

УДК: 579.842.16:616.9:636.2

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.20

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АССОЦИИРОВАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МАСТИТОВ КОРОВ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА

Смирнова Л.И. * – канд. ветеринар. наук, доц., доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии (ORCID: 0000-0002-4367-8386); Забровская А.В. – д-р ветеринар. наук, доц. кафедры паразитологии имени В.Л. Якимова (ORCID: 0000-0003-2655-7555); Макаров А.В. – студ.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

*lubov965@rambler.ru

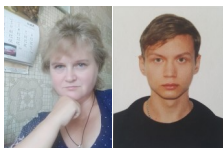
Ключевые слова: коровы, маститы, лабораторная диагностика, бактериологические исследования, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Shewanella sp.*, чувствительность к антибиотикам.

Key words: cows, mastitis, laboratory diagnostics, bacteriological studies, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Shewanella sp.*, antimicrobial susceptibility.

Поступила: 19.07.2024

Принята к публикации: 20.09.2024

Опубликована онлайн: 01.10.2024



РЕФЕРАТ

Маститы являются одной из главных проблем молочного животноводства, причиняющей значительный экономический ущерб вследствие снижения продуктивности, затрат на лечение и ранней выбраковки больных животных. Как правило, маститы имеют бактериальную этиологию, протекают как в виде моно-, так и ассоциированной инфекции. Нами было проведено мониторинговое бактериологическое исследование проб молока коров и смывов с доильного оборудования в промышленном комплексе по производству молока в Ленинградской области. Исследовали 120 проб молока при клинически выраженном (45) и скрытом мастите (15), а также пробы молока здоровых коров (30) и смывы с доильного оборудования (30). Выделили 94 культур микроорганизмов, у которых были определены биологические свойства. Определяли чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) следующих групп: цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды, монобактамы, тетрациклины, сульфаниламиды, хинолоны, полимиксины. Этиологическим фактором возникновения маститов у коров в данном хозяйстве является ассоциация колиформных микроорганизмов и *Pseudomonas* spp. Доминирующая роль принадлежит *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Выделены 28 культур *K. pneumoniae* в ассоциации с другими микроорганизмами. В 36,7% случаев это ассоциация *K. pneumoniae* и *Proteus mirabilis*. В 14,4% - ассоциация *K. pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*, в 37% случаев – *K. pneumoniae* и *Escherichia coli*, в 11,9% случаев – *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Shewanella sp.* Изоляты *Shewanella sp.* обладали

лецитиназной и гемолитической активностью, были галофильны и слабовирулентны для белых мышей при подкожном заражении. Практически все выделенные микроорганизмы были устойчивы по меньшей мере к одному АМП. Таким образом, в данном животноводческом предприятии сформировался биоценоз микроорганизмов, являющихся потенциальными возбудителями гнойно-септических болезней, в том числе мастита. Для предотвращения заболевания маститами необходимы комплексные меры по санации животноводческого помещения и оборудования с целью элиминации персистирующей в нём ассоциации микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

При содержании и эксплуатации крупного рогатого скота в условиях крупных промышленных комплексов ветеринарные специалисты и персонал часто сталкиваются с проблемой возникновения у животных ассоциированных бактериальных инфекций, проявляющихся у взрослых коров маститами и вульвовагинитами, а у молодняка – бронхитами, бронхопневмониями и поражением желудочно-кишечного тракта.

Бактериальные маститы, вызываемые оппортунистической микрофлорой – одна из наиболее актуальных проблем промышленного молочного животноводства. Резервуар возбудителей таких маститов – окружающая среда (подстилка, почва, навоз, предметы доильного оборудования, различные рабочие поверхности животноводческих помещений и молочного цеха). Практически все микроорганизмы, инфицирующие вымя, при наличии predisposing условий могут вызвать в тканях молочной железы воспалительные процессы. В частности, в отдельных хозяйствах выявляют ассоциированные колиформные маститы и маститы, вызванные *Pseudomonas* spp. Они наносят колоссальный вред здоровью и угрожают жизни ценных высокопродуктивных животных [7].

