

# Wrażliwość na antybiotyki laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych bakterii wyosobnionych z przypadków mastitis u krów

EDWARD MALINOWSKI, HENRYKA LASSA, ANNA KŁOSSOWSKA, MAREK LESIAK\*

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruzzołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,  
Oddział w Bydgoszczy, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz,

\*Pfizer Animal Health, ul. Rzymowskiego 28, 02-697 Warszawa

Malinowski E., Lassa H., Klossowska A., Lesiak M.

## Antimicrobial susceptibility of lactamase-positive and lactamase-negative bacteria strains isolated from mastitis in cows

### Summary

The purpose of the study was to examine 120 *Staph. aureus* strains, 196 coagulase-negative staphylococci (CNS) strains, and 84 Gram-negative bacteria strains isolated from clinical and subclinical cases of mastitis for their susceptibility in-vitro to antimicrobial drugs depending on the strain's ability to produce  $\beta$ -lactamase. Antimicrobial sensitivity was tested by the disk diffusion method and performed according to NCCLS guidelines in Mueller-Hinton agar. The detection of  $\beta$ -lactamase production was determined by Oxoid sticks impregnated with Nitrocefin, a chromogenic cephalosporin where a positive reaction is shown by the development of a pink-red colour of the tip of the stick. 54.2% of *Staph. aureus* tested strains, 29.1% CNS strains and 91.7% Gram-negative bacteria strains were lactamase-positive. All the lactamase-positive *Staph. aureus* strains were resistant to penicillin and 96.9% of them were resistant to ampicillin. Their resistance to cloxacillin (18.5%), cefoperazone (20%) and cephalexine (7.6%) was relatively low but it was high to amoxicillin (52.3%). Clavulanic acid caused an in-vitro increase of activity of amoxicillin from 47.7% up to 81.5%. The lactamase-negative coagulase-positive staphylococci were susceptible to  $\beta$ -lactam antibiotics in 90–100% of cases. The sensitivity of lactamase-positive CNS strains to antibiotics was very similar to *Staph. aureus* strains. The sensitivity of lactamase-positive and lactamase-negative strains of Gram-negative bacteria to  $\beta$ -lactam antibiotics did not differ. The combination of amoxicillin with clavulanic acid increased its activity in-vitro compared to pure amoxicillin. No connection between  $\beta$ -lactamase production of staphylococci and Gram-negative bacteria strains and their sensitivity to streptomycin, neomycin, gentamycin, erythromycin, tylosin, tetracycline, bacitracine, lincomycine, novobiocin and norfloxacin was noted.

**Keywords:** mastitis agents,  $\beta$ -lactamase, resistance to antibiotics

Dane piśmiennictwa wskazują na coraz niższe efekty przeciwbakteryjnej terapii zapaleń gruczołu mlekowego, mimo wprowadzania do lecznictwa coraz to nowszych generacji antybiotyków (31, 35, 37, 38, 42, 44). Jedną z przyczyn tego stanu jest nabywanie oporności na te antybiotyki przez drobnoustroje, które stanowią czynnik etiologiczny *mastitis* (6, 9, 26, 30, 32). Oporność tych samych gatunków bakterii na ten sam antybiotyk nie zawsze jest identyczna. Antybiotyki mogą cechować się wysoką aktywnością *in vitro* w stosunku do bakterii wyosobnionych w jednym stadzie, a niską w innym (23, 29). Oprócz tego wykazano zmienność wrażliwości bakterii wyizolowanych w tym samym gospodarstwie lub na tym samym terenie na przestrzeni czasu (9, 11, 20). Bakterie nabywały i traciły oporność na antybiotyki powszechnie stosowane w terapii i profilaktyce *mastitis*. Stwierdzono wahania wrażliwości *Streptococcus agalactiae* na penicylinę, ampicylinę, kloksacylinę, erytromycynę i terramycynę. Powyższe obserwacje dotyczą także wrażliwości na wymienione antybio-

tyki paciorkowców CAMP-ujemnych oraz gronkowców, a także wrażliwości na neomycynę, streptomycynę i tetracyklinę pałeczek coli-podobnych i gronkowców.

