

# Bakterie najczęściej izolowane z klinicznych postaci *mastitis* u krów oraz ich wrażliwość na antybiotyki

Henryka Lassa, Joanna Kubiak, Magdalena Małkińska-Horodyska

z Zakładu Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Zapalenie gruczołu mlekowego (*mastitis*) jest najważniejszą chorobą krów mlecznych wpływającą na duże straty ekonomiczne producentów mleka i przemysłu mleczarskiego na całym świecie (1). Może ono występować w dwóch głównych postaciach: klinicznej i podklinicznej (2). Kliniczna postać zapalenia gruczołu mlekowego powoduje fizyczne, chemiczne i zazwyczaj bakteriologiczne zmiany w mleku oraz patologiczne zmiany w tkance gruczołowej (3), podczas gdy w postaci podklinicznej nie odnotowuje się widocznych zmian w wymieniu oraz mleku (2).

Bakterie wywołujące *mastitis* u krów, w zależności od ich epidemiologicznego powiązania z chorobą, klasyfikowane są jako patogeny zakaźne lub środowiskowe (4). Patogeny zakaźne, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* oraz mniej powszechne *Corynebacterium bovis* i *Mycoplasma bovis*, mają zdolność do przetrwania w gruczole mlekowym i mogą powodować zapalenie, które zazwyczaj objawia się wzrostem liczby komórek somatycznych w mleku z zakażonych ćwiartek (5, 6). Patogeny środowiskowe opisywane są jako patogeny korzystające ze sposobności do wywołania zakażenia gruczołu mlekowego i nieprzystosowujące się do przetrwania w organizmie gospodarza. Występują one w bezpośrednim otoczeniu krowy, np. w ściółce, oborniku i glebie. Do grupy tej należą paciorkowce, takie jak: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp. oraz pałeczki *Escherichia coli*, *Klebsiella* i *Enterobacter* (7, 8). Oprócz bakterii, do patogenów środowiskowych zalicza się również grzyby i glony (9). Różnorodność występujących patogenów zależy od wielkości stada, brakowania krów z przewlekłymi przypadkami *mastitis*, warunków utrzymania, poziomu sanitarnego, zarządzania, kwalifikacji personelu oraz wielu innych czynników (10, 11).

Integralną częścią leczenia i profilaktyki *mastitis* jest antybiotykoterapia, która odgrywa znaczącą rolę w kontrolowaniu *mastitis* poprzez redukcję poziomu zakażeń w stadzie i przez zapobieganie nowym zakażeniom (12). Zastosowanie właściwych terapeutycznych i zapobiegawczych środków zależy od odpowiedniej wiedzy

klinicznej, epidemiologicznej i aspektów bakteriologicznych klinicznej postaci *mastitis* (13). Efektywność leczenia zależy od czynników etiologicznych powodujących chorobę, ale także od objawów klinicznych, wrażliwości danego drobnoustroju na antybiotyki i sprawności systemu immunologicznego (14). Nadużywanie lub niewłaściwe stosowanie antybiotyków może prowadzić do rozwoju oporności u różnych szczepów bakterii (15). W ostatnich latach coraz częściej mówi się o konieczności ograniczania stosowania antybiotyków w terapii i profilaktyce chorób zwierząt (16), w związku z tym w celu zwiększenia skuteczności leczenia ważne jest zidentyfikowanie szczepu oraz określenie jego wrażliwości na antybiotyki (15, 17).

Celem podjętych badań była identyfikacja patogenów wywołujących kliniczne postaci *mastitis* u krów ze zmianami makroskopowymi mleka oraz określenie wrażliwości na wybrane antybiotyki u wyizolowanych szczepów bakterii.

## Materiały i metody

Od początku lipca 2011 r. do końca czerwca 2012 r. przebadano 6233 próbki mleka dostarczone do Zakładu Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego PIWet. Probki mleka pochodziły z obór z obszaru województw: kujawsko-pomorskiego, wielkopolskiego, mazowieckiego, śląskiego, zachodniopomorskiego, dolnośląskiego, łódzkiego, pomorskiego i warmińsko-mazurskiego. Spośród próbek mleka ćwiartkowego 659 przypadków pochodziło od krów wykazujących postać kliniczną *mastitis* ze zmianami makroskopowymi mleka (strzępki, kłaczkki, skrzepy krwi, ropa, wydzielina surowiczo-ropna lub wodnista). Badanie bakteriologiczne przeprowadzono za pomocą powszechnie przyjętych metod (18). Drobnoustroje zidentyfikowane były na podstawie właściwości fenotypowych. Dla gronkowców było to: wytwarzanie katalazy i koagulazy, clumping factor i hemolizy, dla paciorkowców: rozkład eskuliny i test CAMP, dla pałeczek Gram-ujemnych: rozkład laktozy na podłożu McConkeya. Antybiotykowrażliwość określono metodą dyfuzyjno-krążkową na

