

ТРАДИЦІЙНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОГО МАСТИТУ У ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*М. Л. Радзиховський¹, д-р вет. наук, професор,
О. В. Дишкант¹, канд. вет. наук, доцент,
Л. М. Виговська¹, д-р вет. наук, професор,
О. М. Кулішенко², канд. вет. наук, доцент,
П. О. Давиденко², канд. вет. наук, доцент*

¹Національний університет біоресурсів та природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна
nickvet@ukr.net

²Дніпровський державний аграрно-економічний університет
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49000, Україна

*Інфекційний мастит великої рогатої худоби – найпоширеніше захворювання молочної худоби, яке завдає значних економічних збитків через зниження надоїв і погану якість молока. Етіологічні агенти включають різноманітні грампозитивні та грамнегативні бактерії. У зимовий період або міжсезоння основним фактором виникнення маститів є контамінація молочної залози патогенною мікрофлорою на фоні переохолодження. Інфекційний мастит, як правило, має тривалу субклінічну форму прояву і характеризуються відсутністю клінічних ознак на фоні високого рівня соматичних клітин. Виникненню маститів сприяє розвиток патогенних мікроорганізмів. Завдяки якісному аналізу показників мікрофлори молока встановили основні мікроорганізмами, що викликають інфекційний мастит – це *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. uberis*.*

Під час проведення бактеріологічних досліджень на елективних та диференційно-діагностичних середовищах виділяли чисті культури стафілококів, стрептококів та ентеробактерій. У пробах молока від хворих на субклінічний мастит представників морфологічної групи гриби та мікоплазми не виділено. Встановлено антибіотикочутливість мікрофлори в пробах молока хворих тварин до гентаміцину і амоксициліну та помилково-бактерицидну дію до стрептоміцину, цефазоліну, доксицикліну та тетрацикліну, а також відсутність чутливості до пеніциліну.

Ключові слова: ІНФЕКЦІЙНИЙ МАСТИТ, СУБКЛІНІЧНИЙ МАСТИТ, ПАТОГЕННА МІКРОФЛОРА, СТАФІЛОКОКИ, СТРЕПТОКОКИ, ЕНТЕРОБАКТЕРІЇ, МІКРОСКОПІЯ, АНТИБІОТИКОЧУТЛИВІСТЬ, РЕЗИСТЕНТНІСТЬ.

TRADITIONAL METHODS OF DIAGNOSING INFECTIOUS MASTITIS IN CATTLE

N. Radzikhovskiy¹, O. Dyshkant¹, L. Vygovska¹, O. Kulishenko², P. Davydenko²

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
St. Heroiv Oborony, 15, Kyiv, 03041, Ukraine
nickvet@ukr.net

²Dnipro State Agrarian and Economic University
Serhiya Yefremova street, 25, Dnipro, 49000, Ukraine

Infectious mastitis of cattle is the most common disease of dairy cattle, which causes

significant economic losses due to reduced milk yield and poor milk quality. Etiological agents include a variety of gram-positive and gram-negative bacteria. In the winter or off-season, the main factor in the occurrence of mastitis is the contamination of the mammary gland with pathogenic microflora against the background of hypothermia. Infectious mastitis, as a rule, has a long subclinical form of manifestation and is characterized by the absence of clinical signs against the background of a high level of somatic cells. The occurrence of mastitis is facilitated by the development of pathogenic microorganisms. Due to the qualitative analysis of indicators of milk microflora, the main microorganisms that cause infectious mastitis were identified as *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. uberis*.

During bacteriological studies, pure cultures of staphylococci, streptococci, and enterobacteria were isolated on selective and differential diagnostic media. In milk samples from patients with subclinical mastitis, representatives of the morphological group of fungi and mycoplasma were not isolated. The antibiotic sensitivity of the microflora in the milk samples of sick animals to gentamicin and amoxicillin and the false bactericidal effect to streptomycin, cefazolin, doxycycline and tetracycline, as well as the lack of sensitivity to penicillin, were established.

Keywords: INFECTIOUS MASTITIS, SUBCLINICAL MASTITIS, PATHOGENIC MICROFLORA, STAPHYLOCOCCI, STREPTOCOCCI, ENTEROBACTERIA, MICROSCOPY, ANTIBIOTIC SENSITIVITY, RESISTANCE.

