

перспективы развития: тезисы докладов IV Международной научной конференции (Брест, 10-12 сентября, 2008 г.). – Брест: Альтернатива, 2008. – С. 171. 4. Ятусевич, А.И. К проблеме мониезоза крупного и мелкого рогатого скота в Республике Беларусь / А.И. Ятусевич, В.М. Мироненко, В.Г. Кирищенко // Экология и инновации: материалы VII Международной научно-практической конференции, г. Витебск, 22-23 мая 2008 года. – Витебск: УО ВГАВМ, 2008. – С. 178 – 179. 5. Мироненко, В.М. Формирование паразитоценозов пищеварительной системы крупного рогатого скота/ В.М. Мироненко, В.Г. Кирищенко // Ученые записки УО ВГАВМ: научно-практический журнал. Том 46, выпуск 1, часть 1. – Витебск, 2010. – С.127-129.

УДК 619:616.19-002:636.2

ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ STAPH. AUREUS И STREP. AGALACTIAE В МОЛОКЕ КОРОВ БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ

Яцына О.А., Яцына В.В., Ю.А. Рыбаков, В.В. Пилейко,
УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

При выполнении исследований найдена причина возникновения мастита. Разработана специфическая реакция для двух основных видов микроорганизмов, которые вызывают воспаление в вымени. Доказана большая эффективность реакции при сравнении с бактериологическим исследованием.

Summary. At performance of researches the reason of occurrence of a mastitis is found. Specific (Polymerase chain reaction, PCR) for two basic kinds of microorganisms which cause an inflammation in a udder is developed. The big efficiency of reaction is proved at comparison with bacteriological research.

Введение. В последние годы в Республике Беларусь отмечается проблема высокой заболеваемости коров маститом. Ветеринарная статистика указывает, что заболеваемость маститами колеблется от 26,8% (молочные комплексы) до 21,3% (молочные фермы). Также установлено, что клиническими формами мастита переболевают 11,3%, субклиническими – 71,7% лактирующих коров. За период болезни и после выздоровления молочная продуктивность коров снижается при субклиническом мастите на 10-15%, а при клиническом – до 35% за лактацию. Из-за необратимых изменений в вымени даже при успешном лечении коров прежние удои не восстанавливаются. В среднем 10-15% переболевших клиническим маститом коров выбраковывается из-за атрофии долей вымени, а среди высокопродуктивных коров эта цифра иногда достигает 30% [1,2].

Большие убытки несут молокоперерабатывающие предприятия, так как примесь более 5% молока от больных скрытым маститом коров дает сырье непригодное для переработки в кисломолочные продукты и сыры. Молоко от больных маститами коров, содержащее патогенную микрофлору, вызывает желудочно-кишечные расстройства и не редко гибель новорожденных телят.

В основе предупреждения болезни лежит знание ее причин. Знание причин необходимо не только для профилактики, но и для успешной диагностики и выбора эффективного лечения заболевания. Учитывая то, что маститы наносят огромный экономический ущерб отрасли молочного скотоводства, во всех странах принимаются и действуют специальные программы по профилактике и борьбе с этим заболеванием.

Одним из основных вопросов в системе борьбы с маститом является ранняя его диагностика. От своевременного и правильно поставленного диагноза зависит эффективность проводимых мероприятий. В задачу диагностики входит не только обнаружение каких-либо нарушений в молочной железе, но и определение их сущности. Поэтому необходимо выявить не только явно больных животных, но и коров с нарушением секреции молока или раздражением вымени, а также животных – носителей патогенных микроорганизмов [1, 2].

Причинами воспаления вымени могут быть биологические (микроорганизмы), механические, термические и химические факторы. Однако многочисленные научные исследования указывали, что у 80 % заболевших животных мастит имел микробную этиологию. Наиболее частой причиной возникновения мастита у коров являлись стафилококки и стрептококки (90% случаев). Маститы, вызываемые стрептококками и стафилококками, протекали в основном хронически, редко остро, секрет пораженных четвертой молочноводянистый, хлопьевидный, заболевание часто заканчивалось индурацией вымени [1, 2].

