

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРОФЛОРИ ІЗОЛЬОВАНОЇ З СЕКРЕТУ ВИМЕНІ КОРІВ ЗА МАСТИТУ ДО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ СЕРІЙ ПРОТИМАСТИТНИХ ПРЕПАРАТІВ

Є. С. Улько, аспірант*

Сумський національний аграрний університет

*Науковий керівник – д.вет.н., професор Фотіна Т. І.

В статті наведені результати дослідження секрету вимені корів, хворих на мастит. Із секрету вимені від корів хворих на мастит було виділено культури *E. coli* – 12,69 % випадків, *S. epidermidis* – 11,94 %, *S. dysgalactiae* – 9,33 %, *E. fecalis* – 4,85 %, *S. uberis* – 4,11 %, *P. vulgaris* – 4,48 %, *S. pyogenes* – 2,24 %, *P. aeruginosa* в 3,36 % випадків відповідно. Встановлено, що усі ізовані культури мікроорганізмів чутливі до експериментальних серій протимаститного препарату. Більшість ізованих культур були помірно резистентними та резистентними до пеніциліну, стрептоміцину та тетрацикліну. Культури *S. aureus* були помірно резистентними до амоксициліну, ампіциліну, гентаміцину, оксациліну, канаміцину, лінкоміцину та резистентними до пеніциліну, стрептоміцину, тетрацикліну, енрофлоксацину та поліміксину.

Ключові слова: мастит, секрет вимені, мікрофлора, антибіотики, чутливість, протимаститний препарат.

Постановка проблеми у загальному вигляді.

Безпека продовольчої сировини і продуктів харчування є одним з основних факторів, що визначають здоров'я людини. Харчові токсикоінфекції в даний час представляють собою значиму проблему, причому джерелом хвороби можуть служити як сировина, так і готова продукція. Літературні дані останніх років підтверджують той факт, що мастити займають одне з провідних місць в патології великої рогатої худоби [1-4].

Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. Мастити наносять значні економічні збитки молочному скотарству, які складаються зі зниження продуктивності корів, погіршення якості молока, вимушеної вибірки тварин по причині гіпоталактії, а також захворюваності телят внаслідок вживання молока, що містить умовно-патогенну мікрофлору, витрати на ветеринарні заходи [5-10]. Багаточисельні дослідження по вивченню етіології маститів у корів підтверджують велику роль умовно-патогенної мікрофлори, яка істотно ускладнює перебіг хвороби. Так, неодноразово було встановлено, що в етіології маститу корів певну роль відіграють грам позитивні та грам негативні мікроорганізми родів *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp., коагулазонегативні стафілококи (КНС). Зокрема, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* та інша мікрофлора, яка формує мікробні асоціації в природі і організмі тварин, підсилюючи своїми ферментативними системами дію основних збудників і тим самим збільшуючи вірулентність останніх в десятки разів. Із секрету вимені хворих тварин ряд дослідників виділяли також *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* та інші збудники, на які не впливають антибіотики *Trueperella pyogenes*, *Mycoplasma* spp., *Prototheca zopfii*, *Candida* spp. [11-27].

Виникнення і розповсюдження резистентних форм мікроорганізмів – збудників маститів значно ускладнює лікування хворих тварин. В зв'язку з цим, на сьогодні важлива роль відводиться фармакотерапевтичним засобам [28-30].

Метою роботи було визначення чутливості мікрофлори ізованої із секрету вимені хворих на мастит

корів до антибіотиків та експериментальних серій нового протимаститного препарату.

Матеріали і методи досліджень. У роботі використано культури мікроорганізмів ізовані з секрету вимені корів за маститу із господарств Сумської, Чернігівської та Полтавської областей. Виділення чистих культур із патологічного матеріалу за загальноприйнятою схемою. Видову приналежність бактерій встановлювали, керуючись «Визначником бактерій» Бергі. Культури зберігали в пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром в холодильнику за температури 4°C, субкультивуючи щоденно. Визначення чутливості проводили диско-дифузійним методом з наступним набором дисків: амоксицилін (АМО), ампіцилін (АМП), гентаміцин (ГЕН), доксициклін (ДОК), енрофлоксацин (ЕНР), канаміцин (КАН), лінкоміцин (ЛІН), норфлоксацин (НОР), пеніцилін (ПЕН), рифампіцин (РИФ), стрептоміцин (СТР), тетрациклін (ТЕТ), поліміксин (ПОЛ), еритроміцин (ЕРІ) (виробник ООО «Аспект»™). Для приготування інкуляту використовували добову культуру, з якої готували суспензію, що відповідала 0,5 стандарту мутності McFarland. Для перевірки якості дисків, поживного середовища та правильності методики постановки тесту використовували еталонні штами *E. coli*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*.

