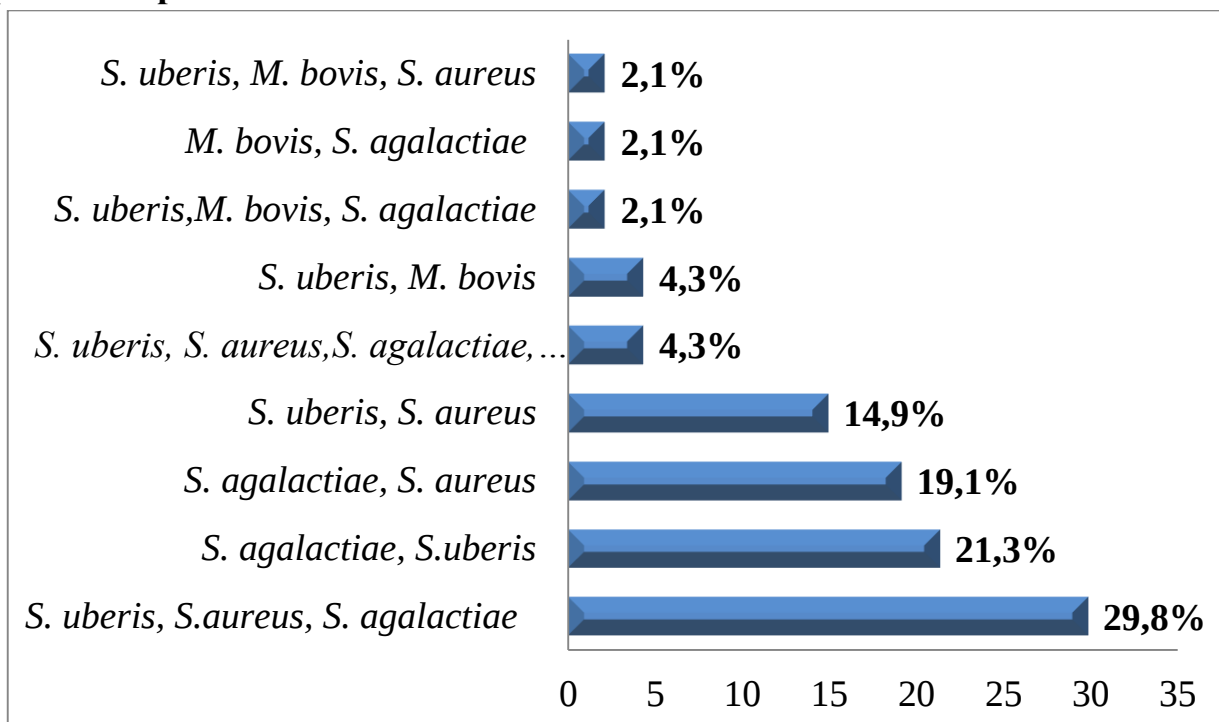


Рис. 3 Асоціації контагіозних збудників маститу, детектованих у разках збірного молока методом ПЛР-РЧ

Асоціації інфекційних агентів *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus agalactiae*; *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus*

agalactiae та *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus* – зустрічались лише по одному разу.

Заріцький Р. В., Жук Ю. В.

За результатами бактеріологічного дослідження 89 зразків збірного молока, позитивними на контагіозні збудники виявлено 62 зразків (70 %) (рис 4).

За період проведення експериментальних досліджень (2020-2023 рр.) було виділено 71 ізолят контагіозних збудників маститу у зразках збірного молока (рис. 5).

Найбільший відсоток контагіозних збудників маститу в зразках збірного молока за результатами бактеріологічного дослідження припадало на *Streptococcus agalactiae* – 55 %, 28 % склали мікроорганізми *Streptococcus uberis*, а 11 % ізолятів – *Staphylococcus aureus*. Бактерій *Streptococcus dysgalactiae* ідентифіковано було лише у 6 % зразків збірного молока.

