

**Ветеринарная микробиология, микробиомы**

УДК 636.2.034:579.62

doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.810rus

**СКРИНИНГ СТАДА МОЛОЧНЫХ КОРОВ НА НАЛИЧИЕ В МОЛОКЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С СОДЕРЖАНИЕМ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК\*****О.А. АРТЕМЬЕВА, Д.А. ПЕРЕСЕЛКОВА, И.В. ВИНОГРАДОВА,  
Е.Н. КОТКОВСКАЯ, Е.А. ГЛАДЫРЬ, Н.В. СИВКИН, Н.А. ЗИНОВЬЕВА**

Мастит (воспаление молочной железы) — одно из широко распространенных инфекционных заболеваний молочного скота, наносящее существенный экономический ущерб животноводству и влияющее на качество молочной продукции. Показано, что маститы у коров чаще всего вызывают стафилококки, причем наиболее распространен золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*. Одним из индикаторов, указывающих на наличие субклинической формы маститов, служит повышение содержания в молоке соматических клеток (somatic cell, SC). Целью настоящей работы была оценка наличия гемолитических микроорганизмов — стрептококков и стафилококков во взаимосвязи с содержанием соматических клеток (somatic cell count, SCC) в молоке высокопродуктивных молочных коров и характеристика антибиотикорезистентности выделенных из молока штаммов *Staphylococcus aureus*. Для скрининга использовали пробы молока клинически здоровых коров голштинской породы, отобранные от всех животных в стаде, с 1-й по 7-ю лактации ( $n = 345$ , Московская обл., 2015 год). В зависимости от наличия в молоке микроорганизмов исследуемая выборка коров была разделена на четыре группы: I — гемолитические стрептококки и *S. aureus* не обнаружены; II — обнаружены только гемолитические стрептококки; III — присутствуют только *S. aureus*; IV — обнаружены гемолитические стрептококки и *S. aureus*. Профиль антибиотикочувствительности изолятов *S. aureus* определяли на специальной среде диско-диффузионным методом. Наличие метициллин-резистентных стафилококков (MRSA) определяли с помощью теста MRSA Alert w/swabs («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). В качестве референтных штаммов использовали *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Согласно полученным результатам, только у 22,0 % клинически здоровых коров в молоке не содержалось изучаемых форм микроорганизмов, в то время как у 78,0 % было установлено наличие гемолитических стрептококков и(или) *S. aureus*. Выявлена тенденция к повышению доли коров, содержащих *S. aureus*, с увеличением номера лактации — с 14,7-19,2 % у животных 1-2-й лактаций до 32,0-45,2 % у животных с 3-й и последующих лактаций. Были установлены достоверно более высокие значения SCC в молоке коров III группы: +1191,1 тыс.; +1124,3 тыс. и +1099,6 тыс. кл/см<sup>3</sup> ( $p < 0,001$ ) по сравнению с показателем соответственно в I, II и IV группах. Содержание *S. aureus* в молоке коров из III группы варьировало от  $< 1,0$  до  $7,5 \lg \text{КОЕ/см}^3$ , IV группы — от  $1,0$  до  $7,8 \lg \text{КОЕ/см}^3$  и в среднем составило соответственно  $3,62 \pm 0,36$  и  $3,47 \pm 0,23 \lg \text{КОЕ/см}^3$ . Зависимости между титрами *S. aureus* в молоке коров и SCC не выявили. Более 95,0 % изолятов *S. aureus* были устойчивы к линкомицину, 59,5 % — к эритромицину, 50,6 % — к фузидину. Более 95,0 % изолятов *S. aureus* оказались чувствительны к оксациллину, гентамицину и ванкомицину. Некоторые штаммы были устойчивы к оксациллину (1,3 %), что требует дальнейшего изучения их генетической структуры с применением молекулярных методов.

**Ключевые слова:** высокопродуктивные молочные коровы, гемолитические микроорганизмы, стрептококки, *Staphylococcus aureus*, соматические клетки, мастит.