Энтеробактерии и *Pseudomonas* spp. широко распространены в окружающей среде. Часто они обитают на слизистых оболочках носовой полости, верхних дыхательных путей и кишечника, выделяются с экскрементами. Они живут также в скошенной траве, гниющем сене, опавшей листве и хвое деревьев, луговой и лесной почве, морской и речной воде. Часто они являются психрофильными олиготрофными микроорганизмами, име-

ют возможность размножаться, используя небольшое количество органических веществ, содержащихся в прудовом и озёрном иле, торфе, стружках, опилках, различных влажных поверхностях.

В молочную железу коров такие возбудители – «природные патогены», «патогены окружающей среды» - могут проникать лимфогенным и гематогенным путями, но чаще всего это галактогенный путь – через сосковый канал. При этом часто инфицирование происходит даже не во время доения, а во время отдыха коровы на постилке, контаминированной микроорганизмами. Предрасполагающими факторами являются нарушение санитарно-гигиенических условий содержания, негативные климатические явления (сквозняки, жаркая или, наоборот, морозная погода, повышенная влажность в животноводческих помещениях). Очень сильно ослабляет иммунитет животных круглогодичное стойловое содержание без возможности выгула и доступа к солнечному свету и свежему воздуху. В таких условиях в воздухе помещений скапливается большое количество содержащих микроорганизмы аэрозолей, количество микробных клеток резко превышает нормативы, местный микробизм является одним из сильнейших стресс-факторов и для молодняка, и для взрослых коров. Для эффективного оздоровления поголовья важны комплексные диагностические мероприятия, в том числе мониторинговые бактериологические исследования.

Цель исследования – изучение биологических свойств, патогенного потенциала возбудителей бактериальных маститов. Задача исследования - выделение и идентификация возбудителей маститов, изучение этиологической значимости выделенных микроорганизмов, а также определе-

ние их чувствительности к антимикробным препаратам

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В условиях промышленного комплекса по производству молока, расположенного в Ленинградской области, было проведено мониторинговое бактериологическое исследование проб секрета молочной железы лактирующих коров, эксплуатируемых в условиях безвыгульного беспривязного содержания. Исследовали пробы молока животных с диагностированным скрытым (15) и клинически проявившимся (45) маститом, а также пробы молока здоровых коров (30) и смывы с молочных стаканов после дойки (30). Пробы молока в количестве 40 мл брали в доильном зале в стерильные пластиковые контейнеры. Предварительно проводили тщательную обработку и дезинфекцию вымени мыльным раствором и 70%-этанолом, обсушивали вымя одноразовыми салфетками и сдаивали первые струйки молока в отдельную ёмкость. Смывы с молочных стаканов брали слегка увлажнёнными физиологическим раствором стерильными ватными тампонами и помещали во «влажную камеру» в стерильных пробирках [2]. В лабораторию пробы доставляли в изотермическом контейнере при температуре 4о С. Микроскопию и первичные посевы в питательные среды проводили не позднее 2-х часов после окончания отбора проб.

Первичные посевы проводили, используя питательные среды: ГРМ-агар, МПБ, кровяной агар с 5% дефибринированной кровью барана, желточно-солевой агар Чистовича, среду Сланетца и Бертли (энтерококк-агар), среды для энтеробактерий – Эндо и Плоскирева. Для дифференциации *Pseudomonas* spp и *Shewanella* spp. использовали среду Кинг-1, а также селективную питательную среду «Псевдомонас-АПС (по Сиволодскому Е.П) и селективную среду с иргазаном для выделения *Shewanella* spp. (по Сиволодскому Е.П., патент РФ 2435845) [6]. Посев проводили по 0,1 мл на каждую среду. Инкубировали в термостате при

температуре 37° С в течение 18 – 24 часов.