## Antibiotic susceptibility of the bacteria most often isolated from clinical mastitis in cows

Lassa H., Kubiak J., Małkińska-Horodyska M.,  
Department of Pathophysiology of Reproduction  
and Mammary Gland, National Veterinary Research  
Institute in Pulawy

The aim of this study was to characterize the frequency of occurrence of bacteria causing clinical *mastitis* in cows and to determine their antibiotic susceptibility pattern. A total of 659 quarter milk samples were collected for a one year. Bacteriological examinations were performed according to routine laboratory protocol. Sensitivity of isolates to commonly used antibiotics was determined by disc diffusion method. The most frequently isolated pathogens were streptococci (38,5%), staphylococci (17,9%), coliforms (16,4%), fungi (3,3%), *Arcanobacterium pyogenes* (3,1%), algae (0,9%) and *Corynebacterium* spp. (0,8%). Streptococci showed the highest sensitivity to amoxicillin (99,2%) and the lowest to neomycin (8,7%). The highest percentage of staphylococcus strains was sensitive to amoxicillin with clavulanic acid (98,3%) and the lowest to penicillin G (22,0%). In case of coliforms bacteria, the highest effectiveness was observed to enrofloxacin (98,1%) and the lowest to neomycin (11,3%). According to KORLD recommendation, antibiotic susceptibility of *A. pyogenes* and *Corynebacterium* spp. using disc diffusion has not been determined.

**Keywords:** bovine clinical *mastitis*, bacterial isolates, antibiotics susceptibility.

podłożu Mueller-Hintona, zgodnie z zaleceniami Clinical Laboratory Standard Institute (19). Do badań użyto krążków z: amoksylicyną (Aml; 25 µg), amoksylicyną z kwasem klawulanowym (Amc; 30 µg), penicyliną (P; 1,5 j.m.), ampicyliną (Amp; 10 µg), kloksacyliną (Ob; 5 µg), cefaleksyną (Cl; 30 µg), cefoperazonem (Cfp; 30 µg), cefapiryną (Cpr; 30 µg), cefquinomem (Ceq; 30 µg), erytromycyną (E; 15 µg), tetracykliną (Te; 30 µg), neomycyną (N; 30 µg), linkomycyną (15 µg), streptomycyną (S; 10 µg), kanamycyną (K; 30 µg), gentamycyną (Cn; 10 µg), bacytracyną (B; 10 j.m.), marbofloksacyliną (Mar; 5 µg) oraz enrofloksacyliną (Enr; 5 µg). Wyniki testu interpretowano jako wrażliwe (W), średnio-wrażliwe (S) oraz odporne (O), zgodnie z wytycznymi Clinical Laboratory Standard Institute CLSI (19).

## Wyniki

Tabela 1 przedstawia częstotliwość występowania różnych drobnoustrojów powodujących kliniczne postaci *mastitis* u krów, ze zmianami makroskopowymi mleka oraz udział próbek zanieczyszczonych i niewykazujących wzrostu drobnoustrojów.