Jednym z typów oporności jest zdolność produkowania przez bakterie enzymów, które rozbijają pierścien  $\beta$ -laktamowy, tj. zasadnicze wiązanie chemiczne antybiotyków z grupy penicylin i cefalosporyn. Szczególną aktywność w produkcji  $\beta$ -laktamazy przejawiają gronkowce i pałeczki Gram-ujemne, w tym *E. coli* (1, 5, 7, 10, 43), tj. drobnoustroje, które obecnie dominują wśród czynników etiologicznych podklinicznych i klinicznych postaci zapaleń wymienia (3, 4, 9, 16, 23, 26). Opierając się na informacjach zagranicznych (1, 5-7, 28, 37, 43) można przyjąć, że około 20-60% szczepów gronkowców i pałeczek wytwarza  $\beta$ -laktamazę. W piśmiennictwie brak jest danych dokumentujących zarówno skalę tego zjawiska w Polsce w odniesieniu do patogenów *mastitis* u krów, jak też kształtowania się oporności na różne antybiotyki bakterii laktamazo-aktywnych.

Celem badań było określenie wrażliwości na antybiotyki gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) i koagulazo-ujemnych (CNS – coagulase-negative staphylococci) oraz pałeczek Gram-ujemnych wyizolowanych z klinicznych i podklinicznych przypadków *mastitis* u krów w zależności od zdolności do wytwarzania  $\beta$ -laktamazy przez te szczepy.

### Materiał i metody

Badaniom *in vitro* poddano 316 szczepów gronkowców i 84 szczepy pałeczek Gram-ujemnych, wyizolowanych z klinicznych i podklinicznych przypadków *mastitis* u krów w drugiej połowie 2002 roku. Próbkę mleka ćwiartkowego (wydzieliny zapalnej) pobierali pracownicy Zakładu Fizjopatologii Rozrodu i Gruzołu Mlekowego PIWet, a w części przypadków także terenowi lekarze weterynarii. Strzyki były czyszczone, następnie zanurzane w środku dezynfekcyjnym do poddziejowej kąpieli i ponownie dezynfekowane alkoholem przy pomocy tamponu z waty. Pierwsze strugi usuwano i do sterylnych probówek zdajano po 2-4 ml wydzieliny (mleka) zatokowej. Próbkę schładzano i niezwłocznie transportowano do laboratorium. Badania bakteriologiczne przeprowadzano za pomocą powszechnie przyjętych metod (22).

Wrażliwość na antybiotyki oceniono posługując się metodą krążkowo-dyfuzyjną z uwzględnieniem wytycznych National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) na podłożu Mueller-Hintona. Stosowano następujące krążki firmy Oxoid: penicylina (10 j.m.), ampicylina (10  $\mu$ g), kloksacylina (5  $\mu$ g), amoksycylina (25  $\mu$ g), amoksycylina z kwasem klawulanowym (20  $\mu$ g + 10  $\mu$ g), cefoperazon (30  $\mu$ g), cefaleksyna (30  $\mu$ g), streptomycyna (10  $\mu$ g), neomycyna (30  $\mu$ g), gentamycyna (10  $\mu$ g), erytromycyna (15  $\mu$ g), tetracyklina (30  $\mu$ g), bacytracyna (10  $\mu$ g), linkomycyna (15  $\mu$ g), norfloksacylina (10  $\mu$ g) oraz nowobiocyna (30  $\mu$ g), a także firmy Rosco (tylozyna – 150  $\mu$ g). Szczepami kontrolnymi były *S. aureus* ATCC 25 923 i *Escherichia coli* ATCC 25 922. Interpretacji wyników dokonywano zgodnie z kryteriami NCCLS (27), dzieląc szczepy na wrażliwe, średnio wrażliwe i oporne.

