

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПРЕСС-ТЕСТА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ МАСТИТА У КОРОВ

Панова Наталья Александровна, канд.биол.наук, доц., orcid.org/0000-0001-8276-4634,
Васильева Светлана Владимировна, канд.ветеринар.наук, доц., orcid.org/0000-0002-7324-6250
Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

РЕФЕРАТ

В данной статье описываются результаты исследования содержания соматических клеток в молоке с использованием различных методов. С помощью стандартизированного аппаратного метода с применением вискозиметрического прибора «Соматос-В» были тестированы пробы молока, из которых отобрали 3 группы по 20 образцов. Формирование групп было основано на содержании в пробах соматических клеток (до 200; 200-400 и свыше 400 тыс./см³). Дальнейшее исследование было направлено на изучение диагностических свойств нового теста, действие которого основано на подавлении маститным молоком пенообразования. Было проведено исследование всех проб с помощью пенного теста и калифорнийского маститного теста. Выявлено совпадение результатов исследования изучаемых тест-систем с эталонным методом в отношении проб, содержащих малое (до 200 тыс./см³) и повышенное (свыше 400 тыс./см³) количество соматических клеток. В пробах с концентрацией клеток от 200 до 400 тыс./см³ различные результаты при исследовании методами экспресс-тестирования. Пенный тест показал 90%, а калифорнийский тест – 75% совпадение с результатами вискозиметрии. Учитывая сложность в диагностике скрытого мастита, исследуемый в данной работе пенный тест может иметь обнадеживающие перспективы в использовании в хозяйствах для раннего выявления больных коров. Данный метод позволяет более точно, качественно, определить повышение количества соматических клеток в молоке, что важно в диагностике скрытых субклинических маститов и своевременном их лечении.

Ключевые слова: коровы, молоко, молочная железа, мастит, соматические клетки, экспресс-тест, лаурил-сульфат, вискозиметрия, сульфанола.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших микробиологических параметров качества молока является содержание соматических клеток. Данный показатель не только влияет на сортность и цену продукта, но и на его безопасность для употребления.

Соматические клетки имеют различное происхождение, к ним относят эпителий молочной железы, эритроциты, лейкоциты, которые тем или иным образом попадают в молочный секрет. В небольшом количестве они всегда присутствуют в молоке в результате слушивания старых клеток, так как в молочной железе постоянно происходит обновление клеточного состава эпителия, выстилающего протоки и цистерны. Увеличение концентрации соматических клеток в молоке всегда свидетельствует о патологическом процессе в молочной железе [1, 2].

Несоблюдение режима питания может быть причиной недостатка витаминов и питательных веществ, что, в свою очередь, приведет к нарушению функционирования иммунной системы животного, в результате чего возникает риск появления заболеваний. Недостаточная гигиена оборудования, места содержания или вымени также вызывают повышенный риск заражения. Данные факторы могут привести к возникновению мастита – одной из главных причин увеличения количества соматических клеток. В результате развития мастита возникает воспалительный процесс, приводящий к увеличению в молоке лейкоцитов, в первую очередь, нейтрофильных гранулоцитов, в результате чего снижается сортность молока [3].

Большое содержание соматических клеток в

молоке приводит к ряду неблагоприятных последствий. Любые формы мастита неблагоприятно сказываются на физико-химических свойствах и санитарно-гигиенических показателях молока. В первую очередь, снижается качество молока: ухудшаются его органолептические свойства, уменьшается показатель кислотности, отмечается сокращение содержания казеина, жира, лактозы и кальция, а содержание хлоридов, натрия и сывороточных белков возрастает. Молоко содержит повышенное количество бактерий (патогенных стафилококков и стрептококков), соматических клеток, ферментов (каталазы, липазы, фосфатазы и др.) [4]. Меняется жирнокислотный состав триглицеридов и оболочек жировых шариков, уменьшаются размеры мицелл казеина с одновременным повышением в молоке содержания фракции γ -казеина, падает содержание витаминов и т.д. Изменение химического состава молока с примесью маститного вызывает нарушение биохимических и микробиологических процессов при его переработке. Такое молоко менее термостойчиво, плохо свёртывается сычужным ферментом. В нём медленнее развиваются многие производственно-ценные молочнокислые бактерии. Из молока, содержащего повышенное количество соматических клеток, нельзя приготовить сыр, творог, масло и кефир, так как молоко становится менее термостойчивым и хуже свертывается сычужным ферментом [1, 5].