Чутливість мікроорганізмів до нового протимаститного препарату визначали методом дифузії в агар.

Ступінь резистентності ізованих мікроорганізмів встановлювали за діаметром зон затримки їх росту навколо дисків після інкубації при температурі 35°C протягом 18-24 годин. Діаметр зони затримки росту вимірювали лінійкою з точністю до 1 мм, включаючи діаметр самого диску. За діаметром зон інгібіції мікроорганізми поділяли на чутливі (+++), помірно резистентні (++) та резистентні (+). Культури мікроорганізмів вирощували на відповідних поживних середовищах.

Результати власних досліджень. За дослідження секрету вимені від корів хворих на мастит було виділено культури *E. coli* – 12,69 % випадків, *S. epidermidis* – 11,94 %, *S. dysgalactiae* – 9,33 %, *E. fecalis* – 4,85 %, *S. uberis* – 4,11 %, *P. vulgaris* – 4,48 %, *S. pyogenes* – 2,24 %, *P. aeruginosa* в 3,36 % випадків відповідно (рис. 1).

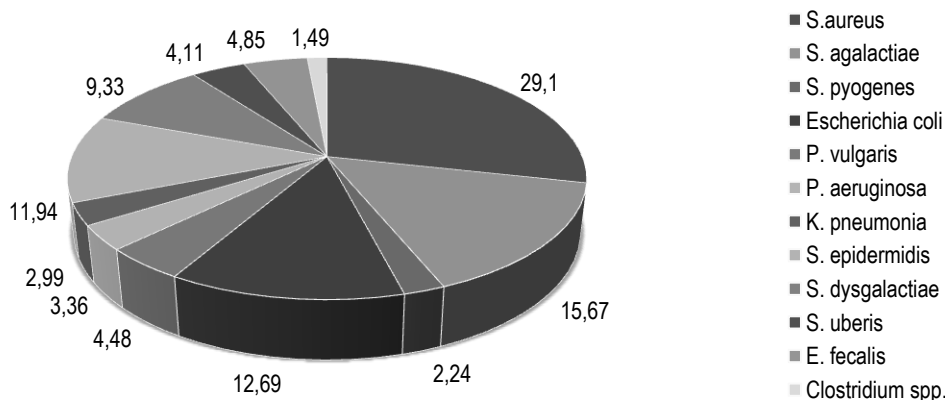


Рис. 1. Видовий спектр мікроорганізмів виділених із секрету вимені корів за маститу.

Серед виділених культур вагоме місце займали культури *S. aureus* – 29,10 % та *S. agalactiae* – 15,67 % від загальної кількості ізолюваних зразків. У більшості

випадків культури *S. aureus* виділяли в асоціації з *S. agalactiae*. Рідше зустрічалися асоціації *E. coli*, *P. vulgaris* та *S. pyogenes*.

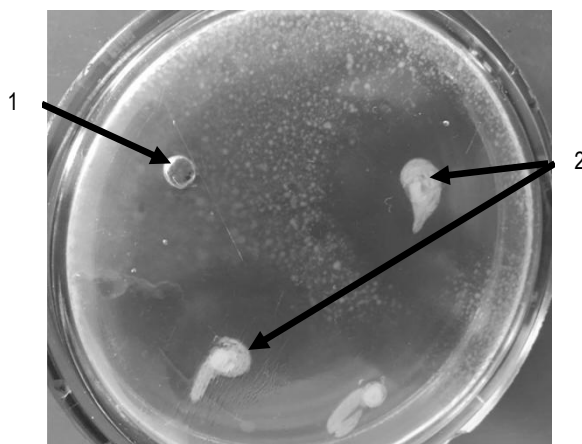


Рис. 2. Зони затримки росту культури з секрету вимені молока корови за маститу навколо лунки з протимаститним препаратом (1 – лунка без препарату, 2 – лунка з препаратом).