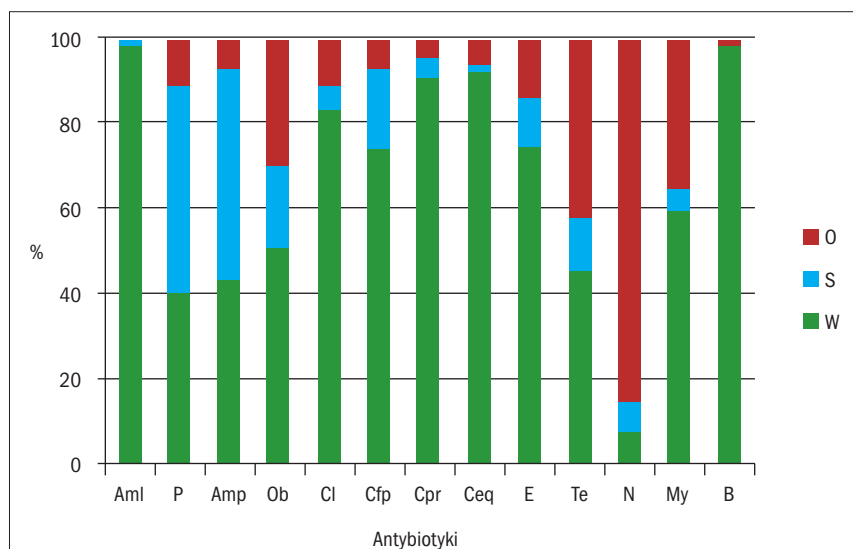
**Tabela 1.** Częstość występowania drobnoustrojów wyizolowanych z próbek mleka ćwiartkowego ze zmianami makroskopowymi w ciągu jednego roku oraz ćwiartek zanieczyszczonych i niewykazujących wzrostu drobnoustrojów

Wyizolowane drobnoustroje n = 659	Liczba	Procent
Paciorkowce ogółem	254	38,5
<i>Str. agalactiae</i>	5	0,8
Gronkowce ogółem	118	17,9
<i>Staph. aureus</i>	27	4,1
Pałeczki Gram-ujemne ogółem	107	16,4
<i>E. coli</i>	33	5,0
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	21	3,1
<i>Corynebacterium</i> spp.	5	0,8
Grzyby drożdżopodobne	22	3,3
Głony z rodzaju <i>Prototheca</i>	6	0,9
Zanieczyszczenie	33	5,0
Brak wzrostu	93	14,1

W przeprowadzonym badaniu paciorkowce reprezentowały najliczniejszą grupę drobnoustrojów wywołujących kliniczne postaci *mastitis* u krów, przy czym bakterie z gatunku *Str. agalactiae* stanowiły 2% wszystkich paciorkowców. Częstość występowania gronkowców była niemal o połowę niższa i wynosiła prawie 18%, z czego gronkowce złociste (*Staphylococcus aureus*) stanowiły 22,9%. Pałeczki Gram-ujemne izolowano w 107 (16,4%) przypadkach, z czego *Escherichia coli* była przyczyną 33 przypadków *mastitis*, co stanowi 30,8% wszystkich stanów klinicznych wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne. *Arcanobacterium pyogenes* oraz drobnoustroje z rodzaju *Corynebacterium* stosunkowo rzadko były przyczyną *mastitis clinica* u badanych krów. Wśród czynników etiologicznych stwierdzono również obecność grzybów drożdżopodobnych (3,3%) oraz glonów z rodzaju *Prototheca* (0,9%).

Wyniki oceny wrażliwości paciorkowców na wybrane antybiotyki przedstawiono na **ryc. 1**. Z danych w niej zawartych wynika, że w analizowanym okresie antybiotykami o najwyższej aktywności w stosunku do ogółu przebadanych paciorkowców była amoksycylina (99,2%), bardzo wysokiej (powyżej 90%) bacytracyna, cefquinom oraz cefapiryna, natomiast o najniższej neomycyna (8,7%).

Kształtowanie się wrażliwości na antybiotyki wyizolowanych szczepów gronkowców przedstawiono na **ryc. 2**. Największą efektywnością hamowania wzrostu badanych gronkowców w warunkach *in vitro* cechowała się amoksycylina z kwasem klawulanowym (98,3%), natomiast najniższą penicylina (78,0% szczepów opornych). W przypadku analizowanych w naszym badaniu antybiotyków, bardzo wysoką efektywnością działania charakteryzowały się również bacytracyna, gentamycyna i cefquinom (powyżej 90%).



**Ryc. 1.** Wrażliwość paciorkowców na wybrane antybiotyki. Objaśnienia: Aml – amoksycylina, P – penicylina, Amp – ampicylina, Ob – kloksacylina, Cl – cefaleksyna, Cfp – cefoperazon, Cpr – cefapiryna, Ceq – cefquinom, E – erytromycyna, Te – tetracyklina, N – neomycyna, My – linkomycyna, B – bacytracyna; W – wrażliwe, S – średnio wrażliwe, O – oporne

Analizę danych dotyczących wrażliwości na wybrane antybiotyki pałeczek Gram-ujemnych przedstawiono na **ryc. 3**. Najwyższą skutecznością działania cechowała się enrofloksacyna (98,1%), nieco niższą marbofloksacyna (96,2%), natomiast najniższą neomycyna (11,3%) i streptomycyna (15,1%).