Воспаление молочной железы, или мастит, — широко распространенное инфекционное заболевание молочного скота (1, 2). По данным международной организации FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Италия), мастит — наиболее разрушительное заболевание, приводящее к огромным экономическим потерям (3). Маститами поражаются коровы в любой период лактации, при этом чаще заболевают высокопродуктивные животные. Основные потери молока приходятся на время болезни и последующий период выздоровления. У части коров из-за длительного лечения происходят необратимые изменения в ткани молочной

\* Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда, проект № 15-16-00020.

железы, и прежние удои не восстанавливаются. Так, в Нидерландах, стране с высокой культурой животноводства, потери на корову от заболевания маститом составляют от 17 до 198 евро в год (4). В России клиническая форма маститов диагностируется в ряде случаев у 20-25 % коров и более, субклиническая — более чем у 50 % и может сохраняться в течение нескольких лактаций. Более 20 % коров выбраковываются после перенесенного заболевания вследствие атрофии одной или нескольких четвертей вымени (5). Из-за мастита годовой удой по стаду снижается на 8-12 % (6, 7).

Многочисленными исследованиями показано, что маститы у коров чаще всего вызывают стафилококки. Они выделяются при заболевании острыми и субклиническими формами маститов соответственно в 75-80 % и 90-98 % случаев (8-11). Наиболее распространен золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*, среди штаммов которого есть условно патогенные, секретирующие факторы вирулентности (энтеротоксины) — набор небольших белков, устойчивых к действию высоких температур, кислот, щелочей и протеолитических ферментов (12-14). Установлено, что золотистые стафилококки присутствуют в молоке у 8,7 % клинически здоровых коров, у 59,3 % коров с субклинической формой маститов и 28,8 % коров с клинической формой, причем соответственно 25,0; 42,2 и 33,3 % стафилококков — энтеротоксигенные. В 18 % проб сборного молока содержались стафилококки, 36,4 % которых были энтеротоксигенными (15).

Хотя при режимах, принятых в промышленности для пастеризации молока (температура 75-76 °С, обработка в течение 15-20 с), стафилококки, как правило, погибают, производимые ими токсины в основном сохраняют свои свойства. В этой связи необходимо проводить мониторинг стад на наличие маститов и разрабатывать методы их лечения.

Одним из индикаторов, указывающих на наличие субклинической формы маститов, служит повышение содержания в молоке соматических клеток (SC), главным образом лейкоцитов (нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов), эритроцитов и эпителиальных клеток. Число соматических клеток (SCC) в молоке здоровых коров, как правило, меньше 100 тыс. кл/см<sup>3</sup> (16), в то время как бактериальная инфекция может привести к возрастанию значений SCC выше 1000 тыс. кл/см<sup>3</sup> (17). Увеличение SCC при маститах происходит в основном за счет притока нейтрофилов в зону инфекции (18). В большинстве стран приняты стандарты, устанавливающие допустимое число соматических клеток. В странах ЕС предельная граница — не более 400 тыс. кл/см<sup>3</sup>, в Канаде — 500 тыс. кл/см<sup>3</sup>, в США — 750 тыс. кл/см<sup>3</sup>. Самое низкое среднее число соматических клеток в молоке коров в Швеции — около 100 тыс. кл/см<sup>3</sup>, в Новой Зеландии это значение составляет 200 тыс. кл/см<sup>3</sup>, в Канаде — 267 тыс. кл/см<sup>3</sup> (19, 20). Согласно Техническому регламенту Таможенного союза (ТР ТС), стандарты числа соматических клеток в России — 500-750 тыс. кл/см<sup>3</sup> (21). Повышенное SCC (более 500 тыс. кл/см<sup>3</sup>) в молоке предполагает наличие патогенных микроорганизмов даже без клинических признаков болезни у животного (22).

Основные методы лечения маститов у коров предусматривают применение антибиотиков. Однако в ряде случаев такой способ неэффективен, поскольку часть штаммов *S. aureus* содержит специфические факторы антибиотикорезистентности (23-26).

В представляемом исследовании нами в Центральном регионе РФ выявлен относительно высокий процент коров, в молоке которых содержались условно патогенные микроорганизмы — гемолитические стрептококки и золотистые стафилококки (*Staphylococcus aureus*), и определена чувствительность изолятов к ряду антибиотиков. Обнаружено более вы-

сокое среднее число соматических клеток (SCC) в молоке коров с наличием *S. aureus*, однако корреляционный анализ не выявил зависимости между значениями показателя SCC и титрами этого микроорганизма.