Молочні продукти – це не тільки традиційне джерело білків, жирів, вуглеводів, а й природне джерело важливих функціональних інгредієнтів, таких як Кальцій, рибофлавін (вітамін B2), а також штамів молочнокислих ацидофільних бактерій й біфідобактерій та пептидів, лінолевої кислоти – необхідних для здоров'я людини (Froidmont et al., 2013; Gladukh & Kukhtenko, 2017; Pamela & Ruegg, 2017).

За рівнем забруднення мікроорганізмами молока і молочних продуктів та причин харчових отруєнь, їх відносять до першої категорії ризику, відповідно до переліку продуктів, розробленого ВООЗ (Ismail, 2017; Polova & Almakayeva, 2018; Kukhtenko & Gladukh, 2018).

Молоко, що знаходиться в молочній залозі здорових тварин, у нормі не містить бактерій, найбільшу небезпеку можуть спричинити патогенні та умовно патогенні мікроорганізми. Молоко повністю втрачає свою харчову цінність у результаті значних фізико-хімічних змін, внаслідок розмноження хвороботворних мікробів у хворих тварин. Шляхи потрапляння мікроорганізмів до вимені тварини дуже різноманітні, найбільш суттєвими є недотримання санітарних норм під час отримання молока та захворювання корів на інфекційний мастит (Gladuk & Kukhtenko, 2017; Almakayeva, 2018; Dyshkant et al., 2020).

Захворювання молочної залози та репродуктивних органів є однією з актуальних проблем ветеринарної медицини. У веденні молочного скотарства такі проблеми мають широке поширення й знижують темпи відтворення та продуктивності худоби порід молочного спрямування. У багатьох країнах світу, а також в господарствах України, незалежно від форми власності та напрямків їх діяльності, в тому числі і на фермах з високою технологічною культурою ведення галузі, діагностують хвороби молочної залози (Polova, 2016; Almakayeva, 2017; Jamali et al., 2018).

Захворювання великої рогатої худоби на мастит спричиняє великий економічний збиток, який проявляється у зменшенні молочної продуктивності, показниках санітарної якості молока і відповідно молочних продуктів, передчасного вибраковування корів, порушення репродуктивної функції тварин, витратах на організацію і проведення заходів лікування маститу. Оскільки «маститне молоко» містить патогенні мікроорганізми або їх токсини, воно може бути причиною харчових отруєнь людей. Найчастіше в методиках терапії інфекційного маститу великої рогатої худоби застосовують антибіотики, а їх надмірне та безконтрольне використання стало причиною розвитку резистентності патогенних

мікроорганізмів до протимікробних препаратів, що чинить небезпеку для здоров'я населення України та людства в цілому (Sachuk, 2016; Nazarkina & Polova, 2017; Ismail, 2017).

В усіх країнах світу одним з найважливіших завдань розвитку молочного тваринництва є підвищення продуктивності корів та поліпшення харчових і санітарно-технологічних якостей отриманого молока, причиною погіршення якого є таке поширене захворювання корів, як інфекційний мастит (Polova & Almakayeva 2018; Dyshkant et al., 2020; Katsaraba et al., 2022).

Матеріали і методи. Використовуючи облікові журнали досліджуваного господарства провели статистичний аналіз щодо виявлення маститу у корів за 2022 рік.

Бактеріологічні дослідження проб молока, хворих на мастит корів, та перевірку чутливості мікроорганізмів до антибіотиків проводили на кафедрі епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України.

Перед відбором проб молока дійки протирали 70 % спиртом, а молоко зціджували у стерильні пробірки. Проби транспортували в пластикових боксах з охолоджуючими елементами (за температури 8-10 °С) та досліджували не пізніше, ніж через 4 години з моменту відбору.

Мікрофлору досліджуваних проб молока перевіряли на чутливість до антибіотиків за допомогою диско-дифузійного методу на середовищі Мюллера-Хінтона. Для виявлення чутливості мікроорганізмів використовували такі антибіотики як: стрептоміцин, пеніцилін, тетрациклін, гентаміцин, амоксицилін, цефазолін, доксіцилін.

Наші дослідження включали вивчення: цукролітичних та гемолітичних властивостей, утворення ферментів декарбоксилаз, оксидаз, каталази, плазмокоагулази, перетворення нітратів у нітрити, тощо. Проводили пересіви на елективні середовища, такі як сольовий агар, агар Ендо, кров'яний агар, строкатий ряд Гісса. За допомогою специфічних сироваток проводили підтвердження ідентифікації мікроорганізмів.