В настоящее время установлено, что при любой форме мастита, ещё до появления клинических симптомов уже происходит изменение качества молока. Характер изменений состава и свойств молока, полученного от коров с клини-

ческой и субклиническими формами мастита, одинаков [2, 3, 6].

Ранняя диагностика мастита является одним из важных факторов эффективности проводимых лечебных и профилактических мероприятий.

На сегодняшний день используются различные методы аппаратной диагностики маститов и экспресс-тесты. Однако не все имеющиеся в арсенале ветеринарных специалистов методики являются стандартизированными. До 2014 золотым стандартом считалось два метода – визуальное определение количества соматических клеток в молоке на основе оценки плотности сгустка и вискозиметрическое исследование молока. В этих способах молоко предварительно смешивается с препаратом «Мастоприм», в первом случае используется его раствор в 2,5%, а во втором – в 3,5% концентрации. В состав данного препарата входит смесь сульфанола и гидроксида натрия. С 2014 года в ГОСТ 2345-14 введены ещё два метода – это метод флуоресцентной микроскопии с помощью анализатора DCC и прямой метод путём микроскопирования [7, 8].

В настоящее время разработаны тест-системы для экспресс-анализа молока, такие как «Соматик-эксперт», «Соматик-плюс», «Кенотест», «Экотест», «Кербатест» и другие, которые основаны на действии входящего в их состав сульфоната, вызывающего лизис соматических клеток и образование гелеобразного сгустка за счёт взаимодействия с нуклеиновыми кислотами этих клеток. Этот метод широко используется ветеринарными специалистами и обозначается, как «Калифорнийский маститный тест». По сути дела, данный тест является модификацией стандартизированного визуального метода определения количества соматических клеток в молоке. Также получены обнадеживающие результаты с использованием кондуктометрического метода, определяющего электропроводность молока [9, 10].

Группой исследователей [11] был разработан

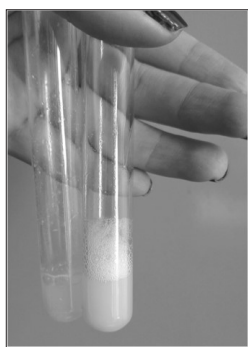


Рисунок 1. Пример отрицательного и положительного результата при проведении пенного теста.

экспресс-тест для ранней диагностики гипогалактии, суть которого заключается в ингибировании пенообразования за счёт влияния биополимеров клеток молозива на раствор поверхностно активного вещества (лаурил-сульфата) в 15-20% концентрации. Поскольку ряд внутриклеточных компонентов, в первую очередь, нуклеиновые кислоты обладают свойством пеногасителей, то была выдвинута гипотеза, что аналогичный пенный тест может быть использован для выявления соматических клеток в молоке.

В задачу наших исследований вошло изучение результатов исследования проб молока с различной концентрацией соматических клеток методом оценки пенообразования в сравнении с калифорнийским маститным тестом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования было отобраны пробы молока, результаты исследования которых на содержание соматических клеток получены с помощью вискозиметрического метода на приборе «Соматос-В». Было сформировано 3 группы по 20 проб с различной концентрацией соматических клеток:

- 1 группа – менее 200 тыс./см³
- 2 группа – от 200 до 400 тыс./см³
- 3 группа – свыше 400 тыс./см³

Все пробы были дополнительно исследованы с помощью пенного теста следующим образом: в пробирку вносили 1 мл молока и добавляли 1 мл 20% раствора лаурил-сульфата, после чего перемешивали путём четырёхкратного переворачивания в течение 5 секунд. Пенообразование оценивали сразу после перемешивания. При образовании столбика пены выше 1 см реакция считалась, как отрицательная (содержание соматических клеток не увеличено), при отсутствии пены или при образовании столбика менее 1 см реакцию считали положительной (соматические клетки выше нормы) (Рис. 1).

