

Rodzaje drobnoustrojów wyizolowanych z mleka krowiego wykazującego podwyższoną liczbę komórek somatycznych

Danuta Borkowska, Ewa Januś

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk Rolniczych w Zamościu,
ul. Szczepińska 102, 22-400 Zamość

W badaniach dokonano identyfikacji patogenów wyizolowanych z wydzieliny gruczołów mlekowych krów oraz określono wpływ wybranych czynników na częstotliwość występowania poszczególnych rodzajów drobnoustrojów. Od krów, utrzymywanych w pięciu oborach i wykazujących w mleku z próbnych udojów podwyższoną liczbę komórek somatycznych, pobrano 126 próbek mleka ćwiartkowego do badań mikrobiologicznych. Zidentyfikowano w nich 10 różnych grup lub gatunków drobnoustrojów. Najczęściej występującymi patogenami były gronkowce koagulazo-ujemne (CNS), *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* oraz *Streptococcus agalactiae*. Nie stwierdzono zależności pomiędzy wynikami testu TOK, a występowaniem poszczególnych grup lub gatunków drobnoustrojów w mleku. Wykazano natomiast istotny – przy $P \leq 0,01$ związek pomiędzy miejscem użytkowania krów a częstotliwością izolowania patogenów w mleku ćwiartkowym.

SŁOWA KLUCZOWE: drobnoustroje / liczba komórek somatycznych / mleko

Choroby wymion u krów są poważnym problemem natury ekonomicznej i sanitarnej. Zapalenie gruczołu mlekowego jest najczęstszą i najbardziej kosztowną chorobą – w Polsce zapada na nią od 30 do 80% krów [6]. Choroba ta powstaje głównie na skutek bakteryjnego zaatakowania gruczołu mlekowego. Oprócz bakterii czynnikiem etiologicznym mogą być również grzyby, riketsje, wirusy, pasożytnicze pierwotniaki oraz algi [6, 9]. Infekujące drobnoustroje dostają się do gruczołu mlekowego przez kanał strzykowy i namnażają się w strzyku i dolnej partii wymienia [8]. Objawy obejmują zwiększenie aktywności enzymów pochodzenia komórkowego, co ma związek z uszkodzeniem nabłonka wydzielniczego i dróg wyprowadzających oraz naciekiem komórkowym, towarzyszącym zapaleniu [6]. Obecne w wymieniu drobnoustroje przyczyniają się do szeregu zmian w składzie mleka, a tym samym obniżają jego przydatność w przetwórstwie [5].

Celem badań była identyfikacja patogenów, wyizolowanych z wydzieliny gruczołów mlekowych krów oraz określenie wpływu wybranych czynników na częstotliwość występowania poszczególnych rodzajów drobnoustrojów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w pięciu gospodarstwach o łącznej liczbie krów wynoszącej 485 sztuk. Przeciętna wydajność, w objętych analizą stadach, wahała się od 5300 do 6700 kg mleka od krowy rocznie. Ogółem przebadano 126 próbek mleka ćwiartkowego. Do badań typowano krowy wykazujące w próbnych udojach podwyższoną liczbę komórek somatycznych. Dodatkowym czynnikiem, decydującym o wytypowaniu ćwiartki gruczołu mlekowego do badań, był wynik testu TOK przeprowadzony bezpośrednio przed pobraniem próbki. Mleko z oczyszczonych i zdezynfekowanych strzyków pobierano bezpośrednio do wyjałowionych probówek, które po zabezpieczeniu i schłodzeniu transportowano do laboratorium.

W laboratorium, za pomocą sterylnej ezy mleko przenoszono na podłoże namnażające, jakim był agar z krwią. Do identyfikacji drożdży użyto podłoża różnicowego Sabourauda. Po 24 godzinach inkubacji w temp. 37°C drobnoustroje identyfikowano [9]. Ocenę zależności pomiędzy wynikami testu TOK oraz gospodarstwem, a rodzajem najczęściej izolowanych drobnoustrojów przeprowadzono przy użyciu testu χ^2 .