Результати й обговорення. Провівши статистичний аналіз щодо виявлення маститу у корів в досліджуваному фермерському господарстві Житомирської області в 2022 році, було встановлено, що найбільший ступінь уражень був саме лактуючих корів в осінньо-зимовий період. Така сезонність була зумовлена зміною умов утримання тварин, оскільки у господарстві протягом 4-х тижнів проводили механічну чистку вигульного майданчику, де постійно утримувалась худоба, а тварин перевели на стійлове утримання в приміщення з цегляною підлогою та постійними протягами.

У корів, хворих на мастит, погіршується також і санітарна якість молока. Так, за субклінічного маститу кількість соматичних клітин становила 1028,4 тис./ см³, за клінічного – 420,2 тис./см³, в той час як у здорових така кількість була в межах 119,3 тис./см³. Також в молоці збільшується кількість бактерій з 120,0 до 3981,2 тис./ см³ відповідно. А кислотність молока за субклінічного маститу корів знижується на 0,7 градусів Тернера (°Т) та за клінічного – на 0,4 °Т, по відношенню до такої як у здорових тварин.

Зниження санітарної якості та погіршення фізичних властивостей молока у корів, що хворіють різними формами маститу призводить до зниження гатунку молока та його подальшого вибраковування.

Для бактеріологічного дослідження проб молока, хворих на мастит корів, та перевірку чутливості мікроорганізмів до антибіотиків, за клінічного перебігу маститу у корів відбирали секрет молочної залози з уражених чвертей вимені, а за субклінічного маститу – проби молока, які реагували на маститні тести.

Для діагностики маститу досліджували молоко на присутність в ньому стафілококів, стрептококів, ентеробактерій та грибів на доступних для нас середовищах. Так, для виділення стафілококів та стрептококів використовували кров'яний агар з додаванням еритроцитів ВРХ. Для виділення ентеробактерій – середовище Endo, для грибів – агар Сабуро, для мікоплазм – поживне середовище МПА з додаванням фізіологічного розчину (1:100).

Під час огляду висіяних проб в чашках Петрі з кров'яним агаром відмічали колонії стафілококів, розмірами 2-3-4 мм з гладенькою матовою поверхнею, білувато-кремового кольору зі слабо вираженою прозорою зоною гемолізу. Після цього виготовляли мікроскопічні препарати та проводили фарбування за Грамом (G^+). Під мікроскопом спостерігали скупчення коків у вигляді виноградного грона та тетракоків і поодиноких клітин. Наступним нашим етапом було протестувати досліджувані колонії мікроорганізмів на каталазну активність, що дозволило диференціювати їх від стрептококів. В краплині свіжоприготовленого 10 % пероксиду водню розтирали мікробний матеріал на предметному скельці, отримали позитивну реакцію у вигляді інтенсивного газоутворення, що свідчило про наявність ферменту каталази у стафілококів.

Чисту культуру стафілококів виділяли на кров'яному агарі з еритроцитами ВРХ, де спостерігали яскраво виражений гемоліз еритроцитів, непрозора зона (Альфа-гемоліз) рис. 6. Золотисті стафілококи гемолізу еритроцитів не викликають. Для диференціації стафілококів визначали їх плазмокоагулюючі властивості (наявність ферменту каталази).

Таку реакцію проводили з цільною плазмою крові кролика. Плазму крові кроля розводили у співвідношенні з фізіологічним розчином 1:5, розлили в пробірки по 0,5 см³. Після цього бактеріологічною петлею внесли до плазми культуру стафілокока. Для контролю одну пробірку не засівали. Пробірки з вмістимим витримували у термостаті за температури 37 °С протягом 3-ох годин. Після закінчення постановки реакції в пробірці з культурою відмічали утворення згустка, який плавав в плазмі, а в контрольній пробірці залишилась рідка суспензія.

Культуру стрептококів також відмічали на кров'яному агарі, які культивувались на середовищі у вигляді штрихів з маленькими непрозорими колоніями та зеленувато-бурою зоною гемолізу. При мікроскопічних дослідженнях в мазках пофарбованих за Грамом (G^+) спостерігали скупчення коротеньких ланцюжків та попарно. Каталазна активність була відсутня (каталазонегативні).

За допомогою середовища Endo виділяли ентеробактерії, а саме *E. coli*, колонії яких на поживному середовищі зафарбовувались в малиново-червоний колір без металевого блиску за рахунок здатності зброджувати лактозу і в процесі збродження виділяти мурашину кислоту, яка дає кольорову реакцію.