W przypadku bakterii z gatunku *Arcanobacterium pyogenes* i rodzaju *Corynebacterium*, zgodnie z zaleceniami Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (20), do określania wrażliwości na antybiotyki nie należy stosować metody dyfuzyjno-krążkowej, zaleca się natomiast oznaczenie minimalnego stężenia hamującego antybiotyku (MIC).

## Omówienie wyników

*Mastitis* definiowane jest jako zapalenie gruczołu mlekowego, którego etiologia może mieć charakter zakaźny lub niezakaźny (5) i powodowane jest raczej przez ograniczone spectrum bakterii należących do rodzajów *Streptococcus*, *Staphylococcus* i coliform (21).

W obecnym badaniu głównym czynnikiem etiologicznym powodującym kliniczne postaci *mastitis* u krów były paciorkowce (38,5% wszystkich próbek ze zmianami makroskopowymi mleka), podobnie jak w badaniach prowadzonych w Estonii (22) oraz Iranie (2), gdzie występowały one odpowiednio w 32,2 i 33,5% wszystkich próbek pochodzących z przypadków klinicznych. Częstość występowania gronkowców (17,9%) kształtowała się na podobnym poziomie jak u innych autorów (2), podczas gdy liczebność pałeczek Gram-ujemnych (16,4%) była wyższa od obserwowanej przez Kalmus i wsp. (22), natomiast niższa niż w badaniach Shpigel i wsp. (13), w których pałeczki stanowiły 53,3% wszystkich badanych próbek. W stosunkowo niewielkiej liczbie przypadków, podobnie jak w Estonii (22), odnotowano występowanie *Arcanobacterium pyogenes* oraz bakterii z rodzaju *Corynebacterium*. Poza bakteriami, czynnikami etiologicznymi powodującymi kliniczne *mastitis* u krów zarówno w naszych badaniach, jak i w badaniach innych autorów (23) były grzyby drożdżopodobne (ok. 3%) oraz glony z rodzaju *Prototheca*, które podobnie jak w Izraelu (13) były przyczyną najmniejszej liczby klinicznych przypadków *mastitis* (poniżej 1%). Na podstawie badań własnych (dane nieopublikowane) podkreślić należy, że odsetek wyizolowanych grzybów drożdżopodobnych wzrósł znacznie w stosunku do poprzednich lat.

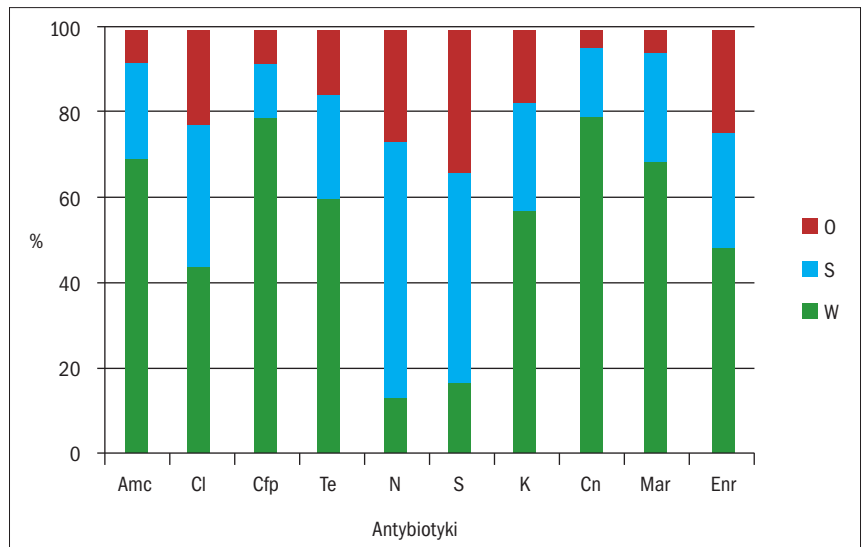
W naszych badaniach, podobnie jak w badaniach Wawrona i wsp. (16), w analizowanym okresie antybiotykami o najwyższej aktywności w stosunku do ogółu przebadanych paciorkowców była amoksycylina,