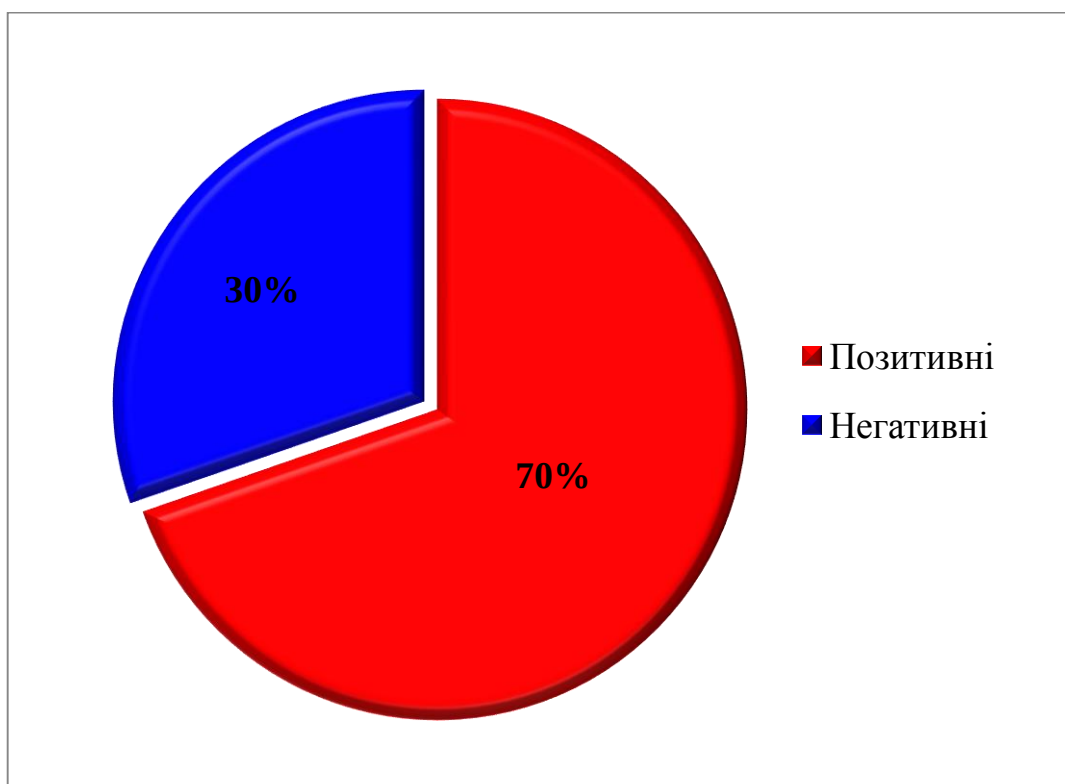


Рис. 4 Дослідження зразків збірного молока на наявність контагіозних збудників маститу бактеріологічним методом