Полученные чистые культуры бактерий исследовали, определяя морфологические, тинкториальные, культурально-биохимические свойства и вирулентность в биопробах на белых мышах. Выделенные микроорганизмы идентифицировали согласно действующим нормативным документам и определяли их чувствительность к антибактериальным препаратам, руководствуясь Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия-2018-03, методом дисков с использованием среды Мюллера-Хинтона (производства HiMedia) и дисков с антибактериальными препаратами производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (набор дисков для оценки антибиотикочувствительности энтеробактерий и псевдомонад – возбудителей внебольничных инфекций), а также с помощью автоматической микробиологической системы «VITEC COMPACT 2» [1,3]. *Shewanella* spp. идентифицировали также протеометрическим методом, с использованием анализатора Bruker Daltonik MAL-DI Biotyper.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Были проведены исследования 120 проб. Из секрета молочной железы коров при скрытом и клинически проявляющемся мастите и смывов с доильных стаканов выделили 94 культуры бактерий, в том числе 57 культур видов, имеющих ветеринарное значение. Установили, что в большинстве случаев в секрете молочной железы коров, больных маститом в данном промышленном комплексе, были обнаружены колиформные бактерии и *Pseudomonas* spp. Выделены 28 культур *K. pneumoniae* в ассоциации с другими микроорганизмами: в 37,0% случаев - ассоциация *K. pneumoniae* и *Escherichia coli*, в 36,7% случаев - ассоциации *K. pneumoniae* и *Proteus mirabilis*, в 11,9% случаев – *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Shewanella* spp., в 4,4% это была ассоциация *K. pneumoniae* и *Pseudomonas*

aeruginosa. Из проб молока здоровых коров были выделены единичные бактериальные клетки *Enterococcus faecium*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas fluorescens* (непатогенная микрофлора).

Все изученные культуры были вирулентны для белых мышей, при подкожном введении 0,2 мл смыва суточной агаровой культуры с концентрацией 1 млрд микробных клеток вызывали их гибель в течение 4-5 дней после заражения.

Выделенные культуры *K. pneumoniae* были факультативно психрофильными, хорошо росли при температуре культивирования от +4°C до +37°C, наиболее ак-

тивный рост проявляли при комнатной температуре +20-22°C и без доступа света, на средах, содержащих лактозу. Они обладали ярко выраженной способностью к образованию биоплёнки - слизеподобного матрикса, то есть были гипермукоидными. Их колонии на плотных питательных средах имели крупный размер до 12-14 мм, округлую форму, плоско-приподнятый профиль и влажную тянущуюся консистенцию.

Изоляты *K. pneumoniae* обладали β-лактамазой расширенного спектра действия (БЛРС) и проявляли резистентность к антибактериальным препаратам не-

Таблица 1 – Микроорганизмы, выделенные при мониторинговом исследовании молока коров промышленного животноводческого комплекса

№	Вид материала	Количество проб, n=120	Выделенные микроорганизмы	Количество культур, n=94
1	Молоко при острой и подострой форме мастита до лечения	30	<i>K.pneumoniae</i> <i>P.mirabilis</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>Shewanella</i> spp. <i>S. aureus</i>	10 5 4 8 5 2
2	Молоко при подостром мастите после лечения	15	<i>K.pneumoniae</i> <i>P.mirabilis</i>	8 4
3.	Молоко при скрытом мастите	15	<i>K. pneumoniae</i> <i>S.aureus</i> <i>E.faecium</i> <i>Shewanella</i> spp.	4 2 11 2
4.	Молоко клинически здоровых коров	30	<i>E.faecium</i> <i>Micrococcus</i> spp. <i>P.fluorescens</i>	13 6 1
5.	Смывы с доильных аппаратов:	30		
5.1.	До доения (чистого)	5		0
5.2.	После доения коров с маститом	10	<i>K. pneumoniae</i> <i>E.faecium</i>	5 3
5.3.	После доения и промывки моюще-дезинфицирующим средством	5		0
5.4.	Смывы из стакана с раствором для обработки сосков до доения (во время использования)	5	<i>K.pneumoniae</i>	1
5.5.	Смывы со стакана с дезинфицирующим раствором для обработки сосков после доения	5	-	0
	Всего	120		94

скольких фармакологических групп: аминогликозидам (тобрамицину, амикацину, гентамицину), β -лактамам (ампициллину, амоксиклаву, цефепиму, цефотаксиму), тетрациклину, ко-тримоксазону. Такие биологические свойства затрудняют проведение лечения, так как спектр эффективных АМП ограничен. [4].