natomiast o najniższej, podobnie jak u Hawari i Al-Dabbas (24), neomycyna. Największą efektywnością hamowania wzrostu badanych gronkowców w warunkach *in vitro* cechowała się amoksycylina z kwasem klawulanowym, natomiast najniższą penicylina (78,0% szczepów opornych). Podobne rezultaty odnotował Turutoglu i wsp. (25), gdzie amoksycylina z kwasem klawulanowym wykazała bardzo wysoką skuteczność (ponad 95%), natomiast najniższą zaobserwowano w przypadku penicyliny (ponad 60% szczepów opornych). Badane szczepy pałeczek Gram-ujemnych, podobnie jak te analizowane przez Malinowskiego i wsp. (26), najwyższą wrażliwość wykazały w stosunku do enrofloksacyny, natomiast najniższą w stosunku do neomycyny.

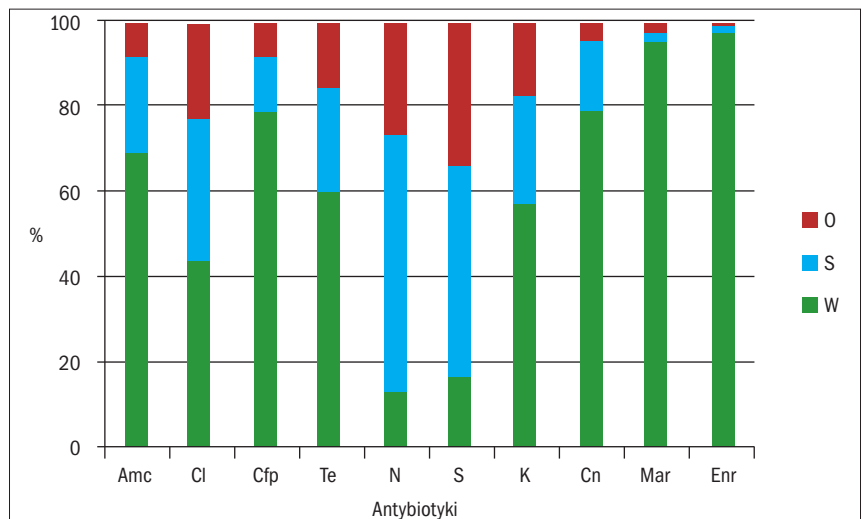
Jednakże pamiętać należy, że nawet najwyższa skuteczność antybiotyku w warunkach *in vitro* nie zapewnia pełnego sukcesu w warunkach *in vivo*. Obecne badanie zostało przeprowadzone w celu określenia wzorca oporności patogenów wywołujących kliniczne postaci *mastitis* na powszechnie stosowane antybiotyki. Wzrost oporności bakterii na leki przeciwdrobnoustrojowe okazał się rosnącym problemem i konieczna stała się racjonalizacja stosowania antybiotyków i monitoring oporności (17).

