

## UDARAHAIGUSTE DIAGNOOSIMINE PATHOPROOF MASTITIS PCR MEETODIL



Piret Kalmus  
Teraapia osakond  
Eesti Maaülikool

2010. a märtsikuu infolehes tutvustasime erinevaid udarahaigusi põhjustavaid mikroobe, nende põhiomadusi ja lehma nakatumise võimalusi. Käesolev artikkel käsitleb erinevate piimaproovide uurimist haigustekitajate suhtes ja laborivastuste analüüsi farmis. Täna artikli lugemisel on kasulik paralleelselt kasutada märtsis ilmunud infolehte „Udarahaigusi põhjustavad mikroobid“.

Karjas levivate haigustekitajate teadmine annab võimaluse sisse viia süsteempärane mastiiditõrje skeem. Laboriuuringud on alati kallid, mistõttu tuleb enne uuringute alustamist püstitada enda jaoks küsimus, millele loodetakse vastust saada. Seejärel saab koguda õiged proovid, mis annavad usaldusväärse tulemuse.

Piima uuritakse haigustekitajate esinemisele mitme uurimismeetodi abil. Klassikaliseks meetodiks loetakse piimaproovide bakterioloogilist uurimist, kus laboratooriumis isoleeritakse piimas olevad haigustekitajad ja hinnatakse nende tundlikkust antibiootikumide suhtes. Piimaproovid peavad olema võetud steriilselt, sest saastunud proovidest ei ole võimalik õiget haigustekitajat määrata.

Tänapäeval on paljude haiguste diagnoosimiseks kasutusel väga täpne ja kiire meetod PCR ehk polümeraas ahelreaktsioon. Selle meetodiga ei määrata mitte proovis olevaid elusaid baktereid, vaid bakteritest pärit pärilikkuseainet DNA-d. Pärast meid huvitava bakteri DNA tuvastamist hinnatakse, kui suures koguses antud mikroobi DNA-d piimaproovis esineb. Maailmas alustati udarahaigusi põhjustavate bakterite määramist PCR-metoodikal põhinevate kommertsiaalsete testidega 2008. a. Jõudluskontrolli Keskus pakub seda teenust alates 2010. a aprillist (PathoProof Mastitis PCR Assay, Finnzymes Oy, [www.finnzymes.fi](http://www.finnzymes.fi)).

Kuna PCR meetodika on väga tundlik (leiab üles väiksemagi piimas oleva haigustekitaja DNA sisalduse), siis laborianalüüsi tõlgendamine vajab eelnevaid teadmisi udarahaigusi põhjustavatest mikroobidest, karja ja uuritava lehma udaraterwise seisundist (somaatiliste rakkude arv) ning proovide võtmise mõjust analüüsi tulemusele.

PathoProof Mastitis PCR teeb kindlaks teha 11 peamist udarapõletikku põhjustavat mikroobi:

1. *Staphylococcus aureus*
2. Koagulaasnegatiivsed stafülokokid (*Staph.sp*)
3. *Streptococcus agalactiae*
4. *Streptococcus dysgalactiae*
5. *Streptococcus uberis*
6. *Escherichia coli*
7. *Corynebacterium bovis*
8. Enterokokid (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*)
9. *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*
10. *Serratia marcescens*
11. *Arcanobacterium pyogenes*, *Peptostreptococcus indolicus*

Kui uuritavas piimaproovis olevad stafülokokid on penitsilliini suhtes resistentsed, sisaldab proovivastus sõna: “beetalaktamaaspositiivne”.

PCR uuringu käigus tuvastatud haigustekitajate sisaldust kirjeldatakse proovivastuses alljärgnevalt:

- + vähene sisaldus
- ++ keskmine sisaldus
- +++ suur sisaldus.



Maaelu Arengu Euroopa  
Põllumajandusfond:  
Euroopa investeeringud  
maapiirkondadesse

Käesolevas artiklis on näidetena kasutatud Eesti erinevate karjade piimaproove, mida uuriti JKK laboratooriumis.

**Näide 1.** Lehma **udaraveerandist** võetud proovis on kõige rohkem *S.aureus* baktereid, enterokokkide ja *C.bovis* sisaldus on väike.

Laborivastuse tõlgendus: lehma **udaraveerand** on nakatunud *S.aureus* bakteritega.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>Staph. aureus</i>	+++	
<i>Enterococcus sp. (sh. faecalis and faecium)</i>	+	
<i>C.bovis</i>	+	

Laborianalüüsi vastuses kajastub, kui mõni udarapõletikku põhjustav mikroorganism moodustab kõigist proovis leiduvatest bakteritest osa, mis on suurem kui 90% või 99%.