Культуры *Proteus* spp. характеризовались обильным ростом, образовывали толстую влажную вуалеобразную плёнку на поверхности плотных сред без ингибиторов, при росте культур наблюдался сильный неприятный запах гниющих молочных продуктов.

Изоляты *P. mirabilis* проявляли устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину, ломефлоксацину, налидиксовой кислоте), сульфаниламидам, ко-тримоксазолу, тетрациклину, полимиксину, аминогликозидам (стрептомицин, гентамицин), нитрофурантоину, β -лактамам.

В ассоциации выделенных при бактериологическом исследовании молока коров, больных маститом, микроорганизмов в ряде случаев присутствовали *P. aeruginosa*. Псевдомоназные маститы часто носят сверхострую форму, быстро развиваются после ранения вымени или попа-

дании микроорганизмов через сосок. Однако, в данном случае псевдомонады не вызывали сверхострого течения мастита и не приводили к резкому ухудшению общего состояния коров. Выделенные культуры *Pseudomonas* spp. отличались пониженной способностью выделять пиоцианин, проявляющийся в достаточной степени только на среде Кинг-1 [6]. На среде ГРМ *P. aeruginosa* образовывали плоские, спаянные со средой, серебристо-серые, блестящие колонии с волнистым краем («маргаритки») и запахом «земляничного мыла». Вокруг колоний среда слегка прокрашивалась в зеленовато-жёлтый или розовато-серый цвет.

Все изоляты проявляли чувствительность к амикацину, штаммы *P. aeruginosa* и *P. extremorientalis* – к меропенему, все штаммы были устойчивы к имипенему, цефепиму, азтреонаму, дорипенему. Культуры были слабовирулентны для белых мышей, вызывали их заболевание и гибель одной из двух мышек через 5 дней после заражения.

Обращает на себя внимание факт выделения из исследованного биологического материала бактерии *Shewanella* spp. По своим морфологическим свойствам *Shewanella* spp. сходна с *Pseudomonas* spp. и энтеробактериями, растёт на аналогичных средах. Обычно *Shewanella* spp. выделяют из проб водной фауны и флоры, а также при выявлении в молочных и мясных продуктах возбудителей биологической порчи [2]. Но в данном случае *Shewanella* spp. в ассоциации с колиформными микроорганизмами можно считать одним из возбудителей мастита. Выделенные в ассоциации с *Klebsiella* spp., *Shewanella* spp. обладали сильными протеолитическими свойствами, вирулентностью для мышей. Принадлежность выделенных бактерий к роду *Shewanella* spp. определяли по виду колоний: зелёного цвета с чёрным центром или тёмно-серых, окруженных зоной помутнения на селективной среде для *Shewanella* spp. с игразаном, бромтимоловым синим и рифампицином (по Сиволодскому Е.П.) [6]. Автоматической микробиологической системой «VITEC

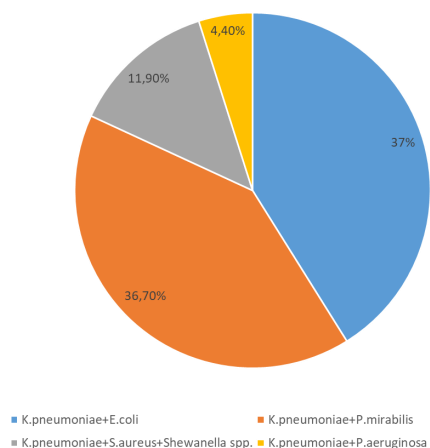


Рисунок 1 – Ассоциации микроорганизмов, выделенные из молока коров при мастите.