Wyniki i dyskusja

Ze 126 próbek mleka ćwiartkowego wyizolowano i zidentyfikowano ogółem 10 grup lub gatunków drobnoustrojów (tab. 1). W większości przypadków (119 próbek – 94,4%) stwierdzono tylko jeden rodzaj patogenów, w pozostałych 7 próbkach liczba grup lub gatunków patogenów wynosiła dwa (5 prób – 4%) lub więcej. Z pobranych próbek najczęściej izolowano gronkowce koagulazo-ujemne (CNS). Stwierdzono je w 45 próbach (35,7%), przy czym w 37 próbkach były jedynym czynnikiem etiologicznym, a w 2 występowały jako mikroorganizmy współtowarzyszące *Streptococcus spp.*. Inne badania Borkowskiej i wsp. [2] wskazują, że pojedyncze drobnoustroje w mleku ćwiartkowym występowały w 48% prób. Próbki z trzema lub więcej wyizolowanymi gatunkami stanowiły aż 21,7%.

Haas i wsp. [4] podają, że wśród patogenów wyizolowanych z mleka mastitowego najczęściej występowały *Staphylococcus aureus*, CNS, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*. W badaniach Wilsona i wsp. [12] przeszło 75% infekcji było wywołanych przez *Streptococcus agalactiae*, paciorkowce (*Streptococcus spp.*) inne niż *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* i paciorkowce koagulazo-ujemne. Według Malinowskiego i wsp. [10] w ostatnich latach zaznaczył się wyraźny spadek udziału *Streptococcus agalactiae*, przy wzrastającej roli paciorkowców środowiskowych (głównie *Streptococcus uberis*), gronkowca złocistego i gronkowców koagulazo-ujemnych.

Tabela 1 – Table 1

Grupy lub gatunki drobnoustrojów wyizolowanych z próbek mleka ćwiartkowego i częstotliwość ich występowania
Groups or species of microorganisms isolated from the quarter milk and frequency of their occurrence

Grupa lub gatunek drobnoustrojów Group or species of microorganisms	Liczba próbek Number of samples	Udział próbek Share of samples (%)
CNS (gronkowce koagulazo-ujemne) CNS (coagulase negative staphylococci)	45	35,7
<i>Streptococcus spp.</i>	37	29,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	13,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12	9,5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	11	8,7
<i>Candida albicans</i>	4	3,2
<i>Pseudomonas spp.</i>	1	0,8
<i>Klebsiella spp.</i>	1	0,8
<i>Escherichia coli</i>	1	0,8
<i>Streptococcus uberis</i>	1	0,8
Próbki ogółem – Total number of samples	126	100,0
Próbki z 1 wyizolowaną grupą lub gatunkiem Samples with 1 isolated group or species	119	94,4
Próbki z 2 wyizolowanymi grupami lub gatunkami Samples with 2 isolated groups or species	5	4,0
Próbki z 3 i więcej wyizolowanymi grupami lub gatunkami Samples with 3 or more isolated groups or species	2	1,6
Ogółem – Total	126	100,0

Drugą, pod względem częstotliwości występowania, wyizolowaną grupą drobnoustrojów były paciorkowce (*Streptococcus spp.*). Zidentyfikowano je w 37 próbkach (29,4%). Występowały one pojedynczo (35 próbek) lub jako towarzyszące CNS i *Staphylococcus aureus*. Patogeny, takie jak *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, występowały z częstotliwością 13,5-9,5% (17-12 próbek). *Streptococcus dysgalactiae* zidentyfikowano w 11 próbkach (8,7%). Do rzadko występujących drobnoustrojów należały drożdże (3,2%) oraz *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* (po 0,8%). W próbkach z dwoma wyizolowanymi gatunkami wystąpiły: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* oraz drożdże.