Стрептококки различных серологических групп способны вызвать мастит у крупного рогатого скота, но основным возбудителем мастита является *Str. agalactiae*, который обладает типичными свойствами облигатного паразитического организма (не размножается в окружающей среде и сохраняется в ней незначительное количество времени, обладает ярко выраженной адгезией на эпителии молочных ходов, способен продуцировать гемолитический и некротический токсин, лейкоцидин, фибринолизин и гиалуронидазу). Агалактичный стрептококк, попадая на эпителий молочных ходов, вызывает их воспаление и закупорку, ведя к уменьшению производства молока, увеличению количества соматических клеток и, в конечном счете, к прекращению выделения молока. Другие мастит-ассоциированные стрептококки (*Str. pyogenes*, *Str. dysagalactiae*, *Str. uberis*, *Str. fecalis* и др.) по данным ряда авторов являются скорее необлигатными паразитами так как способны размножаться в окружающей среде и на коже вымени здоровых животных [2].

Мастит вызываемый *Staph. Aureus*, до сих пор является одной из наиболее серьезных проблем молочных коров во всем мире. Наиболее патогенным из стафилококков признан коагулазоположительный *St. Aureus*, на его долю приходится от 9,6 до 89% случаев, причем мастит, вызываемый золотистым стафилококком наиболее опасен, поскольку его трудно ликвидировать из-за устойчивости к действию антибиотиков, к тому же он способен паразитировать внутри клеток слизистой оболочки вымяни.

St. aureus способен синтезировать ряд ферментов (каталаза, плазмокоагулаза) которые усиливают его патогенность, гиалуронидазу, усиливающую его инвазивные способности, содержит на поверхности протеин-А, благодаря чему способен сопротивляться фагоцитозу и обладает способностью не подвергаться лизису внутри фагоцитов. Важным фактором, который указывается рядом авторов является более значительная устойчивость стафилококков к факторам окружающей среды и способность размножаться в трещинах кожи сосков, где,

контактируя с антимикробными средствами в концентрации недостаточной для антибактериального действия, приобретают антибиотикоустойчивость [2].

До середины XX века считалось, что крупный рогатый скот крайне не восприимчив к стафилококковым инфекциям. Однако *St. aureus* вызывает мягкое воспаление и понижение молочной продуктивности, без проявления явных признаков болезни (субклиническая форма), что опасно в плане бесконтрольного поступления золотистых стафилококков в молоко. В отличие от стрептококка, он содержится в окружающей среде, на коже сосков вымени, руках дояров и при соответствующих условиях способен проникать в молочную железу [7].

Идентификация бактериальных патогенов в молоке коров рассматривается как окончательный диагноз на мастит. Она также дает информацию для профилактики и лечения этого заболевания. Преимущество микробиологического исследования заключается в возможности идентификации бактерий и определения антимикробной чувствительности, т.е. получить информацию на основании которой назначается лечение. Однако этот метод имеет ряд недостатков. Ограничивающим фактором является динамика инфекции. У коров с субклиническим маститом степень инфицированности в течение лактации колеблется. В культуре молока из долей вымени с субклиническим маститом можно не выявить бактерии из-за очень низкого количества патогенов или же присутствия в пробах остаточных антибиотиков, которые ингибируют рост бактерий *in vitro*. Кроме того, биологическое культивирование молока – это трудоемкий процесс. Идентификация видов бактерий стандартными биохимическими методами требует более 48 ч [5,6].

Особую надежность для постановки диагноза мастита представляет полимеразная цепная реакция. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР диагностирует присутствие возбудителя инфекции. ПЦР позволяет одновременно выявить многие патогены, которые могут быть причиной возникновения мастита. В этом случае в одну реакцию включены несколько пар праймеров, специфичных к различным сегментам ДНК, что дает возможность амплификации множественных последовательностей-мишеней в одном анализе. Идентификация бактерий основывается на амплификации гена-мишени, очень консервативного в пределах вида и изменчивого между видами. В настоящее время полимеразная цепная реакция используется для одновременного выявления и типирования нескольких видов бактерий и вирусов [3, 7].