COMPACT 2» данные изоляты были идентифицированы как *Shewanella putrefaciens*. Аналогичный результат получен при идентификации изолятов протеометрическим методом в аппарате MALDI-TOFF. Однако эти результаты вызвали сомнение, так как полученные культуры были галофильными, на желточно-солевом агаре Чистовича росли в виде сочных, выпуклых розовато-желтых колоний, сливающихся между собой, и проявляли выраженную лецитиназную активность в виде широких зон помутнения с

радужным блеском вокруг образующихся на этой среде колоний. Также они проявляли гемолитическую активность на кровяном агаре и были слабовирулентны для белых мышей. Согласно литературным данным, такие биологические свойства характерны для другого вида – *Shewanella algae* [6].

Выделенные культуры *Shewanella* spp. проявляли резистентность к большинству тестируемых антибактериальных препаратов, были чувствительны к гентамицину, цефепиму, хлорамфениколу

Таблица 2 – Чувствительность к антибиотикам культур *Pseudomonas* spp., выделенных из молока

	Цефепим	Амикацин	Дорипенем	Меропенем	Имипенем	Азтиреонам
<i>P. aeruginosa</i>	R	S	ЗТН	S	R	R
<i>P. extremorientalis</i>	R	S	ЗТН	S	ЗТН	R
<i>P. fluorescens</i>	R	S	ЗТН	ЗТН	R	R
<i>P. putide</i>	R	S	R	R	R	R
<i>P. sinxantis</i>	R	S	ЗТН	ЗТН	R	R

R - устойчивый штамм;

S – чувствительный штамм;

Зтн – зона технической неопределенности.



Рисунок 2 – Рост культур *Shewanella* spp. (сливающиеся розовато-жёлтые колонии) и *Staphylococcus aureus* (округлые белые колонии) на желточно-солевом агаре.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

На основании полученных результатов сделан вывод, что одной из причин болезни молочной железы коров в условиях промышленного производства молока является комплексное патогенное воздействие сформировавшейся в животноводческом помещении ассоциации энтеробактерий и *Pseudomonas* spp., в том числе близкой к *Pseudomonas* spp. и обычно не обладающей вирулентностью *Shewanella* spp. Лечение животных осложняется трудностью подбора АМП, связанной с устойчивостью микроорганизмов. Сформировавшийся патогенный биоценоз хорошо сохраняется во внешней среде, вероятно, имеет возможность даже размножаться на влажных поверхностях оборудования доильного зала, откуда попадает на вымя коров [5]. Ассоциация бактерий взаимно усиливает вирулентность

каждого вида, что приводит к комплексному болезнетворному воздействию на организм лактирующих коров. Необходимы комплексные меры по санации животноводческого помещения с бактериологическим мониторингом точек контроля и использованием схемы «всё пусто - всё занято».

DIAGNOSTICS OF ASSOCIATED COLIFORM MASTITIS OF COWS IN INDUSTRIAL COMPLEX CONDITIONS

Smirnova L.I.*, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, (ORCID: 0000-0002-4367-8386); **Zabrovskaya A.V.**, Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor, (ORCID: 0000-0003-2655-7555); **Makarov A.V.**, student.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

*lubov965@rambler.ru

ABSTRACT

Mastitis is one of the main problems of dairy farming, causing significant economic damage due to reduced productivity, treatment costs and early culling of sick animals. As a rule, mastitis has a bacterial etiology, occurs both as a mono- and associated infection. We conducted a bacteriological monitoring study of cow milk samples and swabs from milking equipment in an industrial complex for milk production in the Leningrad region. 120 milk samples were examined for clinically expressed (45) and latent mastitis (15), as well as milk samples from healthy cows (30) and swabs from milking equipment (30). 94 isolates of microorganisms were obtained, in which biological properties were established. Susceptibility to antimicrobials was determined to: cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides, monobactams, tetracyclines, sulfonamides, quinolones, polymyxins. The etiological factor of the occurrence of mastitis in cows in this farm is the association of coliform microorganisms and *Pseudomonas* spp. The main pathogen is *Klebsiella pneumoniae*