Целью работы была оценка наличия гемолитических микроорганизмов — стрептококков и стафилококков во взаимосвязи с содержанием соматических клеток (SCC) в молоке высокопродуктивных молочных коров и характеристика антибиотикорезистентности выделенных из него штаммов *Staphylococcus aureus*.

**Методика.** В качестве материала для исследований использовали пробы молока клинически здоровых коров голштинской породы, отобранные индивидуально от каждой коровы в стаде ( $n = 345$ ) в Центральном регионе РФ (Московская обл.) в апреле 2015 года. Коровы содержались беспривязно. Кормление осуществлялось в соответствии с нормами ВИЖ (27). Распределение коров с 1-й по 7-ю лактации составило соответственно 41,4; 30,1; 9,0; 7,5; 7,2; 3,2 и 1,4 %.

Соматические клетки в сыром молоке подсчитывали с помощью лазерной поточной цитометрии на приборе Somacount 150 («Bentley Instruments», США). Для выделения и количественного учета коагулазоположительных стафилококков использовали Baird Parker Agar («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). Для изучения гемолитических свойств выделенных бактерий применяли Azide Blood Agar Pronadisa («Conda», Испания) с добавлением дефибринированной бараньей крови. Видовую принадлежность бактерий определяли, используя микробиологические среды (ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл.) и с помощью набора для биохимической идентификации стафилококков KB004R («HiStaph, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). Принадлежность к коагулазоположительным стафилококкам определяли с помощью препарата лиофилизированной плазмы (плазма кроличья цитратная сухая, ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

В зависимости от наличия микроорганизмов исследуемая выборка коров была разделена на четыре группы: I — гемолитические стрептококки и *S. aureus* не обнаружены; II — обнаружены только гемолитические стрептококки; III — выявлены только *S. aureus*; IV — обнаружены гемолитические стрептококки и *S. aureus*.

Профиль антибиотикочувствительности изолятов *S. aureus* определяли диско-диффузионным методом (28, 29) на питательной среде, приготовленной в соответствии с инструкцией (ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл.). Чувствительность или резистентность микроорганизмов к антибактериальным препаратам оценивали по диаметрам зон задержки роста в соответствии с инструкцией ЗАО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии» (г. Санкт-Петербург). Наличие метициллин-резистентных стафилококков (MRSA) определяли с помощью теста MRSA Alert w/swabs («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). В качестве референтных штаммов использовали *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур, Россия).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента.

**Результаты.** Только у 22,0 % клинически здоровых коров в молоке не содержалось изучаемых форм микроорганизмов, тогда как у 78,0 % установили наличие гемолитических стрептококков и(или) *S. aureus* (табл. 1).

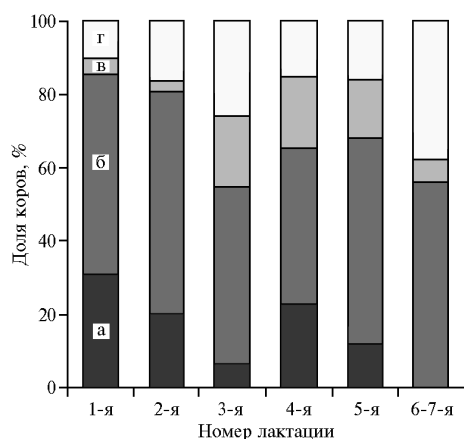
Коровы, свободные от гемолитических стрептококков и *S. aureus*,

были выявлены только среди животных с 1-й по 5-ю лактации, в то время как все коровы 6-й лактации оказались инфицированы гемолитическими микроорганизмами. Доля коров, в молоке которых были обнаружены гемолитические стрептококки (II группа), существенно не различалась у животных разных лактаций и составляла от 42,3 до 60,6 %. Следует отметить тенденцию к повышению числа коров, у которых выявили *S. aureus* (III и IV группы), с увеличением номера лактации: на их долю среди животных 1-й и 2-й лактаций приходилось соответственно 14,7 и 19,2 %, 3-6-й лактаций — от 32,0 до 45,2 % (рис.).