**Näide 2.** Selles **lehma üldpiimast** võetud proovis on *Str.agalactiae* osakaal kõikidest leitud mikroobidest üle 90%. Lehma SRA jõudluskontrolli analüüsis oli 5 670 000/ml.

Laborivastuse tõlgendus: varjatud udarapõletikku põdeva lehma **vähemalt** üks udaraveerand on nakatunud *Str.agalactiae* bakteritega.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>Str.agalactiae</i>	++	>90%
<i>Str.uberis</i>	+	
<i>A.pyogenes and P.indolicus</i>	+	

Kliinilise udarapõletiku uurimisel leitakse haigestunud udaraveerandist tavaliselt üks bakter, kes „vastutab“ tekkinud põletiku eest. Varjatud udarapõletikku põdeva lehma udaraveerandi piimas, milles SRA on tõusnud, on peamiselt üks haigust põhjustav mikroob.

**Näide 3.** Kliiniline udarapõletik, parem tagumine veerand.

Tõlgendus: **kliinilist udarapõletikku** põhjustab *Str.uberis*. *C.bovis* ja koagulaasnegatiivsed stafülokokid on lehma nisajuha ja nisanaha normaalmikrofloora, nende sisaldus on antud proovis väike.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>Str.uberis</i>	+++	>90%
<i>C.bovis</i>	+	
<i>Staph.spp</i>	+	

Kui proovivõtmine ei ole korrektne, võib proovivõtmise nõusse sattuda baktereid lehma nisade nahalt ja keskkonnast. Sellisel juhul sisaldab PCR meetodikaga laborivastus mitmete mikroobide nimetusi. Bakterioloogilise uuringu korral väljastatakse laborist vastusena „segakasv“. Kuigi Pathoproof Mastitis PCR uuringuks ei pea proov olema steriilselt võetud, kergendab väga puhtalt võetud proovi uurimine analüüsitulemuste tõlgendamist.

**Näide 4.** Lehma üldpiimaproov, SRA 310 000/ml.

Tõlgendus: **vähemalt** üks lehma udaraveerand on nakatunud *S.aureus* bakteritega. Stafülokokid on resistentsed penitsilliini suhtes. Piimaproovis on suur hulk roojas (enterokokid) ja keskkonnas leiduvaid baktereid. Enterokokkide sisaldus on üle 90%. Proov on saastunud.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>S.aureus</i>	+	
<i>Staph.spp</i>	+	

Beetalaktamaaspositiivne	+	
<i>Enterococcus sp (sh faecalis, faecium)</i>	+	>90%
<i>Klebsiella (sh pneumonia, oxytoca)</i>	+	
<i>C.bovis</i>	+	

Mida kõrgem on lehma keskmine SRA, seda suurem on tõenäosus, et mitu udaraveerandit võivad olla nakatunud (erinevate) haigustekitajatega ja üldpiimaproovi vastuses võib leiduda viis ja enam bakterit. Seetõttu üldpiima uuringu eesmärgiks on leida vastus küsimusele, kas lehma ükskõik milline udaraveerand on nakatunud *S.aureus* või *Str.agalactiae* bakteritega. Nimetatud bakterid elavad peamiselt lehma udaras, mistõttu keskkonnast tulevate piimaproovi saastajatena nad arvesse ei tule. Lehma üldpiima proovist, kus peamiselt on ülekaalus keskkonnast pärit haigustekitajad, ei ole võimalik eristada udarast tulevat nakkust proovi saastumisest.

**Näide 5.** Lehma **üldpiimaproov**, lehma SRA 5 400 000/ml.

Lehma udar on nakatunud nii *S.aureus* kui *Str. agalactiae* bakteritega. Samuti on kõrge koagulaasnegatiivsete stafülokokkide sisaldus.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>S.aureus</i>	+++	99%
<i>Staph.spp</i>	+++	
Beetalaktamaaspositiivne	+++	
<i>Str.agalactiae</i>	++	
<i>Enterococcus sp (sh faecalis, faecium)</i>	+	
<i>C.bovis</i>	+	
<i>A.pyogenes, P.indolicus</i>	+	

Eeltoodud näidete suure varieeruvuse tõttu tuleb haigustekitajate väljaselgitamisel karjas alustada eesmärgist ehk küsimuse püstitusest, millele soovitakse vastust saada. Sellele järgneb valik, millist piimaproovi uurida. Olenevalt soovist on võimalik uurida lehma udaraveerandi piima, lehma üldpiima või jahutipiima.