subsp. *pneumoniae*. In 36.7% of cases, this is an association of *K. pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. In 14.4% there was an association of *K. pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, in 37% of cases – *K. pneumoniae* and *Escherichia coli*, in 11.9% of cases – *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Shewanella* spp. Isolates of *Shewanella* spp. had lecithinase and hemolytic activity, were halophilic and slightly virulent for white mice with subcutaneous infection. Almost all isolated microorganisms were resistant to at least one antimicrobial. Thus, a biocenosis of microorganisms has been formed in this livestock enterprise, which are potential pathogens of purulent-septic diseases, including mastitis. To prevent mastitis disease, comprehensive measures are needed to sanitize livestock premises and equipment in order to eliminate the persistent association of microorganisms in it.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Версия-2018-03.
2. Клиническая ветеринарная микробиология: учебное пособие / Смирнова Л.И., Макавчик С.А. – СПб: Издательство MBV, 2022 – 228 С.
3. Макавчик, С.А. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение антимикробных препаратов: монография / Макавчик С.А., Сухинин А.А., Енгашев С.В., Кротова А.Л. – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2021.-С.152с.: ил.
4. Макавчик, С. А. Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae* и практическое значение для ветеринарной медицины / С. А. Макавчик, М. С. Борисова // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2023. – № 1. – С. 26-30. – DOI 10.52419/issn2782-6252.2023.1.26.
5. Смирнова Л.И. Роль бактерий рода *Klebsiella* при ассоциированных инфекциях коров и телят в условиях промышленного комплекса / Л.И.Смирнова,

А.В.Забровская, Е.И.Приходько, В.Э.Ярикова, Д.М.Гегирова // Международный вестник ветеринарии. – 2014., - №3. – С.7-11.

6. Способ выделения и идентификации бактерий рода *Shewanella* - патент РФ 2435845 - Сиволодский Евгений Петрович (freepatent.ru)

7. Сухинин А.А. Практикум по общей ветеринарной микробиологии. Сухинин А.А. Тулева Н.П., Белкина И.В., Смирнова Л.И. Бакулин В. А., Приходько Е.И., Макавчик С.А, Виноходов В.О. Санкт-Петербургский политологический журнал. – 2016.- С. 100.

REFERENCES

1. Clinical recommendations "Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs". Version-2018-03.
2. Clinical veterinary microbiology: textbook /Smirnova L.I., Makavchik S.A. – St. Petersburg: Publishing House MVV, 2022 – 228 P.
3. Makavchik, S.A. Laboratory methods for the control of polyresistant pathogens of bacterial animal diseases and the rational use of antimicrobial drugs: monograph /

Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Engashev S.V., Krotova A.L. – St. Petersburg: Publishing house of the WWM, 2021.-p.152с.: ill.

4. Makavchik, S. A. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* and its practical significance for veterinary medicine / S. A. Makavchik, M. S. Borisova // Regulatory and legal regulation in veterinary medicine. - 2023. – No. 1. – pp. 26-30. – DOI 10.52419/issn2782-6252.2023.1.26.

5. Smirnova L.I. The role of *Klebsiella* bacteria in associated infections of cows and calves in an industrial complex / L.I.Smirnova, A.V.Zabrovskaya, E.I.Prikhodko, V.E.Yarikova, D.M.Gegirova // International Bulletin of Veterinary Medicine. - 2014., - No.3. – pp.7-11.

6. Method of isolation and identification of bacteria of the genus *Shewanella* - patent of the Russian Federation 2435845 - Sivolodsky Evgeny Petrovich (freepatent.ru)

7. Sukhinin A.A. Workshop on general veterinary microbiology. Sukhinin A.A. Tuleva N.P., Belkina I.V., Smirnova L.I. Bakulin V.A., Prikhodko E.I., Makavchik S.A., Vinokhodov V.O. St. Petersburg Journal of Political Science. – 2016.- p. 100.