### 1. Распределение коров голштинской породы по группам в зависимости от наличия в молоке изучаемых форм микроорганизмов ( $n = 345$ , Московская обл., 2015 год)

Группа	Гемолитические стрептококки	<i>Staphylococcus aureus</i>	Число голов	
			всего, $n$	доля от общей выборки, %
I	н.о.	н.о.	76	22,0
II	+	н.о.	190	55,0
III	н.о.	+	25	7,0
IV	+	+	54	16,0

Примечание. «+» — обнаружено наличие микроорганизмов; н.о. — микроорганизмы не обнаружены.



**Распределение коров голштинской породы в зависимости от номера лактации и наличия в молоке изучаемых форм микроорганизмов:** а — гемолитические стрептококки и *Staphylococcus aureus* не обнаружены (I группа); б — обнаружены только гемолитические стрептококки (II группа); в — выявлены только *S. aureus* (III группа); г — обнаружены гемолитические стрептококки и *S. aureus* (IV группа) ( $n = 345$ , Московская обл., 2015 год).

Значение SCC в молоке варьировало от 8 тыс. до 6099 тыс. и в среднем составило  $509,8 \pm 46,4$  тыс. кл./см<sup>3</sup>. Распределение коров по показателю SCC по группам согласно стандарту ТР ТС (< 500 тыс., 500-750 тыс. и

> 750 тыс. SC/см<sup>3</sup>) составило соответственно 73,3; 14,8 и 11,9 %.

### 2. Содержание соматических клеток (SCC) в молоке коров голштинской породы с разным микробиологическим статусом (Московская обл., 2015 год)

Группа	SCC, тыс. SC/см <sup>3</sup>				Распределение по классам, %		
	min	med	max	в среднем	< 500 тыс. SC/см <sup>3</sup>	500-750 тыс. SC/см <sup>3</sup>	> 750 тыс. SC/см <sup>3</sup>
I	11	149	2016	$391,1 \pm 44,9^a$	81,6	9,2	9,2
II	8	212	6099	$457,9 \pm 59,2^b$	74,7	13,2	12,1
III	60	1275	4642	$1582,2 \pm 284,0^{a, b, c}$	28,0	8,0	64,0
IV	8	227	5380	$482,6 \pm 119,7^c$	77,8	13,0	9,3

Примечание. SC — соматические клетки; min, med, max — соответственно минимальное значение, медиана, максимальное значение. Описание групп см. в разделе «Методика». Распределение по классам проведено в зависимости от SCC (тыс. SC/см<sup>3</sup>) в соответствии со стандартом ТР ТС 033/2013 (22).

a, b, c Различия между группами, отмеченными одинаковой буквой, достоверны при  $p < 0,001$ .

В молоке коров из III группы значения SCC были достоверно выше, чем в группах I, II и IV (соответственно +1191,1 тыс.; +1124,3 тыс. и +1099,6 тыс. SC/см<sup>3</sup>;  $p < 0,001$ ). Группа III характеризовалась минимальной долей животных с SCC ниже пороговой величины (< 500 тыс. SC/см<sup>3</sup>), и максимальной долей коров с SCC > 750 тыс. SC/см<sup>3</sup>. Наличие гемолитических стафилококков (II группа) не оказывало заметного влияния на SCC, следовательно, существовала иная причина инфицированности. Поскольку явных различий по показателю SCC между коровами I и IV групп не на-

блюдали, потребовались дополнительные исследования на большей выборке животных (табл. 2).

Содержание *S. aureus* в молоке коров из III группы варьировало от < 1,00 до 7,48 lg КОЕ/см<sup>3</sup>, из IV — от 1,00 до 7,78 lg КОЕ/см<sup>3</sup> и в среднем составило соответственно 3,62±0,36 и 3,47±0,23 lg КОЕ/см<sup>3</sup>. Зависимости между титрами *S. aureus* и показателем SCC мы не выявили.