Материалы и методы. Экспериментальная часть работы выполнялась в период с 2009 по 2011 годы в УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» ордена «Знак Почета». ДНК-диагностика возбудителей мастита проведена в ГНУ «Институт биоорганической химии» НАН Беларуси. Базой для проведения исследования было СПК «Ольговское» Витебского района.

По клиническим признакам диагностировали клинически выраженный мастит. Если секрет вымени не отличался от нормального молока, то для определения субклинического мастита использовали диагностику Беломастин, дополнительно определяли величину электропроводности секрета вымени с помощью прибора Мастит-тест (Россия). Пробы молока отбирали у животных с клинической и субклинической формой мастита.

Бактериологическое исследование молока проводили для определения общей бактериальной загрязненности, выделения вида и рода микроорганизмов, вызвавших заболевание молочной железы.

Для идентификации возбудителя мастита у молочных коров был применен метод мультиплексной полимеразной цепной реакции, который позволил параллельно выявить двух основных бактериальных агентов, вызывающих мастит у коров: *S. aureus*, *S. agalactiae*. При проведении мультиплексной ПЦР использовали праймеры, нуклеотидные последовательности которых соответствовали последовательностям, предложенным (Forsman, al., 1997):

S. aureus: TCTTCAGAAGATGCCGAATA
TAAGTCAAACGTTAACATACG
S. agalactiae: AAGGAAACCTGCCATTTG
TTAACCTAGTTTCTTTAAACTAGAA

Для проведения ПЦР *S. aureus* и *S. agalactiae* использовали реакционную смесь в объеме 50 мкл: 200 мкМ dATP, 10 мМ буфер для проведения ПЦР (pH = 8,3), 50 мМ KCL и 200 нг экстрагированной ДНК.

ПЦР - программа: «горячий старт» – 95°C – 5мин; 36 циклов: денатурация – 95°C – 1мин, отжиг – 59°C – 30 сек, синтез – 72°C – 30 сек; элонгация – 72°C – 7 мин.

Продукты расщепления амплификата рестриктазой *HaeIII* представлены на рисунке 2.3.

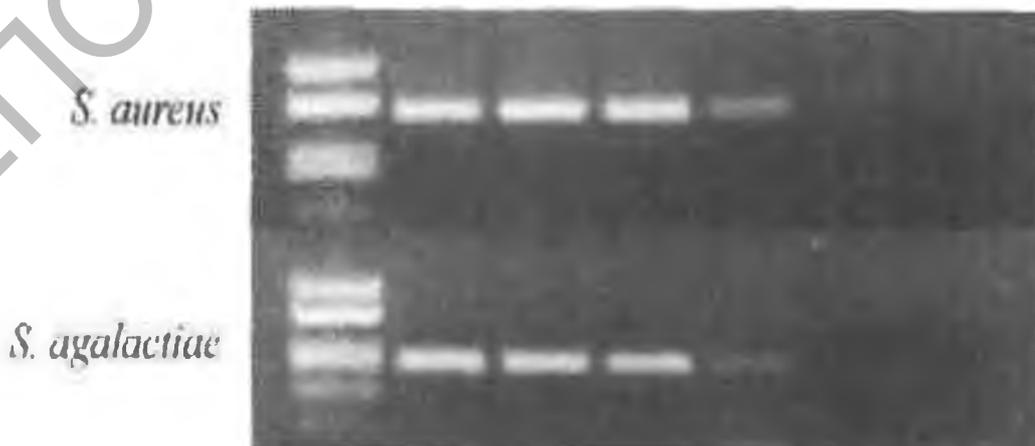


Рисунок 1 – Чувствительность мультиплексной ПЦР для обнаружения ДНК из *S. aureus*, *S. agalactiae* с использованием рестриктазы *HaeIII*

Результаты. В СПК «Ольговское» Витебского района остро стоит проблема снижения продуктивности и недополучения продукции из-за заболеваемости коров маститами. В ходе исследования было установлено, что заболеваемость коров маститами за 2010-2011 годы составила от 26,0 до 24,9 %.