Z badań Krukowskiego [6] oraz Krukowskiego i wsp. [7] wynika, że CNS były najczęściej izolowanymi drobnoustrojami. Często występowały *Staphylococcus aureus* (16,6-20,8%) i *Streptococcus agalactiae* (16,6-20,0%), a rzadko *Streptococcus uberis* oraz *Escherichia coli*. W badaniach Malinowskiego i wsp. [11], przeprowadzonych w 20 gospodarstwach, wykazano występowanie: *Streptococcus agalactiae* (17,8%), *Staphylococcus aureus* (12,2%) i *Streptococcus dysgalactiae* (8,5%), jako patogenów wpływających w znacznym stopniu na zapalenie gruczołu mlecznego. Nielicznie izolowane były grzyby (0,8%) i *Escherichia coli* (1,2%). Z innych badań [2] przeprowadzonych

w 48 oborach Zamojszczyzny wynika, że najczęściej identyfikowano: *Streptococcus agalactiae* (84,8%), *Staphylococcus aureus* (51%), *Candida albicans* (14,1%).

Badania Fandrejewskiej [3] wykazały istotną zależność pomiędzy liczbą komórek somatycznych w mleku a rodzajem zakażenia bakteryjnego. W próbkach mleka, z których izolowano *Staphylococcus aureus* średnia LKS była najniższa i wynosiła 347 tys./ml. Najwięcej (2182 tys./ml) komórek somatycznych zawierało mleko skażone przez paciorkowce (*Streptococcus spp.*). Barkema i wsp. [1] stwierdzili, że zakażenia wymion powodowane przez gram-ujemne drobnoustroje, takie jak: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.* występowały częściej w stadach z niską liczbą komórek somatycznych w mleku zbiorczym.

Staphylococcus aureus, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus agalactiae* były częściej przyczyną mastitis w tych gospodarstwach, w których w mleku zbiorczym stwierdzano wysoką LKS. Z danych tabeli 2 wynika, że w próbkach z wynikiem testu TOK wskazującym na chroniczne zapalenie wymienia (+), z jego wydzieliny izolowano CNS (50%), *Streptococcus dysgalactiae* (25%) i *Staphylococcus aureus* (25,0%). Przy wynikach dodatnich (++) z próbek najczęściej izolowano CNS (40,4%) i *Streptococcus spp.* (25,0%). *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Streptococcus dysgalactiae* występowały z podobną częstotliwością (od 7,7% do 11,6%). Przy wynikach silnie dodatnich (+++) najczęściej identyfikowano *Streptococcus spp.* (32,3%), CNS (29,2%) oraz *Staphylococcus aureus* (15,4%). *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus agalactiae* obserwowano w takiej samej ilości próbek (7,7%). W próbkach wskazujących na najwyższą liczbę komórek (++++) stwierdzano przede wszystkim *Streptococcus spp.* (3 próbki – 60%). Zależność pomiędzy wynikami testu TOK, przeprowadzanego przed pobraniem próbki do analizy mikrobiologicznej, a występowaniem poszczególnych drobnoustrojów w mleku nie została jednak potwierdzona statystycznie. Wyliczona wartość testu χ^2 wynosiła tylko 17,43 i była nieistotna.

Częstotliwość występowania izolowanych z mleka patogenów zależała w dużym stopniu od gospodarstwa, w których utrzymywano objęte badaniami zwierzęta (tab. 3). Na zależność tę wskazuje wynik testu χ^2 , którego wartość wynosiła 51,93 (istotna przy $P \leq 0,01$). *Streptococcus spp.* i CNS wyizolowano z mleka krów utrzymywanych we wszystkich stadach. Częstotliwość ich występowania była zróżnicowana w zależności od obory, z której pochodziły objęte badaniami krowy. Próby z CNS występowały z częstotliwością: 18,2% (gospodarstwo 4), 26,9% (gospodarstwo 3), 41,1% (gospodarstwo 2), 45,4% (gospodarstwo 1), 56,2% (gospodarstwo 5). Paciorkowce (*Streptococcus spp.*) były najczęściej (22 przypadki – 50,0%) powodem mastitis w gospodarstwie 4., a najrzadziej (2 próby – 6,3%) w 5. W pozostałych gospodarstwach udział próbek ze *Streptococcus spp.* wynosił: 19,3% (3), 27,3% (1) i 29,4% (2).