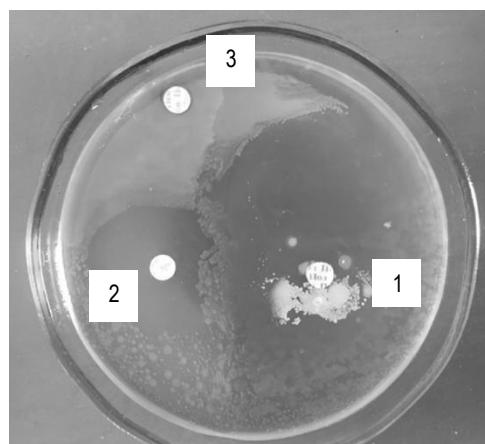


Рис. 3. Зони затримки росту культури з секрету вимені молока корови за маститу навколо дисків (1 - поліміксин, 2 - еритроміцин, 3 - пеніцилін).

З результатів наведених в таблиці 1 видно, що усі культури мікроорганізмів, ізолювані з секрету вимені корів

за маститу чутливі до експериментальних серій протимаститного препарату.

Таблиця 1

Результати визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків диско-дифузійним методом

Антибіотик/препарат	Культури ізолюваних мікроорганізмів										
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumonia</i>
АМО	16 (++)	16 (++)	20 (++)	32 (+++)	22 (++)	19 (++)	26 (+++)	19 (++)	16 (++)	15 (++)	16 (++)
АМП	18 (++)	12 (+)	20 (++)	15 (++)	16 (++)	20 (++)	16 (++)	22 (++)	19 (++)	16 (++)	19 (++)
ГЕН	12 (+)	12 (+)	18 (++)	18 (++)	-	8 (+)	8 (+)	-	-	18 (++)	21 (++)
ДОК	24 (++)	16 (++)	20 (++)	28 (+++)	32 (+++)	22 (++)	12 (+)	12 (+)	20 (++)	15 (++)	16 (++)
ЕНР	-	12 (+)	18 (++)	18 (++)	12 (+)	18 (++)	18 (++)	19 (++)	19 (++)	35 (+++)	27 (+++)
КАН	23 (++)	19 (++)	26 (+++)	19 (++)	26 (+++)	19 (++)	20 (++)	22 (++)	26 (+++)	26 (+++)	22 (++)
ЛІН	24 (++)	28 (+++)	32 (+++)	22 (++)	28 (+++)	32 (+++)	22 (++)	24 (++)	26 (+++)	30 (+++)	24 (++)
НОР	18 (++)	16 (++)	20 (++)	19 (++)	16 (++)	19 (++)	26 (+++)	19 (++)	26 (+++)	18 (++)	19 (++)
ПЕН	12 (+)	14 (+)	-	12 (+)	20 (++)	15 (++)	16 (++)	20 (++)	10 (+)	15 (++)	16 (++)
РИФ	26 (+++)	28 (+++)	22 (++)	22 (++)	26 (+++)	30 (+++)	19 (++)	26 (+++)	30 (+++)	24 (++)	22 (++)
СТР	-	-	-	-	-	-	-	16 (++)	-	8 (+)	8 (+)
ТЕТ	-	-	-	-	-	-	-	10 (+)	-	-	-
ЕРИ	18 (++)	34 (+++)	34 (+++)	28 (+++)	31 (+++)	32 (+++)	34 (+++)	34 (+++)	22 (++)	22 (++)	29 (+++)
ПОЛ	8 (+)	8 (+)	-	-	-	-	-	16 (++)	-	8 (+)	8 (+)
Протимаститний	29 (+++)	35 (+++)	31 (+++)	31 (+++)	34 (+++)	34 (+++)	29 (+++)	35 (+++)	34 (+++)	29 (+++)	35 (+++)

Примітка: «+++» — чутливі, «++» — помірно резистентні, «+» — резистентні.