Также все пробы молока исследовали с помощью стандартной тест-системы на основе калифорнийского теста с пороговой чувствительностью 200 тыс. клеток в см³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени сходимости с данными, полученными вискозиметрическим методом исследования и с использованием пенного и калифорнийского маститного теста в отношении проб с малой и повышенной концентрацией соматических клеток. В пробах, содержащих пороговое количество соматических клеток – от 200 до 400

Таблица 1.

Результаты сравнительного исследования проб молока с помощью пенного и калифорнийского тестов.

Исследуемые группы	Концентрация соматических клеток, тыс./см ³	Количество положительных результатов	
		Пенный тест	Калифорнийский тест
1 группа	менее 200	0 (0%)	0 (0%)
2 группа	от 200 до 400	18 (90%)	15 (75,0%)
3 группа	свыше 400	20 (100%)	20 (100,0%)

тыс./см³ были выявлены межгрупповые расхождения. Так, при исследовании пенным тестом положительная реакция выявлена в 90% проб, а по результатам калифорнийского теста позитивно отреагировало 75% проб. Необходимо отметить, что из всех применяемых методов только вискозиметрический является аппаратным, то есть в данном случае исключена субъективная составляющая при учёте результатов. Остальные используемые тесты оценивались непосредственно человеком без участия приборов, поэтому нельзя пренебрегать возможными неточностями визуального восприятия полученных результатов. Однако в наших исследованиях именно пенный тест показал наибольшую сходимость результатов при содержании соматических в молоке от 200 до 400 тыс./см³.

Известно, что маститы имеют широкое распространение в животноводческих хозяйствах, болезнь поражает коров практически во всех физиологических группах, и эта проблема не теряет своей актуальности. Большой ущерб наносит субклинический мастит, при котором не происходит видимых изменений в молочной железе, но на этапе его развития изменяются физико-химические свойства молока. Молочная продуктивность при этом снижается, но внешне качество молока вначале не изменяется. Позднее, когда в патологический процесс вовлекаются секреторные отделы железы, молоко становится более жидким и может содержать хлопья. Наряду с местной реакцией у животного могут наблюдаться общее угнетение, уменьшение аппетита, повышение температуры тела. Трудность диагностики этой формы мастита приводит к промедлению в лечебных мероприятиях, и как следствие, к экономическим потерям в хозяйстве. Известно, что при отсутствии мастита в молоке содержится до 400 тыс./см³ соматических клеток, однако результаты тыс./см³ может свидетельствовать о скрытом мастите [2, 3]. Развитие клинической формы болезни приводит к значительному увеличению соматических клеток 500 тыс./см³ и более. В то же время согласно техническому регламенту ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [8] допускается содержание в сыром молоке до 750 тыс./см³ соматических клеток, но это не означает, что такое число клеток допустимо для здоровых коров. Весьма уязвимым является пороговый диапазон содержания соматических клеток, особенно на фоне отсутствия видимых признаков мастита. Именно для выявления таких коров важно использовать надёжный диагностикум.

Опробованный нами пенный тест превзошел по точности экспресс-тесты, используемые в настоящее время. Реакции с димасином и мастидином, являющиеся наиболее широко используемыми для диагностики маститов на ранних сроках, основаны на изменении вязкости молока под влиянием препарата за счёт взаимодействия с внутриклеточными биополимерами соматических клеток. Однако при постановке этой реакции было отмечено, что интенсивное желеобразование наблюдается в щелочной среде, тогда

как в кислой среде образование сгустка может не наблюдаться. Этим объясняется тот факт, что иногда при клиническом мастите реакция секрета с димасином или мастидином бывает отрицательной, так как в некоторых случаях значение рН молока при мастите бывает меньше 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведённых исследованиях обнаружено, что при смешивании 20% раствора лаурил-сульфата с молоком, содержащим более 200 тыс./см³ соматических клеток существенно снижается пенообразование смеси за счёт присутствия биополимеров клеток, обладающих пеногасящими свойствами.