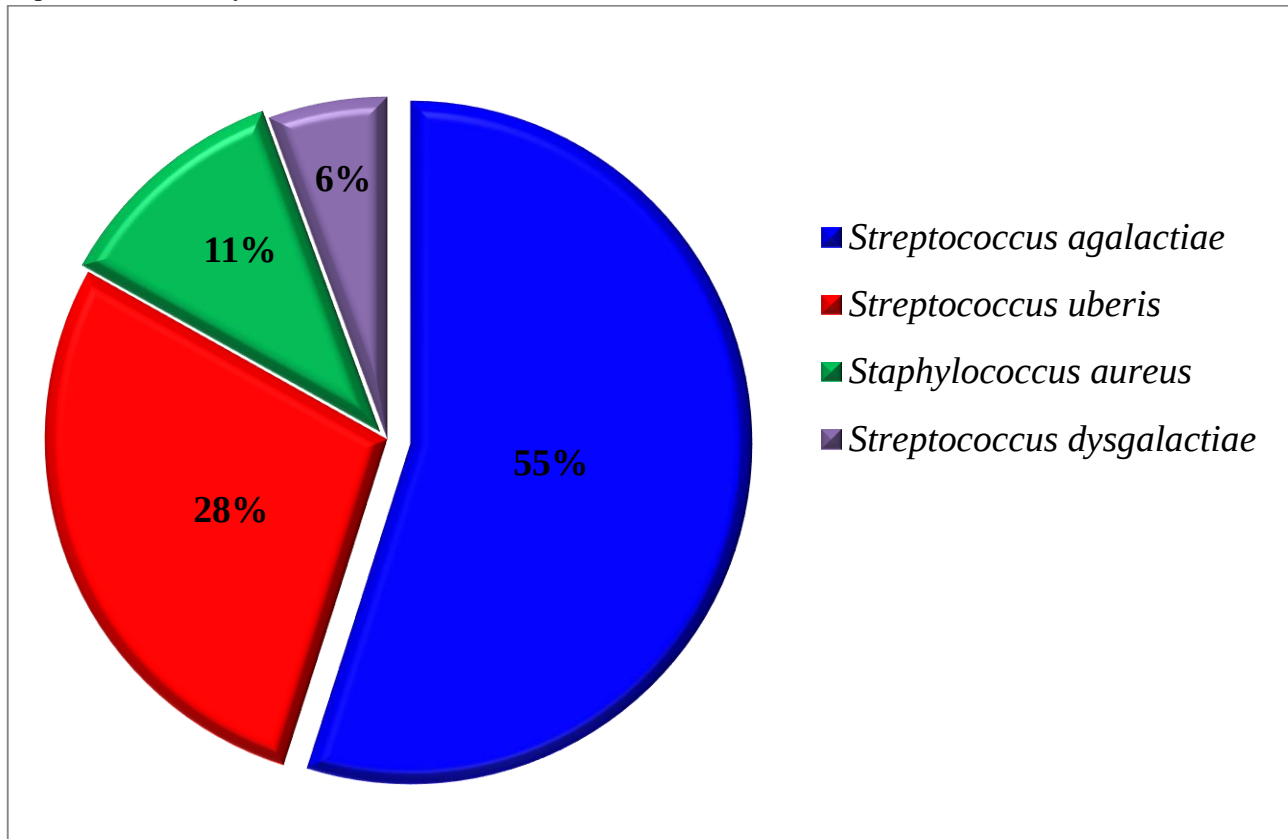


Рис. 5 Контагіозні збудники маститу виділені із зразків збірного молока бактеріологічним методом.

Аналіз частоти виявлення асоціації контагіозних збудників за бактеріологічного дослідження збірного молока (рис. 6) показав, що найчастіше зустрічались асоціації збудників контагіозного маститу: *Streptococcus agalactiae* і *Staphylococcus aureus* – у 5 (35,7 %) зразках, *Streptococcus uberis* і *Staphylococcus aureus* – у 4 (28,6 %), *Streptococcus uberis* і *Streptococcus agalactiae* – 3 (21,4 %) зразках.

Асоціації збудників *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus*

aureus, *Streptococcus agalactiae* та *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* – зустрічались в зразках збірного молока лише по одному разу (7,1 %).

Дослідження контагіозних збудників маститу у зразках збірного молока в Канаді показало, що найчастіше методом ПЛР ідентифіковали збудники *Streptococcus agalactiae* і *Staphylococcus aureus*, а *Mycoplasma bovis* – виділялась з меншою частотою (Francoz, et al., 2012).