Встановлено, що більшість ізолюваних культур були помірно резистентними та резистентними до пеніциліну, стрептоміцину та тетрацикліну. Культури *S. aureus* були помірно резистентними до амоксициліну, ампіциліну, гентаміцину, оксациліну, канаміцину, лінкомицину та резистентними до пеніциліну, стрептоміцину, тетрацикліну, енрофлосацину та поліміксину.

Усі ізолювані із секрету вимені корів, хворих на мастит, культури були помірно резистентні та чутливі до амоксициліну, канаміцину, лінкомицину, норфлосацину та еритроміцину.

Культури *Streptococcus pyogenes* виявилися чутливими до лінкомицину, рифампіцину, еритроміцину, канаміцину та доксицикліну, *Proteus vulgaris* — до рифампіцину, канаміцину, лінкомицину та норфлосацину, *Pseudomonas aeruginosa* — до канаміцину, лінкомицину та енрофлосацину, *Klebsiella pneumoniae* — до енроксилу та еритроміцину. Культури *E. coli* та *E. faecalis* були резистентні до доксицикліну та гентаміцину.

Висновок. Таким чином, виявлено високий відсоток стійкості мікрофлори ізолюваної із секрету вимені корів до пеніциліну, стрептоміцину, гентаміцину, тетрацикліну та поліміксину. Це робить нераціональним застосування даних антибіотиків для лікування корів, хворих на мастит. Експериментальні зразки нового протимаститного препарату показали високий рівень інгібування росту мікрофлори, що дозволяє зробити висновок про доцільності використання даного засобу для лікування тварин хворих на мастит.

Перспективи подальших розвідок у даному напрямку. Полягають у вивченні бактеріальних асоціацій, які беруть участь у виникненні та розвитку маститу та розробці ефективних схем лікування корів за маститу з використанням нового протимаститного препарату.

References:

1. Narender Kumar, A. Manimaran, A. Kumaresan, L. Sreela, Tapas Kumar Patbandha, Shiwani Tiwari, and Subhash Chandra (2016), "Episodes of clinical mastitis and its relationship with duration of treatment and seasonality in crossbred cows maintained in organized dairy farm", *Vet. World*, Vol. 9 (1), pp.75–79.
2. Sharma N., Srivastava A. K., Bacic G., Jeong D. K. and Sharma R. K. (2012), *Epidemiology*, 1st ed. Bovine Mastitis., editor. New Delhi, India. Satish Serial Publishing Hous, pp.231–312.
3. Oliveira L., Hulland C. and Ruegg P.L. (2013), "Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin", *J. Dairy Sci.*, Vol. 96 (12), pp.7538–7549.
4. Hertl J.A., Schukken Y.H., Welcome F.L., Tauer L.W. and Grohn Y. T. (2014), "Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows", *J. Dairy Sci.*, Vol. 97(3), pp.1465–1480.
5. Lukas J.M., Reneau J.K., Wallace R., Hawkins D. and Munoz-Zanzi C. (2009), "A novel method of analyzing daily milk production and electrical conductivity to predict disease onset", *J. Dairy Sci.*, Vol. 92, pp.5964–5976.
6. Wenz J.R. (2004), "Practical Monitoring of Clinical Mastitis Treatment Programs", Proceeding 43rd Annual National Mastitis Council Meeting Charlotte (NC). Verona (WI) National Mastitis Council, pp.41–46.
7. Pinzon-Sanchez C and Ruegg P.L. (2011), "Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis", *J. Dairy. Sci.*, Vol. 94, pp.3397–3410.
8. Lago A., Godden S.M., Bey R., Ruegg P.L. and Leslie K. (2011), "The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results I: Effects on antibiotic use, milk withholding time and short-term clinical and bacteriological outcomes", *J. Dairy Sci.*, Vol. 94, pp.4441–4456.
9. Lago A., Godden S.M., Bey R., Ruegg P.L. and Leslie K. (2011), "The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results II: Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival", *J. Dairy Sci.*, Vol. 94, pp. 4457–4467.
10. Bar D., Grohn Y.T., Bennett G., Gonzalez R.N., Hertl J.A., Schulte H.F., Tauer L.W., Welcome F.L. and Schukken Y.H. (2007), "Effect of repeated episodes of generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows", *J. Dairy Sci.*, Vol. 90, pp.4643–4653.
11. Kurtjak B.M., Sobko Gh.V. and Bojko O.P. (2015), "Bacteriological monitoring of hidden forms of mastitis - an important component of the prevention program of mastitis" [Bakteriologichnyy monitoryng prykhovalnykh form mastytiv – vazhlyva skladova prohramy profilaktyky mastytiv], *Scientific Bulletin of LNUVMBT named S.Z. Gzhytsky*, vol. 17, no. 2 (62), pp. 281–287. (inUkrainian)
12. Schukken Y.H., Hertl J., Bar D., Bennett G.J., Gonzalez R.N., Rauch B.J., Santisteban C, Schulte H.F., Tauer L., Welcome F.L. and Grohn Y.T. (2009), "Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows", *J. Dairy Sci.*, Vol. 92, pp.3091–3105.
13. Hertl J. A., Grohn Y. T., Leach J.D.G., Bar D., Bennett G.J., Gonzalez R.N., Rauch B.J., Welcome F.L., Tauer L.W. and Schukken Y.H. (2010), "Effects of clinical mastitis caused by gram positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows", *J. Dairy Sci.*, Vol. 93, pp.1551–1560.
14. Hertl J.A., Schukken Y.H., Bar D., Bennett G.J., Gonzalez R.N., Rauch B.J., Welcome F.L., Tauer L.W. and Grohn Y.T. (2011), "The effect of recurrent episodes of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on mortality and culling in Holstein dairy cows", *J. Dairy Sci.*, Vol. 94, pp.4863–4877.
15. Apparaio M.D., Ruegg P.L., Lago A., Godden S., Bey R. and Leslie K. (2009), "Relationship between in vitro susceptibility test results and treatment outcomes for gram-positive mastitis pathogens following treatment with cephapirin sodium", *J. Dairy Sci.*, Vol. 92, pp.2589–2597.
16. Bradley A.J. and Green M.J. (2001), "Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland", *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 39(5), pp.1845–1849.
17. Contreras G.A. and Rodriguez J.M. (2011), "Mastitis: Comparative etiology and epidemiology", *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.*, Vol. 16(4), pp.339–356.
18. Oliver S.P., Almeida R.A., Gillespie B.E., Headrick S.J., Dowlen H.H. and Johnson D.L. (2004), "Extended ceftiofur therapy for treatment of experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis in lactating dairy cattle", *J. Dairy Sci.*, Vol. 87, pp.3322–3329.
19. Hertl J.A., Schukken Y.H., Welcome F.L., Tauer L.W. and Grohn Y.T. (2014), "Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows", *J Dairy Sci.*, Vol. 97(3), pp. 1465–1480.
20. Hertl J. A., Schukken Y. H., Welcome F. L., Tauer L. W. and Grohn Y. T. (2014), "Effects of pathogen-specific clinical mastitis on probability of conception in Holstein dairy cows", *J Dairy Sci.*, Vol. 97(11), pp. 6942–6954.
21. Unno H., Inada M., Nakamura A., Hashimoto M., Ito K., Hashimoto K., Nikaido M., Hayashi T., Hata E., Katsuda K., Kiku Y., Tagawa Y. and Kawai K. (2015), "Improved rapid and efficient method for *Staphylococcus aureus* DNA extraction from milk for identification of mastitis pathogens", *J. Vet. Med. Sci.*, Vol. 77, pp. 1007–1009.
22. Fox L. K. (2012), "Mycoplasma mastitis: causes, transmission, and control", *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, Vol. 28, pp. 225–237.
23. Hayashi T., Sugita T., Hata E., Katsuda K., Zhang E., Kiku Y., Sugawara K., Ozawa T., Matsubara T., Ando T., Obayashi T., Ito T., Yabusaki T., Kudo K., Yamamoto H., Koiwa M., Oshida T., Tagawa Y. and Kawai K. (2013), "Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan", *J. Vet. Med. Sci.*, Vol. 75, pp. 387–390.
24. Hogan J. and Larry Smith K. (2003), "Coliform mastitis", *Vet. Res.*, Vol. 34, pp. 507–519.
25. Watts J. L., Lowery D. E., Teel J. F. and Rossbach S. (2000), "Identification of corynebacterium bovis and other coryneforms isolated from bovine mammary glands", *J. Dairy Sci.*, Vol. 83, pp. 2373–2379.
26. Zaini F., Kanani A., Falahati M., Fateh R., Salimi-Asl M., Saemi N., Farahyar S., Kheirabad A. K. and Nazeri M. (2012), "Identification of *Prototheca zopfii* from Bovine Mastitis. Iran", *J. Public Health.*, Vol. 41, pp. 84–88.
27. Kazuhiro Kawai, Mika Inada, Keiko Ito, Koji Hashimoto, Masaru Nikaido, Eiji Hata, Ken Katsuda, Yoshio Kiku, Yuichi Tagawa and Tomohito Hayashi (2017), "Detection of bovine mastitis pathogens by loop-mediated isothermal amplification and an electrochemical DNA chip", *J. Vet. Med. Sci.*, Vol. 79(12), pp. 1973–1977.
28. Blowey R. and Edmondson P. (2010), "The Mastitis Organisms", *Mastitis control in dairy herds*, 2nd ed., CAB International, Oxfordshire, U.K.P., pp. 33–59.
29. Hisaeda K., Koshiishi T., Watanabe M., Miyake H., Yoshimura Y. and Isobe N. (2016), "Change in viable bacterial count during