Występowanie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus agalactiae* stwierdzono w 4 stadach. *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* nie występowały w próbkach pobieranych w gospodarstwie 1. Pierwszy z patogenów, w próbach z pozostałych gospodarstw, występował z częstotliwością od 2,3% (gospodarstwo 4) do 23,1% (gospodarstwo 3). Paciorkowiec bezmleczności (*Streptococcus agalactiae*) stwierdzony został w jednej próbce (3,8%) w stadzie 3. i w siedmiu próbkach

Tabela 2 – Table 2

Częstość występowania drobnoustrojów wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołów mlekowych krów przy różnych wynikach testu TOK
 Frequency of the occurrence of microorganisms isolated from inflammatory excretion of mammary glands of cows with different results of CMT

Grupa lub gatunek drobnoustrojów Group or species of microorganisms	Wynik testu TOK – CMT result									
	"+"		"++"		"+++"		"++++"		Ogółem Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Streptococcus spp.</i>	–	–	13	25,0	21	32,3	3	60,0	37	28,5
CNS	4	50,0	21	40,4	19	29,2	1	20,0	45	34,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	25,0	5	9,6	10	15,4	–	–	17	13,1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	–	–	4	7,7	5	7,7	–	–	11	8,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	–	6	11,6	5	7,7	1	20,0	12	9,2
Pozostałe – Remained	–	–	3	5,7	5	7,7	–	–	8	6,1
Łącznie – Total	8	100,0	52	100,0	65	100,0	5	100,0	130	100,0

$\chi^2=17,43$ (wartość testu statystycznie nieistotna – test value statistically insignificant)

Tabela 3 – Table 3

Drobnoustroje wyizolowane z wydzieliny zapalnej gruczołów mlekowych krów utrzymywanych w analizowanych gospodarstwach
 Microorganisms isolated from inflammatory excretion of mammary glands of cows maintained in analyzed farms

Grupa lub gatunek drobnoustrojów Group or species of microorganisms	Numer gospodarstwa – Farm number																
	1			2			3			4			5			Ogółem Total	
	n	%	%	n	%	%	n	%	%	n	%	%	n	%	%	n	%
<i>Streptococcus spp.</i>	3	27,3	–	5	29,4	–	5	19,3	–	22	50,0	–	2	6,3	–	37	28,5
CNS	5	45,4	–	7	41,1	–	7	26,9	–	8	18,2	–	18	56,2	–	45	34,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	2	11,8	–	6	23,1	–	1	2,3	–	8	25,0	–	17	13,1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	9,1	–	–	–	–	6	23,1	–	2	4,5	–	2	6,3	–	11	8,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	–	–	2	11,8	–	1	3,8	–	7	15,9	–	2	6,2	–	12	9,2
Pozostałe – Remained	2	18,2	–	1	5,9	–	1	3,8	–	4	9,1	–	–	–	–	8	6,1
Łącznie – Total	11	100,0	–	17	100,0	–	26	100,0	–	44	100,0	–	32	100,0	–	130	100,0

$\chi^2=51,93$ (wartość testu statystycznie istotna przy $P<0,01$ – test value statistically significant at $P<0,01$)

(15,9%) w stadzie 4. *Streptococcus dysgalactiae* nie występował w próbkach pobranych w oborze 2., a w pozostałych udział tego patogenu wynosił 9,1% (1), 23,1% (3), 4,5% (4) i 6,3% (5). Przedstawione wyniki sugerują, że w poszczególnych oborach mogą bytować specyficzne grupy i gatunki drobnoustrojów, które mają zasadniczy wpływ na występowanie chorób wymion. Na mikroorganizmy środowiskowe, jako podstawowy czynnik etiologiczny mastitis, wskazuje Krukowski [6].