Proovi võtmise koht	Eesmärk
Lehma udaraveerand, kliiniline põletik	Kliinilist udarapõletikku põhjustava mikroobi kindlakstegemine ning õige ravi määramine.
Lehma udaraveerand, varjatud põletik, udaraveerandi SRA on kõrge (näit: CMT hinnangul)	<b>Udaraveerandi</b> kõrget SRA-d põhjustava mikroobi kindlakstegemine ja mikroobi „iseloome“. Efektiivse kinnisperioodi aegse ravi määramine.
Lehma üldpiim (nelja veerandi koondpiim)	<b>Lehmal</b> nakkuslikku udarapõletikku põhjustavate mikroobide kindlakstegemine. Udarahaiguste tõrje põhimõtete väljatöötamine
Jahutipiim	<b>Karjas</b> levivate nakkusliku mastiidi haigustekitajate kindlaksmääramine. Karja udaratervisele hinnangu andmine.

Karja udaratervise seisundi esimeseks hindamiseks sobib jahutipiima SRA ja udarahaigusi põhjustavate bakterite esinemus. Kuna jahutipiima hulgas on kõikide lüpsvate lehmade piim (v.a äsjapoeginud loomad), siis jahutipiima analüüsil saame teada, kas karjas on levinud nakkuslikud udarapõletiku haigustekitajad, mis nakatunud udaratest piima satuvad. Lisaks on jahutipiimas mingi hulk mikroobe, kes on pärit lehmade nisanahalt ja lehmi ümbritsevast keskkonnast. Keskkonnabakterite (*E.coli*, enterokokid, *Str.uberis*) kõrge sisaldus jahutipiimas viitab lehma nisade, udara ja üldise lehmi ümbritseva keskkonna puhtuse probleemidele, seda eeskätt jahutipiima kõrge SRA taustal.

**Näide 6.** Jahutipiima SRA on 797 000/ml.

Laborivastuse tõlgendus: **Karjas** on lehma, kellel esineb *S.aureus* ja *Str.agalactiae* nakkus. Kari põeb varjatud nakkuslikku udarapõletikku. Teiste määratud haigustekitajate toimele ei saa hinnangut anda, kuna need võivad olla sattunud jahutipiima keskkonnast.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>Staph. aureus</i>	+	
<i>Enterococcus sp. (sh faecalis and faecium)</i>	+	
<i>C.bovis</i>	+	
<i>Str.agalactiae</i>	++	
<i>Str.uberis</i>	++	

**Näide 7.** Jahutipiima SRA on 521 000/ml. Karjas ei ole tõenäoliselt nakkusliku udarapõletiku haigustekitajaid. Kari on *Str.agalactiae* vaba. Keskkonnabakterite kõrge sisaldus viitab puudulikule hügieeni lüpsi ajal või nisade saastumisele sõnnikuga.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>Enterococcus sp. (sh faecalis and faecium)</i>	+	>90%
<i>C.bovis</i>	+	
<i>Staph.sp.</i>	++	
<i>Str.uberis</i>	+	

**Näide 8.** Jahutipiima SRA on 320 000/ml. Karjas on lehma, kes on nakatunud *S.aureus* bakteritega. Kari on *Str.agalactiae* vaba.

Leitud bakterid	Tase	Proportsioon
<i>Staph. aureus</i>	+	
<i>Enterococcus sp. (sh faecalis and faecium)</i>	+	
<i>C.bovis</i>	+	
<i>Str.dysgalactiae</i>	+	

**Näide 9.** Jahutipiima SRA on 170 000/ml. Karjas ei esine nakkusliku udarapõletiku haigustekitajaid. Jahutipiimas olevad mikroobid on pärit lehma nisanahalt või nisajuhast.

Tekitaja	Tase	Proportsioon
<i>C.bovis</i>	+	
<i>Staph.sp.</i>	+	
Beetalaktamaaspositiivne	+	

Kui jahutipiima SRA on madal, võib oletada, et selles karjas ei ole levinud nakkuslikke udarapõletike haigustekitajaid. Ka madala üldpiima SRA (alla 100 000/ml) lehmad on suures osas nakkusvabad. Seega peaks iga piimatootja eesmärk olema nakkusvaba karja loomine, millele haigustekitajate uuring kindlasti kaasa aitab.