Також на середовищі культивували ентеробактерії, які не мають здатності зброджувати лактозу, тому мали білий колір.

Проби молока також висівали на агар Сабуро для дослідження проб на наявність грибів. Чашки Петрі витримували в термостаті при температурі 28 °С протягом 4-ох діб. Результат був негативним (не культивували жодної колонії грибів).

Мікрофлору досліджуваних проб молока перевіряли на чутливість до антибіотиків за допомогою дискодифузійного методу на середовищі Мюллера-Хінтона. Для виявлення чутливості мікроорганізмів використовували такі антибіотики як: стрептоміцин, пеніцилін, тетрациклін, гентаміцин, амоксицилін, цефазолін, доксицилін.

Нормативний облік ДДМ проводили через 16-24 та 36-48 годин. Через 16 годин в чашці Петрі відмічали навколо дисків просочених антибіотиками чисті зони просвітлення, але через 24, 32 та 48 годин в цих зонах вирости колонії, які за морфологічними ознаками належали до основної культури. На нашу думку, це означає, що в популяції є присутні мутантні клітини з дуже повільним ростом на які не діють такі антибіотики як, стрептоміцин, цефазолін, доксицилін та тетрацикліну, якщо вони не знищують такі клітини, а лише уповільнюють їх ріст, тобто мають помилково-позитивну бактерицидну дію. І це свідчить про те, що у цих клітин-мутантів або модифікована клітинна стінка, яка не пропускає антибіотик, або пропускає дуже повільно, або такі клітини мають сповільнений синтез білка (що не блокується).

Отже вищеописані антибіотики не можна використовувати для лікування тварин в досліджуваному господарстві, ймовірно мікроорганізми мають вже резистентність до даних засобів.

При цьому було встановлено, що високу активність відносно мікрофлори, присутньої в пробах молока має гентаміцин, також активним залишається амоксицилін. Такі результати роблять ці антибіотики необхідними при емпіричному лікуванні та для стартової терапії. Також було встановлено відсутність чутливості досліджуваної мікрофлори до пеніциліну.

Наші дослідження включали вивчення якісного аналізу показників мікрофлори молока, а саме: цукролітичних та гемолітичних властивостей, утворення ферментів декарбоксілаз, оксидаз, каталази, плазмокоагулази, перетворення нітратів у нітрити, тощо. Проводили пересіви на елективні середовища, такі як сольовий агар, агар Ендо, кров'яний агар, строкатий ряд Гісса. За допомогою специфічних сироваток проводили підтвердження ідентифікації мікроорганізмів. На основі таких досліджень було диференційовано наступні види мікроорганізмів: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. fecalis*, *E. coli*, *S. uberis*, *Lactobacillus spp.*, *Candida*.

ВИСНОВКИ

1. Підсумовуючи отримані дані встановлено, що найбільший ступінь уражень інфекційним маститом лактуючих корів в осінньо-зимовий період, а у весняний та літній період – зменшення. Субклінічний мастит в зимовий період реєструється частіше, ніж клінічна форма майже в 5,5 разів, а в теплий період року випадки клінічного маститу по відношенню до субклінічного зменшуються. Під час проведення бактеріологічних досліджень на елективних та диференційно-діагностичних середовищах виділяли чисті культури стафілококів, стрептококів та ентеробактерій. В пробах молока від хворих на субклінічний мастит представників морфологічної групи гриби та мікоплазми не виділено.

Встановлено якісний аналіз показників мікрофлори молока де основними мікроорганізмами, що викликають інфекційний мастит є *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. uberis*. Встановлено антибіотикочутливість мікрофлори присутньої в пробах молока хворих тварин до гентаміцину і амоксициліну та помилково-бактерицидну дію до стрептоміцину, цефазоліну, доксицикліну та тетрацикліну, а також відсутність чутливості до пеніциліну.

Перспективи досліджень. Подальші дослідження мають бути спрямовані на вивчення біологічних особливостей мікрофлори молочної залози здорових корів з урахуванням недопущення захворювання лактуючих корів в зимовий період та міжсезоння. Важливим питанням є вивчення та удосконалення лікувально-профілактичних заходів цього захворювання.

References

Almakayeva, L.H. (2017). Pidbir kilkisnoho skladu komponentiv pry rozrobsi veterynarnoho preparatu dlya intratsystemal'noho vvedennya [Selection of the quantitative composition of components in the development of a veterinary drug for intracisternal administration]. Farmatsevychnyy zhurnal. 4 (44), 5–14 [in Ukrainian].