Главную роль в этиологии и патогенезе мастита играет микрофлора, которая является одним из источников заболевания. В результате бактериологического исследования 20 проб секрета вымени, проведенного на кафедре микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ, были выделены следующие микроорганизмы: 7 проб (35 %) - *Strep. agalactiae*, 5 проб (25 %) - *Staph. aureus*, 4 пробы (20 %) - *E. coli*, 3 пробы (15 %), ассоциация - *E. coli*, *Staph. epidermidis*, *Strep. agalactiae*. В одной из проб возбудителей заболевания не выявлено, что является доказательством того, что в возникновении мастита микробный фактор не является абсолютным.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что основная доля случаев болезни приходится на мастит микробной этиологии. Его возбудителями являются *Staph. aureus* и *Strep. Agalactiae* (60 %). Полученные нами результаты исследований согласуются с данными К.Д. Валюшкина, который указывал на высокую патогенность данных возбудителей, занимающих первое место в ранге причин, вызывающих воспаление молочной железы [2].

Для более точной постановки диагноза мастита у молочных коров использовали метод мультиплексной полимеразной цепной реакции, обеспечивающий параллельное выявление основных бактериальных агентов: *Staph. aureus* и *Strep. agalactiae*.

Исходя из предварительного бактериологического анализа проб молока коров СПК «Ольговское» провели ПЦР. Для этого взяли 12 проб молока, инфицированного *Staph. aureus* и *Strep. Agalactiae* из отдельных долей вымени коров, больных маститом.

Оптимальная концентрация праймеров соответствовала количеству, необходимому для получения одновременной амплификации патогенов: *Staph. aureus* и *Strep. agalactiae*. Ни одна из пар праймеров не дала продуктов с ДНК от другого бактериального вида.

Из 12 проб молока выделили 5 проб - *Staph. aureus*, 7 проб - *Strep. agalactiae*, что на 100 % подтверждает данные, полученные при бактериологическом исследовании секрета вымени.

Видоспецифическая ПЦР была разработана нами для двух основных возбудителей мастита: *Staph. aureus* и *Strep. agalactiae*. Мультикомплексная ПЦР позволяет одновременно обнаружить множественные патогены в одной реакции. При этом используется небольшое количество реактивов, по сравнению с бактериологическим анализом молока, существенно экономится время, что повышает эффективность применения мультикомплексной ПЦР для диагностики мастита.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности использования данных маркеров в качестве тест-систем для идентификации основных возбудителей вызывающих мастит у коров: *Staph. aureus* и *Strep. agalactiae*.

Литература. 1. Бузук, Б.В. Качество молока в зависимости от заболевания вымени коров маститами / Б.В. Бузук, В.Г. Коломеец // Наука – производству: материалы пятой Международной научно-практической конференции. – Гродно, 2002. – С. 256–258. 2. Валюшкин, К.Д. Рекомендации по совершенствованию лечения и профилактики маститов у коров / К.Д. Валюшкин, С.Н. Ковальчук. – Витебск, 2005. – 17 с. 3. Панин, А.Н. Полимеразная цепная реакция – необходимый инструмент для идентификации и типирования возбудителей инфекционных болезней животных / А.Н. Панин, И.Л. Обухов, К.Н. Груздев // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России. – Москва, 1999. – Т. 1. – С. 313–315. 4. Попов, Л.К. Генотипические аспекты мастита у коров и его фитотерапия : автореф. дис. ... доктора вет. наук : 16.00.07 / Л.К. Попов. – Воронеж, 1998. – 30 с. 5. Факторы и генетика патогенности стрептококков группы В / А.В. Дмитриев [и др.] // Микробиология. – 2000. – № 5. – С. 92–97. 6. Fhuetes, P. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus* causes of bovine mastitis / P. Fhuetes, P.D. Manaell // J. Dairy Sci. – 2001. – Vol. 84. – P. 1140–1148. 7. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping / V. Myllys [et al.] // Veter. Microbiol. – 1997. – Vol. 57, № 2/3. – P. 245–251.