Podsumowując można stwierdzić, że w objętych badaniami stadach z mleka ćwiartkowego izolowano głównie pojedyncze gatunki lub grupy drobnoustrojów. Były to najczęściej gronkowce koagulazo-ujemne (35,7%), *Streptococcus spp.* (29,4%), *Staphylococcus aureus* (13,5%), *Streptococcus agalactiae* (9,5%) oraz *Streptococcus dysgalactiae* (8,7%). Nie stwierdzono zależności pomiędzy wynikami testu TOK a występowaniem w mleku poszczególnych grup lub gatunków drobnoustrojów. Wykazano istotny (przy $P < 0,01$) związek pomiędzy miejscem użytkowania krów a częstotliwością izolowania patogenów w mleku ćwiartkowym.

PIŚMIENNICTWO

1. BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H., LAM T.J.G.M., BEIBOER M.L., WILMINK H., BENEDICTUS G., BRAND A., 1997 – Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* 81, 411-419.
2. BORKOWSKA D., POLSKI R., JANUŚ E., 2006 – Drobnoustroje wyizolowane z mleka ćwiartkowego krów i ich wrażliwość na antybiotyki. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*, EE, XXIV, 4, 27-32.
3. FANDREJEWSKA M., 1993 – Somatic cell count in quarter foremilk of cows from small herds with high level of subclinical mastitis. *Journal of Animal and Feed Sciences* 2, No 1/2, 15-26.
4. HAAS Y., VEERKAMP R.F., BARKEMA H.W., GRÖHN Y.T., SCHUKKEN Y.H., 2004 – Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *Journal of Dairy Science* 87, 95-105.
5. KROLL J., SURAZYŃSKI A., NOWAK H., 1996 – Stany zapalne wymienia krów – wpływ na jakość i przydatność technologiczną mleka. *Przegląd Mleczarski* 12, 369-370.
6. KRUKOWSKI H., 2003 – Występowanie zapaleń wywołanych przez drobnoustroje środowiskowe u krów holsztyńsko-fryzyjskich i ich mieszańców. *Rozprawy Naukowe* 268, AR Lublin.
7. KRUKOWSKI H., MAJEWSKI T., POPIOŁEK M., 1998 – Zmiany w poziomie IgG w stanach zapalnych gruczołu mlekowego krów. *Medycyna Weterynaryjna* 54 (11), 770-771.
8. MALINOWSKI E., 2000 – Znaczenie dezynfekcji wymienia i rodzaje środków. *Medycyna Weterynaryjna* 59 (3), 230-235.
9. MALINOWSKI E., KŁOSSOWSKA A., 2002 – Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. PIW, Puławy.
10. MALINOWSKI E., KŁOSSOWSKA A., KACZMAROWSKI M., KOTOWSKI K., NADOLNY M., KUŹMA K., 2003 – Stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów i czynniki etiologiczne mastitis w przypadkach wysokiej liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym. *Medycyna Weterynaryjna* 59 (2), 128-132.
11. MALINOWSKI E., KŁOSSOWSKA A., KRUKOWSKI H., LESIAK M., JANIK K., 1992 – Zdrowotność wymion krów i czynniki etiologiczne mastitis w gospodarstwach położonych w różnych rejonach kraju. *Medycyna Weterynaryjna* 48 (5), 216-218.

12. WILSON D.J., GONZALES R.N., DAS H.H., 1997 – Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effect on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science* 80, 2592-2598.

Danuta Borkowska, Ewa Januś

Types of microorganisms isolated from milk of cows showing elevated somatic cell count

S u m m a r y

The aim of the investigations was to identify pathogens isolated from the excretions of cow mammary glands and to estimate the influence of selected factors on the occurrence frequency of microorganisms in particular types. The examined milk originated from cows maintained in 5 barns, showing increased somatic cell counts at experimental milking. Quarter milk samples (n=126) were submitted to microbiological test and 10 different groups or species of microorganisms were isolated. The most frequently coagulase negative staphylococci (CNS), *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* were identified. No relationship between the results of CMT and the frequency of particular microorganisms occurrence in milk was found. However highly significant at $P \leq 0.01$ relationship occurred between isolation frequency of pathogens in quarter milk and the byre where cows were maintained.