Исследование выделенных из молока штаммов *S. aureus* подтвердило их видовую принадлежность. При высеве чистых культур на Azide Blood Agar четко визуализировались обширные зоны гемолиза вокруг изолированных типичных колоний микроорганизма за счет действия вырабатываемого ими гемотоксина с явно выраженным гемолитическим действием. Изоляты *S. aureus* обладали лецитиназной активностью, продуцировали фермент коагулазу, которая, связываясь с протромбином, превращает фибриноген в фибрин, вследствие чего образуется сгусток, и ферментировали углеводы (сахарозу, лактозу, трегалозу, мальтозу) с выделением кислоты без газа, а также маннит в аэробных и анаэробных условиях.

Определение диаметра зон задержки роста показало, что 97,5 % полученных изолятов *S. aureus* устойчивы к линкомицину, 59,5 % — к эритромицину, 50,6 % — к фузидину. Часть штаммов, которые можно было отнести к классу MRSA, оказались устойчивыми к оксациллину (1,3 %).

### 3. Распределение изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока коров, по чувствительности (устойчивости) к противомикробным препаратам (Московская обл., 2015 год)

Противомикробный препарат, доза	Распределение изолятов по диаметру (D) зон задержки роста					
	устойчивые		промежуточные		чувствительные	
	D, мм	%	D, мм	%	D, мм	%
Бензилпенициллин, 10 ED	20	12,7	21-28	3,8	29	83,5
Оксациллин, 10 мкг	15	1,3	16-19	0	20	98,7
Гентамицин, 10 мкг	13	3,8		0	14	96,2
Эритромицин, 15 мкг	14	59,5	15-20	32,9	21	7,6
Линкомицин, 15 мкг	19	97,5	20-23	0	24	2,5
Рифампицин, 5 мкг	12	16,5	13-15	2,5	16	81,0
Ципрофлоксацин, 5 мкг	15	11,4	16-20	12,7	21	75,9
Ванкомицин, 30 мкг	11	1,3		0	12	98,7
Фузидин, 10 мкг	16	50,6	17-20	45,6	21	3,8
Новобиоцин, 5 мкг	16	26,6		0	17	73,4

Таким образом, в результате скрининга молочного стада в Центральном регионе России выявлен относительно высокий процент коров, в молоке которых содержались условно патогенные микроорганизмы — гемолитические стрептококки и золотистые стафилококки (*Staphylococcus aureus*). Обнаружено более высокое среднее число соматических клеток (SCC) в молоке коров при наличии *S. aureus*, однако корреляционный анализ не выявил зависимости между значениями показателя SCC и титрами этого микроорганизма. Сравнение антибиотикочувствительности показало, что более 95 % штаммов *S. aureus* были резистентны к линкомицину, более 50 % — к эритромицину и фузидину. Выделены штаммы, устойчивые к оксациллину, можно отнести к MRSA (methicillin-resistant staphylococcus), поэтому требуется дальнейшее изучение их генетической структуры с применением молекулярных методов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Barkema H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N. The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis (invited review). J. Dairy Sci., 2006, 89(6): 1877-1895 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1).
2. Halasa T., Huijps K., Osteras O., Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet. Q., 2007, 29: 18-31 (doi: 10.1080/01652176.2007.9695224).