Повышение концентрации соматических клеток в молоке приводит к тому, что полученная смесь даёт слабую, не выраженную пену, молоко от коров с низким содержанием соматических клеток даёт обильную, крепкую, густую пену. Данный способ является простым и информативным при выявлении повышенного содержания соматических клеток как в условиях молочно-товарного хозяйства, так и при применении в качестве экспресс-диагностикума для заводов-переработчиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скопичев, В. Г. Иммунобиология молочной железы и молочная продуктивность / В. Г. Скопичев, В. Б. Прозоровский. – Beau Bassin: Lap LAMBERT Academic Publishing, 2018. – 328 с.
2. Скопичев, В. Г. Молоко: учеб. пособие / В. Г. Скопичев, Н. Н. Максимюк. – Санкт-Петербург: Проспект Науки, 2011. – 368 с.
3. Свириденко, Г.М. Маститы крупного рогатого скота / Г.М. Свириденко, Е.Г. Семенова // Молочная промышленность. - 2003. - № 10. – С. 37-42.
4. Самбуров, Н.В. Повышение биологических свойств молозива / Н.В. Самбуров // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2008. - № 2. - С. 28-29.
5. Matricardi P. M., Bockelbrink A., Beyer K., Keil T., Niggemann B., Gruber C., Wahn U., Lau S. Primary versus secondary immunoglobulin E sensitization to soy and wheat in the Multi-Centre Allergy Study cohort // Clin Exp Allergy. 2008; 38: P. 493–500.
6. Miyazawa T., Itahashi K., Imai T. Management of neonatal cow's milk allergy in high-risk neonates // Pediatr Int. 2009; 51: P.544–547.
7. Межгосударственный стандарт. ГОСТ 23453-14. Молоко сырое. Методы определения соматических клеток. Стандартиформ. - М. - 2015. - 16 с.
8. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 "О безопасности молока и молочной продукции" // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов [Электронный ресурс] -URL:<https://docs.cntd.ru/document/499050562?marker=1V9E9JF&ion=text> - (Дата обращения 15.11.2022).
9. Особенности прибора ИКМ-3 и результаты экспресс-диагностики аномального молока коров / Е. В. Козеев, С. Ю. Терлеев, Н. А. Шкиль [и др.] // Научно-технический прогресс в сельскохозяйственном производстве. Аграрная наука - сельскохозяйственному производству Сибири, Казахстана, Монголии, Беларуси и Болгарии :

Материалы Международной научно-технической конференции. В 2 томах, Минск, 19–21 октября 2016 года. – Минск: Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по механизации сельского хозяйства», 2016. – С. 64–69. – EDN YNSAGD.

10. Шабшаевич, М. Л. Определение содержания соматических клеток в молоке-сырье / М. Л. Шабшаевич, В. П. Шидловская // Молочная промышленность. – 2007. – № 2. – С. 30–32. – EDN HYLTTJ.

11. Патент № 2444999 C1 Российская Федерация, МПК A61B 10/00. Способ диагностики ранней ги-

погалактии: № 2010126244/14 : заявл. 25.06.2010; опубл. 20.03.2012 / В. Г. Скопичев, А. В. Щеголькова, М. А. Кучеренко; заявитель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта Северо-Западного отделения РАМН. – EDN VWXWPT.

ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF A RAPID TEST FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF MASTITIS IN COWS

Natalia A. Panova, Ph.D. of Biological Sciences, Docent, orcid.org/0000-0001-8276-4634
Svetlana V. Vasilyeva, Ph.D. of Veterinary Sciences, Docent, orcid.org/0000-0002-7324-6250
St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia

This article describes the results of a study of the content of somatic cells in milk using various methods. Milk samples were tested using a standardized apparatus method using a Somatos-V viscometer, from which 3 groups of 20 samples were selected. The formation of groups was based on the content of somatic cells in the samples (up to 200; 200–400 and over 400 thousand/cm³). Further research was aimed at studying the diagnostic properties of the new test, the action of which is based on the suppression of foaming by mastitis milk. All samples were tested using the foam test and the California mastitis test. The coincidence of the results of the study of the studied test systems with the reference method was revealed in relation to samples containing a small (up to 200 thousand/cm³) and an increased (over 400 thousand/cm³) number of somatic cells. In samples with a cell concentration from 200 to 400 thousand/cm³, there are different results in the study by express testing methods. The foam test showed 90% and the California test showed 75% agreement with the results of viscometry. Given the difficulty in diagnosing latent mastitis, the foam test studied in this work may have promising prospects for use on farms for the early detection of sick cows. This method allows more accurately, qualitatively, to determine the increase in the number of somatic cells in milk, which is important in the diagnosis of latent subclinical mastitis and their timely treatment.

Key words: cows, milk, mammary gland, mastitis, somatic cells, rapid test, lauryl sulfate, viscometry, sulfanol.

REFERENCES

1. Skopichev, V. G. Immunobiology of the mammary gland and milk productivity / V. G. Skopichev, V. B. Prozorovsky. - Beau Bassin: Lap LAMBERT Academic Publishing, 2018. - 328 p.
2. Skopichev, V. G. Milk: textbook. allowance / V. G. Skopichev, N. N. Maksimiyuk. - St. Petersburg: Prospekt Nauki, 2011. - 368 p.
3. Sviridenko, G.M. Mastitis in cattle / G.M. Sviridenko, E.G. Semenova // Dairy industry. - 2003. - No. 10. - S. 37–42.
4. Samburov, N.V. Improving the biological properties of colostrum / N.V. Samburov // Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy. - 2008. - No. 2. - P. 28–29.
5. Matricardi P. M., Bockelbrink A., Beyer K., Keil T., Niggemann B., Gruber C., Wahn U., Lau S. Primary versus secondary immunoglobulin E sensitization to soy and wheat in the Multi-Centre Allergy Study cohort // Clin Exp Allergy. 2008; 38: R. 493–500.
6. Miyazawa T., Itahashi K., Imai T. Management of neonatal cow's milk allergy in high-risk neonates // Pediatr Int. 2009; 51: R.544–547.
7. Interstate standard. GOST 23453-14. Raw milk. Methods for determining somatic cells. Standartinform. - M. - 2015. - 16 p.
8. Technical regulation of the Customs Union TR CU 033/2013 "On the safety of milk and dairy products" // Electronic fund of legal and regulatory documents [Electronic resource] - URL: <https://docs.cntd.ru/>

document/499050562? marker= 1V9E9JF&ion=text - (Accessed 11/15/2022).

9. Kozeev E. V., Terleev S. Yu., Shkil N. A. [et al.] Peculiarities of the IKM-3 device and results of express diagnostics of abnormal cow milk // Scientific and technical progress in agricultural production. Agrarian science - agricultural production in Siberia, Kazakhstan, Mongolia, Belarus and Bulgaria: Proceedings of the International Scientific and Technical Conference. In 2 volumes, Minsk, October 19–21, 2016. - Minsk: Republican Unitary Enterprise "Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Agricultural Mechanization", 2016. - P. 64–69. – EDN YNSAGD.
10. Shabshaevich, M. L. Determination of the content of somatic cells in raw milk / M. L. Shabshaevich, V. P. Shidlovskaya // Dairy industry. - 2007. - No. 2. - S. 30–32. – EDN HYLTTJ.
11. Patent No. 2444999 C1 Russian Federation, IPC A61B 10/00. Method for diagnosing early hypogalactia: No. 2010126244/14: Appl. 06/25/2010; publ. March 20, 2012 / V. G. Skopichev, A. V. Shchegolkova, M. A. Kucherenko; applicant State educational institution of higher professional education "St. Petersburg State Medical University named after academician I.P. Pavlov" of the Federal Agency for Health and Social Development, Institution of the Russian Academy of Medical Sciences Research Institute of Obstetrics and Gynecology named after BEFORE. Ott of the North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences. – EDN VWXWPT.