preservation of milk derived from dairy cows with subclinical mastitis and its relationship with antimicrobial components in milk", *J. Vet. Med. Sci.*, Vol. 78, pp. 1245–1250.

30. Van Eenennaam A.L., Gardner I.A., Holmes J., Perani L., Anderson R.J., Cullor J.S. and Guterbock W.M. (1995), "Financial analysis of alternative treatments for clinical mastitis associated with environmental pathogens", *J. Dairy Sci.*, Vol. 78, pp. 2086–2095.

Улько Е. С. Определение чувствительности микрофлоры изолированной с секретом вымени коров при маститах к экспериментальным сериям противомаститных препаратов.

В статье приведены результаты исследования секрета вымени коров, больных маститом. Из секрета вымени от больных маститом коров были изолированы культуры *E. Coli* в 12,69% случаев, *S. epidermidis* – 11,94 %, *S. dysgalactiae* – 9,33 %, *E. faecalis* – 4,85 %, *S. uberis* – 4,11 %, *P. vulgaris* – 4,48 %, *S. pyogenes* – 2,24%, *P. aeruginosa* в 3,36 % случаев. Установлено, что все изолированные культуры микроорганизмов чувствительны к экспериментальным сериям противомаститного препарата. Большинство изолированных культур были умеренно резистентными и резистентными к пенициллину, стрептомицину и тетрациклину. Культуры *S. aureus* были умеренно резистентными к амоксициллину, ампициллину, гентамицину, канамицину, линкомицину резистентными к пенициллину, стрептомицину, тетрациклину, энрофлоксацину и полимиксину.

Ключевые слова: мастит, секрет вымени, микрофлора, антибиотики, чувствительность, противомаститных препарат.

Ulko E. S. Determination of sensitivity of microflora was isolated from the udder of cows with mastitis to experimental series of antimastitic drugs.

The article presents the results of the research of milk from cows on mastitis. *E. coli* cultures were isolated from the secretion of mummies from cows with mastitis – 12,69%, *S. epidermidis* – 11.94 %, *S. dysgalactiae* – 9.33 %, *E. faecalis* – 4.85 %, *S. uber* – 4.11 %, *P. vulgaris* – 4.48 %, *S. pyogenes* – 2.24 %, *P. aeruginosa* in 3.36 % of cases, respectively. It has been established that all isolated microorganism cultures are sensitive to experimental series of anti-mastitis drug. Most isolated cultures were moderately resistant and resistant to penicillin, streptomycin and tetracycline. The cultures of *S. aureus* were moderately resistant to amoxicillin, ampicillin, gentamicin, kanamycin, lincomycin and resistant to penicillin, streptomycin, tetracycline, enrofloxacin, and polymyxin.

Keywords: mastitis, secret of udder, microflora, antibiotics, sensitivity, anti-mastitic preparation.

Дата надходження до редакції: 11.03.2018 р.

Рецензент: к.вет.н., професор Зон Г. А.