Almakayeva, L. (2018). Study of influence of primary packaging on the stability of the original veterinary preparation. Science Rise: Pharmaceutical Science. 1 (11), 42–47.

Dyshkant, O.V., Kushnir, D.O. & Zakhovayko, V.V. (2020). Stan tvarynnytstva v Ukrayini ta perspektyvy yoho rozvytku [State of livestock breeding in Ukraine and prospects for its development]. Suchasni pidkhody do zabezpechennya zdorov'ya tvaryn ta yakosti kormiv i kharchovykh produktiv: Mater. shosta nauk.-prakt. lyst.-sich. 2019 – 2020. Zhytomyr. 66 – 68 [in Ukrainian].

Froidmont, E., Mayeres, P., Picron, P., Turlot, A., Planchon, V., & Stilmant, D. (2013). Association between age at first calving, year and season of first calving and milk production in Holstein cows. *Animal: an international journal of animal bioscience*. 7(4), 665–672. [Doi.org/10.1017/S1751731112001577](https://doi.org/10.1017/S1751731112001577)

Gladukh, I. & Kukhtenko, H. (2017). Substantiation of the composition of surface – active substances in development of a cream with silver citrate. *Science Rise: Pharmaceutical Science*. 6 (10), 44–51.

Horiuk, Yu.V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Yu.B. & Horiuk V.V. (2018). Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 20 (83), 115–119. [Doi.org/10.15421/nvlvet8322](https://doi.org/10.15421/nvlvet8322)

Ismail, Z.B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary World*. 10 (9), 1057– 1062. [Doi: 10.14202/vetworld.2017.1057-1062](https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1057-1062)

Jamali, H., Barkema, H.W., Jacques, M., Lavallée-Bourget, E.M, Malouin, F., Saini, V., Stryhn, H., & Dufour S. (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J Dairy Sci*. 101 (6), 4729-4746. [Doi: 10.3168/jds.2017-13730](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13730).

Katsaraba, O.A., Sachuk, R.M., Gutyj, B.V., Velesyk, T.A., Radzykhovskiy, M.L., Sharandak, P.V., & Pepko, V.O. (2022). Pharmacological studies of the veterinary medicinal product “Dibutalastin Ointment”. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2022. 5 (2). 76–83. [Doi: 10.32718/ujvas5-2.07](https://doi.org/10.32718/ujvas5-2.07)

Kukhtenko, H.P., & Gladukh, Ie.V. (2018). The substantiation of the technology for preparing the cream with silver citrate. *Social pharmacy in health care*. 1 (4), 12–20.

Nazarkina, V.M., & Polova, Zh.M. (2017). Analysis of modern approaches to formation of cost price for veterinary preparations. *News of Pharmacy*. 3 (91), 39–44.

Pamela, L. & Ruegg, A. (2017). 100–Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*. 100, 10381–10397. [Doi: 10.3168/jds.2017-13023](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023)

Polova, ZH.M. (2016). Doslidzhennya antymikrobnoyi aktyvnosti tsytrativ sribla ta midi z metoyu rozrobky farmatsevychnykh preparativ [Research of antimicrobial activity of silver and copper citrates for the purpose of developing pharmaceutical preparations]. *Aktual'ni problemy farmatsevychnoyi ta medychnoyi nauky i praktyky*. 1(20), 71–74. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Znpsnmapo_2016_25_90 [in Ukrainian].

Polova, Z., & Almakayeva, L. (2018). Substantiation of the film-forming agent selection in the composition of spray with copper and silver citrate. *Ukrainian biopharmaceutical journal*. 1 (54), 4–8. [Doi.org/10.24959/ubphj.18.156](https://doi.org/10.24959/ubphj.18.156)

Polova, Z., & Almakayeva, L. (2018). Study of influence of primary packaging on the stability of the original veterinary preparation. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 1 (11), 42–47. [Doi.org/10.15587/2519-4852.2018.124449](https://doi.org/10.15587/2519-4852.2018.124449)

Sachuk, R.M. (2016). Efektyvnist' «Fitospreyu» pry likuvanni ta profilaktytsi dermatyviv diyok vimeni ta mastytu u koriv [The effectiveness of "Fitospray" in the treatment and prevention of udder dermatitis and mastitis in cows]. *Veterynarna biotekhnolohiya*. 28, 247–254. [Doi:10.15421/nvlvet7121](https://doi.org/10.15421/nvlvet7121) [in Ukrainian].