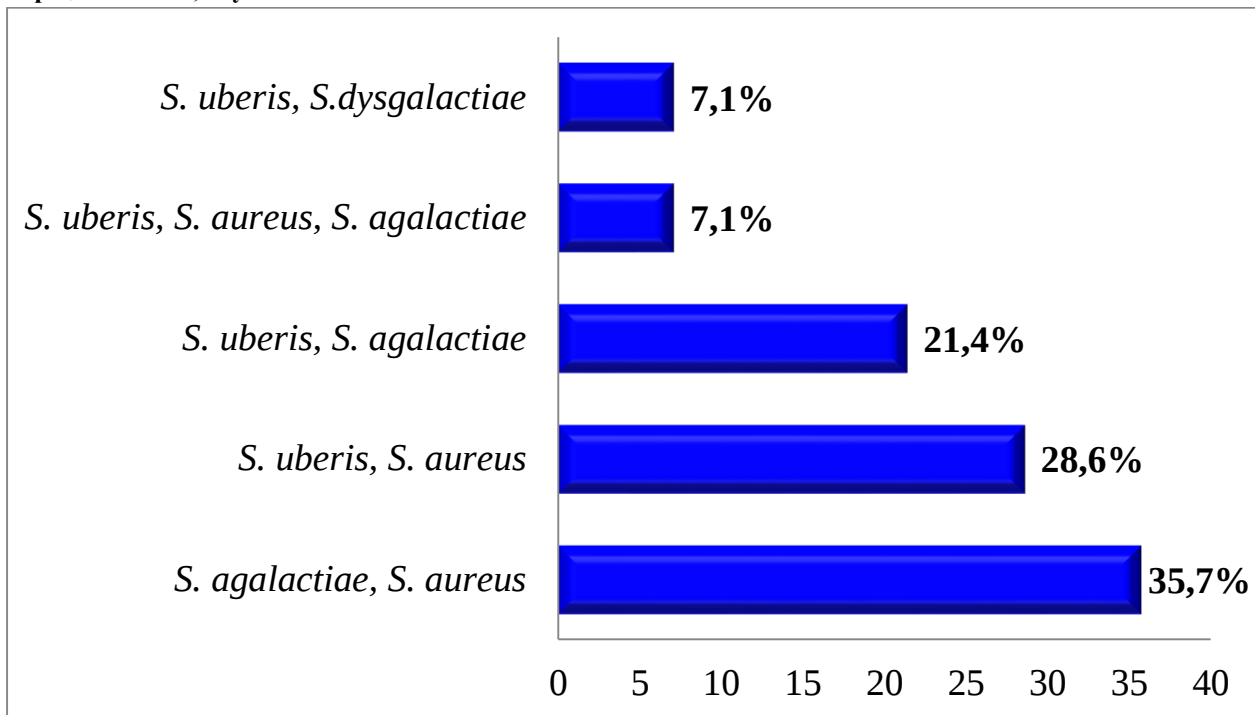


Рис. 6 Асоціації контагіозних збудників маститу виділених із зразків збірного молока за бактеріологічного дослідження

Дослідження 894 танкових зразків молока на контагіозні збудники маститу в Китаї методом ПЛР-РЧ, показали, що *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* та *Streptococcus dysgalactiae* виявляли у 50,1 %, 92,2 і 72,3 %, відповідно (Bi, et al., 2016).

Olde Riekerink, R et al., (2006) зазначають, що дослідження контагіозних збудників у танкових зразках, виявлених бактеріологічним методом, показало поширення *Staphylococcus aureus* (74 %), *Streptococcus agalactiae* (1,6 %) та *Mycoplasma spp.* (*M. bovis* і *M. alkalescens*) (1,9 %) (Olde Riekerink, et al. 2006). У роботі Kampa, J. et al., (2009) зазначено, що з 55 досліджених танкових зразків молока, у 14 виявлено контагіозні збудники маститу, серед яких найпоширенішими були *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* і

Mycoplasma bovis (Kampa, et al., 2009). В Італії дослідження танкових зразків методом ПЛР показали, що найпоширенішими контагіозними збудниками маститу у корів є *Staphylococcus aureus* і *Streptococcus agalactiae* (Zecconi, et al., 2019).

Mycoplasma bovis – є інфекційним збудником великої рогатої худоби, який викликає пневмонію, поліартрит, отит і, рідше, підшкірні абсцеси, аборти та менінгіт. Окрім того, він є найважливішим збудником спалахів мікоплазмозового маститу у молочних корів. Мікоплазми не мають типової клітинної стінки, тому на них не впливають багато комерційно доступних протимікробних препаратів. За останнє десятиліття ізоляти *M. bovis* розвинули набуту резистентність до широкого спектру найбільш використовуваних антибіотиків, таких як макроліди та

Заріцький Р. В., Жук Ю. В.

тетрацикліни. Мастит викликаний *Mycoplasma bovis*, важко піддається лікуванню, навіть якщо антимікробні засоби, які використовуються, демонструють хорошу активність в умовах *in vitro* проти збудника. Невдала терапія, вибракування інфікованих корів і втрата виробництва молока можуть призвести до значних економічних втрат на молочній фермі. Необхідно раннє виявлення корів, які виділяють *M. bovis*, щоб запобігти спалаху маститу (Zecconi, et al., 2019).

Висновки і перспективи.

1. Найпоширенішими збудниками контагіозного маститу у корів виявлених у зразках збірного молока, за допомогою методу ПЛР-РЧ, були *Streptococcus agalactiae* 36 % і *Streptococcus uberis* – 35 %. Найчастіше зустрічаються асоціації контагіозних збудників як *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus*

aureus, *Streptococcus agalactiae* – 29,8 %, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* – 21,3 %, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* – 19,1 %.

2. Дослідження зразків збірного молока з використанням бактеріологічного методом показало, що найпоширенішими детектованими контагіозними збудниками є *Streptococcus agalactiae* – 55 % і *Streptococcus uberis* 28 %. Найчастіше контагіозні збудники зустрічалися в асоціаціях: *Streptococcus agalactiae* і *Staphylococcus aureus* – 35,7%, *Streptococcus uberis* і *Staphylococcus aureus* – 28,6 %.

Перспективою подальших досліджень буде розширення вивчення спектру збудників, що спричиняють мастит, вдосконалення методів їх ідентифікації та дослідження більшої кількості зразків збірного молока.