3. Consumption of meat, milk and egg. Livestock Sector brief, Food and Agricultural Organization, Ethiopia. FAO, 2004: 10-12 ([http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/publications/sector\\_briefs/lb\\_ETH.pdf](http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/publications/sector_briefs/lb_ETH.pdf)).
4. Hogeveen H., Huijps K., Lam T.J. Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 2011, 59: 16-23 (doi: 10.1080/00480169.2011.547165).
5. Программа по борьбе с маститами и улучшению качества молока. Ветеринария Кубани, 2006, 2 ([http://www.kubanvet.ru/2\\_20064.html](http://www.kubanvet.ru/2_20064.html)).
6. Рубанец Л. Еще раз о маститах, их профилактике и лечении. *Белорусское сельское хозяйство*, 2015, 3: 24-27.
7. Рубанец Л. Еще раз о маститах, их профилактике и лечении. *Белорусское сельское хозяйство*, 2015, 4: 42-45.
8. Баймишева Д.Ш., Коростелева Л.А., Кристойть С.В., Котенкин С.В. Видовой состав микрофлоры молочной железы при маститах. *Зоотехния*, 2008, 11: 26-28.
9. Black R.A., Taraba J.L., Day G.B., Damasceno F.A., Newman M.C., Akers K.A., Wood C.L., McQuerry K.J., Bewley J.M. The relationship between compost bedded pack performance, management, and bacterial counts. *J. Dairy Sci.*, 2014, 97(5): 2669-2679 (doi: 10.3168/jds.2013-6779).
10. Botaro B.G., Cortinhas C.S., Dibbern A.G., Prada e Silva L.F., Benites N.R., Veiga dos Santos M. *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and CC of dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 2014, 47(1): 61-66 (doi: 10.1007/s11250-014-0683-5).
11. Piccinini R., Tassi R., Daprai V., Pillai R., Fenner J., Carter B., Anjum M.F. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J. Dairy Res.*, 2012, 79: 249-255 (doi: 10.1017/S002202991200009X).
12. Argudin M.A., Mendoza M.C., Rodicio M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2010, 2: 1751-1773 (doi: 10.3390/toxins2071751).
13. Spaulding A.R., Salgado-Pabyn W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y., Schlievert P.M. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, 26(3): 422-447 (doi: 10.1128/CMR.00104-12).
14. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2014, 17: 32-37 (doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004).
15. Нагорных А.М. Иммуноферментный метод определения стафилококкового энтеротоксина типа С в культурах золотистого стафилококка, выделенного из молока здоровых и больных маститом коров. *Ветеринарная патология*, 2009, 4: 23-27.
16. Сивкин Н.В., Стрекозов Н.И. Оценка количества соматических клеток в молоке коров в период лактации. Молочная промышленность, 2010, 11: 71-72.
17. Butyqi H., Zaugg U., Sherifi K., Hamidi A., Gjonbalaj M., Muji S., Mehmeti H. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw milk in Kosovo. *Veterinarski Archiv*, 2010, 80(2): 173-183.
18. Harmon R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 1994, 77(7): 2103-2112 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8).
19. Филпот В.Н., Никерсон Ш.С. Как победить мастит. М., 2009.
20. Распоряжение (ЕС) № 853/2004 Европейского Парламента и Совета от 29 апреля 2004 года (<http://vetrf.ru/fsvps-docs/ru/laws/eu/853-2004.pdf>).
21. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) (<http://docs.cntd.ru/document/499050562>).
22. Субботин В.В., Данилевская Н.В., Вашурин О.А. Соматические клетки в молоке коров и нормализация их количества на фоне применения пробиотического препарата лактобифадол. *Технология животноводства*, 2009, 9-10 ([http://www.bf-component.ru/library/Somaticheskie\\_kletki.pdf](http://www.bf-component.ru/library/Somaticheskie_kletki.pdf)).
23. Holmes M.A., Zadoks R.N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2011, 16(4): 373-382 (doi: 10.1007/s10911-011-9237-x).
24. Garcia-Alvarez L., Holden M.T., Lindsay H., Webb C.R., Brown D.F., Curran M.D., Walpole E., Brooks K., Pickard D.J., Teale C., Parkhill J., Bentley S.D., Edwards G.F., Girvan E.K., Kearns A.M., Pichon B., Hill R.L., Larsen A.R., Skov R.L., Peacock S.J., Maskell D.J., Holmes M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Inf. Dis.*, 2011, 11(8): 595-603 (doi: 10.1016/S1473-3099(11)70126-8).
25. Shore A.C., Deasy E.C., Slickers P., Brennan G., O'Connell B., Monecke S., Ehrlich R., Coleman D.C. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI encoding highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ* and *ccr* genes in human clinical clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55(8): 3765-3773 (doi: 10.1128/AAC.00187-11).
26. Stegger M., Andersen P.S., Kearns A., Pichon B., Holmes M.A., Edwards G., Laurent F., Teale C., Skov R., Larsen A.R. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring either *mecA* or the new *mecA*

homologue *mecA<sub>LGA251</sub>*. Clin. Microbiol. Infect., 2012, 18(4): 395-400 (doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x).

27. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие /Под ред. А.П. Калашникова, В.И. Фисинина, В.В. Щеглова, Н.И. Клейменова. М., 2003.
28. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004) (<http://docs.cntd.ru/document/1200038583>).
29. Артемьева О.А., Переселкова Д.А., Фомичев Ю.П. Биологически активный препарат как альтернатива использованию антибиотиков против патогенных микроорганизмов. Сельскохозяйственная биология, 2015, 50(4): 513-519 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.513rus, doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.513eng).

ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства  
им. академика Л.К. Эрнста,  
142132 Россия, Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,  
e-mail: [vijmikrob@mail.ru](mailto:vijmikrob@mail.ru)

Поступила в редакцию  
12 сентября 2015 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, V. 50, № 6, pp. 810-816

## SCREENING OF DAIRY COWS' HERD FOR PRESENCE IN MILK OF HEMOLYTIC MICROORGANISMS IN RELATION TO SOMATIC CELL CONTENT

*O.A. Artem'eva, D.A. Pereselkova, I.V. Vinogradova, E.N. Kotkovskaya,  
E.A. Gladyr', N.V. Sivkin, N.A. Zinovieva*

*L.K. Ernst All-Russian Research Institute of Animal Husbandry*, Federal Agency of Scientific Organizations, pos. Dubrovitsy, Podolsk Region, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail [vijmikrob@mail.ru](mailto:vijmikrob@mail.ru)

Acknowledgements:

Supported by Russian Science Foundation, the project № 15-16-00020

Received September 12, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.810eng

### Abstract

Inflammation of mammary glands of cows or mastitis is one of the most common infectious diseases of dairy cattle, which causes significant economic losses to livestock and affects the quality of dairy products. This work was aimed at monitoring the presence of hemolytic streptococci and *Staphylococcus aureus* as the main causative agents of mastitis in the high producing dairy cows and identifying relationship between the milk somatic cell count (SCC) and the infection with *S. aureus*. Whole herd of clinically healthy Holstein cows of the Central region of Russia from first to seventh lactations ( $n = 345$ ) were used for the milk sampling. Depending on the presence of microorganisms in the milk, the cows were distributed between four groups: I — hemolytic streptococci and *S. aureus* are not found; II — only hemolytic streptococci are detected; III — only *S. aureus* are detected; IV — both hemolytic streptococci and *S. aureus* are detected. Determination of antibiotic susceptibility profile of *S. aureus* isolates was carried out on a special medium using disco-diffusion method. Determination of methicillin-resistant staphylococcus (MRSA) was carried out using the MRSA Alert w/swabs test («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd», India). *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used as reference strains. Data processing was performed using MS Excel software. The significance of differences was evaluated by Student's t test. It was found that only 22.0 % of clinically healthy cows did not contain studied forms of microorganisms in their milk, while in 78.0 % of them the presence of hemolytic streptococci and/or *S. aureus* in milk was detected. The rate of *S. aureus* infected animals increased with increasing number of lactations (from 14.7-19.2 % in the first and second lactations to 32.0-45.2 % in animals of the third and more lactations). The higher levels of SCC in the milk of cows in group III with *S. aureus* ( $+1191.1 \times 10^3$ ,  $+1124.3 \times 10^3$  and  $1099.6 \times 10^3$  cells/cm<sup>3</sup> comparing to groups I, II and IV, respectively;  $p < 0.001$ ) was established. The content of *S. aureus* in the milk of cows of groups III and IV varied from  $< 1.0$  to  $7.5$  lg CFU/cm<sup>3</sup>, and from  $1.0$  to  $7.8$  lg CFU/cm<sup>3</sup>, respectively, and averaged  $3.62 \pm 0.36$  and  $3.47 \pm 0.23$  lg CFU/cm<sup>3</sup>, respectively. The associations between titers of *S. aureus* in the milk of cows and SCC were not identified. More than 95 % of *S. aureus* isolates were resistant to lincomycin and more than 50 % were resistant to erythromycin and fuzidin. Above 95 % of isolated *S. aureus* strains were sensitive to oxacillin, gentamicin and vancomycin. Some strains were resistant to oxacillin (1.3 %), so the further study and elucidation of the mechanisms of action using molecular methods are required.

Keywords: high-producing dairy cows, hemolytic microorganisms, *Staphylococcus aureus*, somatic cells, mastitis.