## Piśmiennictwo

- Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F.: Production effects related to *mastitis* and *mastitis* economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 2003, **34**, 475-491.
- Hashemi M., Kafi M., Safdarian M.: The prevalence of clinical and subclinical *mastitis* in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *Iranian J. Vet. Res.* 2011, **12**, 236-241.
- Hortet P., Seegers H.: Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical *mastitis* in dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 1998, **37**, 1-20.
- Rossitto P.V., Ruiz L., Kikuchi Y., Glenn K., Luiz K., Watts J.L., Cullor J.S.: Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from *mastitis* in central California dairies. *J. Dairy Sci.* 2002, **85**, 132-138.
- Bradley A.J.: Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 2002, **163**, 1-13.
- Radostits O.M., Leslie K.E., Fretow J.: *Herd Health: Food Animal Production Medicine*. Saunders, Philadelphia 1994, s. 233.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R.: *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolf Publishing, London 1994, s. 327-344.
- Schröder A., Hoedemeker M., Klein G.: Resistance of *mastitis* pathogens in Northern Germany. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr* 2005, **9**, 393-398.
- Costa E. O., Ribeiro A. R., Watanabe E. T., Melville P. A.: Infectious bovine *mastitis* caused by environmental organisms. *J. Vet. Med. B.* 1998, **45**, 65-71.
- Lakew M., Tolosa T., Tigre W.: Prevalence and major bacterial causes of bovine *mastitis* in Asella, South Eastern Ethiopia. *Trop. Anim Health Prod.* 2009, **41**, 1525-1530.
- Klimienė I., Ružauskas M., Špakauskas V., Mockeliūnas R., Pereckienė A., Butrimaitė-Ambrozevičienė Č.: Prevalence of gram positive bacteria in cow *mastitis* and their susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Vet. Med. Zoot.* 2011, **56**, 65-72.
- Unakal C. G., Kaliwal B. B.: Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine *mastitis*. *Vet. World* 2010, **3**, 65-67.
- Shpigel N.Y., Winkler M., Ziv G., Saran A.: Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical *mastitis* in Israeli dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 1998, **35**, 1-9.
- Malinowski E., Kłossowska A., Kaczmarowski M., Lassa H., Kuźma K.: Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with *mastitis* cows. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2002, **46**, 289-294.
- Lingaas E.: The use of antimicrobials in animal production – a threat to humans? *NKVet Symposium* Helsinki, Finland. 1998, 26-27.
- Wawron W., Piech T., Bochniarz M.: Wrażliwość na antybiotyki patogenów izolowanych z przypadków *mastitis* u krów. *Med. Weter.* 2008, **64**, 1132-1135.
- Hendriksen R.S., Mevius D.J., Schroeter A., Teale C., Meunier D., Butaye P., Franco A., Utinane A., Amado A., Moreno M., Greko C., Stärk K., Berghold C., Myllyniemi A.-L., Wasyl D., Sunde M., Aarestrup F.M.: Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet. Scand.* 2008, **50**:28, 1-10.
- Malinowski E., Kłossowska A.: *Diagnostyka zakażeń i zapalenia gruczołu mlekowego krów*. Published by PIWet, Pulawy, Poland, 2002.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*. Approved Standard M31-A3. CLSI, Wayne, USA, 2008.
- Łętowska I., Olender A.: *Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2010. Oznaczenie wrażliwości pałeczek Gram-dodatnich z rodzaju *Corynebacterium* spp. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Narodowy Instytut Leków Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej* 2010, 1-7.
- Moges N., Asfaw Y., Belihu K., Tadesse A.: Antimicrobial susceptibility of *mastitis* pathogens from smallholder dairy herds in and around Gondar, Ethiopia. *J. Anim. Vet. Adv.* 2011, **10**, 1616-1622.
- Kalmus P., Aasmäe B., Kärssin A., Orro T., Kask K.: Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scand.* 2011, **53**:4, 1-7.
- Ranjan R., Gupta M. K., Singh K. K.: Study of bovine *mastitis* in different climatic conditions in Jharkhand, India. *Vet. World* 2011, **4**, 205-208.
- Hawari A.D., Al-Dabbas E.: Prevalence and distribution of *mastitis* pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Jordan. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2008, **3**, 36-39.
- Turutoglu H., Ercekli S., Ozturk D.: Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine *mastitis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2006, **50**, 41-45.
- Malinowski E., Lassa H., Smulski S., Kłossowska A., Kaczmarowski M.: Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from cows with *mastitis* in 2006-2007. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2008, **52**, 565-572.



Ryc. 2. Wrażliwość gronkowców na wybrane antybiotyki. Objaśnienia: Amc – amoksycylina z kwasem klawulanowym, P – penicylina, Ob – kloksacylina, Cl – cefaleksyna, Cfp – cefaperazon, Cpr – cefapiryna, Ceq – cefquinom, Te – tetracyklina, N – neomycyna, S – streptomycyna, K – kanamycyna, Cn – gentamycyna, B – bacytracyna; W – wrażliwe, S – średnio wrażliwe, O – oporne



Ryc. 3. Wrażliwość pałeczek Gram-ujemnych na wybrane antybiotyki. Objaśnienia: Amc – amoksycylina z kwasem klawulanowym, Cl – cefaleksyna, Cfp – cefaperazon, Te – tetracyklina, N – neomycyna, S – streptomycyna, K – kanamycyna, Cn – gentamycyna, Mar – marbocyl, Enr – enrofloksacyna; W – wrażliwe, S – średnio wrażliwe, O – oporne