References

1.Saidi, R., Mimoune, N., Baazizi, R., Benaissa, M., Khelef, D., & Kaidi, R. (2019). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis in Algeria. In Journal of Advanced Veterinary and Animal Research (Vol. 6, Issue 2, p. 231). ScopeMed. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f337>

2. Kaczorek, E., Małaczewska, J., Wójcik, R., Rękawek, W., & Siwicki, A. K. (2017). Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. In Journal of Dairy Science (Vol. 100, Issue 8, pp. 6442–6453). American Dairy Science Association. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12660>

3. Gomes, F., & Henriques, M. (2015). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. In Current Microbiology (Vol. 72, Issue 4, pp. 377–382). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

4. Zhang, D., Zhang, Z., Huang, C., Gao, X., Wang, Z., Liu, Y., Tian, C., Hong, W., Niu, S., & Liu, M. (2018). The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis. In Journal of Dairy Science (Vol. 101, Issue 1, pp. 572–580). American Dairy Science Association. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13159>

5. Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. In Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (Vol. 33, Issue 11, pp. 1699–1713). Asian Australasian Association of Animal Production Societies. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>

6. Chehabi, C. N., Nonnemann, B., Astrup, L. B., Farre, M., & Pedersen, K. (2019). In vitro Antimicrobial Resistance of Causative Agents to Clinical Mastitis in Danish Dairy Cows. In Foodborne Pathogens and Disease (Vol. 16, Issue 8, pp. 562–572). Mary Ann

Заріцький Р. В., Жук Ю. В.

Liebert Inc.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2560>

7. Suleiman, T. S., Karimuribo, E. D., & Mdegela, R. H. (2017). Prevalence of bovine subclinical mastitis and antibiotic susceptibility patterns of major mastitis pathogens isolated in Unguja island of Zanzibar, Tanzania. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 50, Issue 2, pp. 259–266). Springer Science and Business Media LLC.
<https://doi.org/10.1007/s11250-017-1424-3>

8. Chen X-F, Hou X, Xiao M, Zhang L, Cheng J-W, Zhou M-L, Huang J-J, Zhang J-J, Xu Y-C, Hsueh P-R. (2021). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. *Microorganisms*. 9(7):1536.

9. Trevisoli, P. A. (2022). Bovine milk microbiota: molecular characterization and evaluation of mastitis pathogens detection methodologies. Doctoral Thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba. doi:10.11606/T.11.2022.tde-13122022-102859. Retrieved 2023-12-25.

10. Francoz, D., Bergeron, L., Nadeau, M., & Beauchamp, G. (2012). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk

in Québec. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 53(10), 1071–1078.

11. Bi Y, Wang YJ, Qin Y, Guix Vallverdú R, Maldonado García J, Sun W, et al. (2016) Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. *PLoS ONE* 11(5): e0155621.

12. Olde Riekerink, R. G., Barkema, H. W., Veenstra, S., Poole, D. E., Dingwell, R. T., & Keefe, G. P. (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 47(6), 567–572.

13. Kampa, J., Sukolapong, V., Buttasri, A., & Charoenchai, A. (2009). Prevalence of *Mycoplasma bovis* and Other Contagious Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk of Dairy Cattle Herds in Khon Kaen Province, Thailand. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 39(3), 275–280.

14. Zecconi, A., dell'Orco, F., Rizzi, N., Vairani, D., Cipolla, M., Pozzi, P., & Zanini, L. (2019). Cross-sectional study on the prevalence of contagious pathogens in bulk tank milk and their effects on somatic cell counts and milk yield. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 66–74.

PREVALENCE OF CONTAGIOUS BOVINE MASTITIS PATHOGENS IN SAMPLES OF COLLECTED MILK

R. Zaritskyi, Y. Zhuk

Abstract. *Mastitis is one of the most common diseases on dairy farms and causes significant economic losses associated with the cost of treating sick cows, reduced milk yield and quality of dairy products, as well as the risk of premature culling of animals. Mastitis pathogens are divided into two groups, among which the most important are contagious pathogens that are transmitted mainly from one cow to another, especially through milking equipment, which in turn can lead to infection of the entire dairy herd, so establishing the prevalence of contagious mastitis pathogens is quite relevant today. The aim of this study was to identify and establish the prevalence of contagious mastitis pathogens in tank milk samples by bacteriological and molecular genetic (PCR-RT) studies. The results of the study of contagious pathogens of mastitis in tank milk samples by PCR-RT revealed that the most common are *Streptococcus agalactiae* - 36% and *Streptococcus uberis* - 35%. The study of tank milk samples by the bacteriological method showed that the most common detected contagious pathogens are *Streptococcus agalactiae* - 55 % and *Streptococcus uberis* - 28 %.*

Заріцький Р. В., Жук Ю. В.

Keywords: *PCR-RT, bacteriological method, Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis.*