Wytwarzanie  $\beta$ -laktamazy przez gronkowce i pałeczki Gram-ujemne określono za pomocą pałeczek z nitrocefina (Oxoid). Nitrocefina jest chromogenną cefalosporyną, która wykazuje szybką i wyraźną zmianę zabarwienia z żółtego do różowoczerwonego w przypadku obecności  $\beta$ -laktamazy, co jest spowodowane przez hydrolizę wiązania amidowego w pierścieniu  $\beta$ -laktamowym. Badanie przeprowadzano podczas odczytywania antybiotylogramu po 18-24-godzinnej inkubacji. Końcówkę pałeczki, w której znajduje się nitrocefina przykładano do kolonii bakteryjnych leżących na granicy strefy zahamowania wzrostu przy krążku zawierającym penicylinę lub bezpośrednio przy krążku w przypadku braku strefy wolnej od bakterii. Następnie pałeczkę odkładano na zawilgoconą pokrywkę płytki Petriego i po 5 minutach przetrzymywania w temp. pokojowej oceniano zabarwienie końcówki pałeczki. Zmiana barwy z żółtej do różowej i czerwonej wskazywała na wytwarzanie enzymu. W przypadku utrzymywania się barwy żółtej odczyt ponawiano po 15-60 minutach.

Wytwarzanie  $\beta$ -laktamazy przez gronkowce i pałeczki Gram-ujemne określono za pomocą pałeczek z nitrocefina (Oxoid). Nitrocefina jest chromogenną cefalosporyną, która wykazuje szybką i wyraźną zmianę zabarwienia z żółtego do różowoczerwonego w przypadku obecności  $\beta$ -laktamazy, co jest spowodowane przez hydrolizę wiązania amidowego w pierścieniu  $\beta$ -laktamowym. Badanie przeprowadzano podczas odczytywania antybiotylogramu po 18-24-godzinnej inkubacji. Końcówkę pałeczki, w której znajduje się nitrocefina przykładano do kolonii bakteryjnych leżących na granicy strefy zahamowania wzrostu przy krążku zawierającym penicylinę lub bezpośrednio przy krążku w przypadku braku strefy wolnej od bakterii. Następnie pałeczkę odkładano na zawilgoconą pokrywkę płytki Petriego i po 5 minutach przetrzymywania w temp. pokojowej oceniano zabarwienie końcówki pałeczki. Zmiana barwy z żółtej do różowej i czerwonej wskazywała na wytwarzanie enzymu. W przypadku utrzymywania się barwy żółtej odczyt ponawiano po 15-60 minutach.

Tab. 1. Liczba i odsetek drobnoustrojów laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów

Drobnoustrój	Laktamazo-dodatnie		Laktamazo-ujemne		Łącznie n
	n	%	n	%	
<i>S. aureus</i>	65	54,2	55	45,8	120
CNS	57	29,1	139	70,9	196
Pał. Gram-ujemne	77	91,7	7	8,3	84
Razem	199	49,8	201	50,2	400

### Wyniki i omówienie

Szczepy laktamazo-dodatnie stanowiły 54,2% gronkowców koagulazo-dodatnich (*S. aureus*) i 29,1% gronkowców koagulazo-ujemnych. Ponad 90% pałeczek Gram-ujemnych wykazywało zdolność wytwarzania  $\beta$ -laktamazy (tab. 1).

Wrażliwość bakterii laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe przedstawiono w tab. 2. Gronkowce złociste, które wytwarzały  $\beta$ -laktamazę były w 100% oporne na penicylinę i w 96,9% na ampicylinę. Oporność tych bakterii na kloksacylinę i ce-

Tab. 2. Wrażliwość na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe bakterii laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych wyizolowanych z przypadków *mastitis* u krów

Bakterie	Penicylina %		Ampicylina %		Kloksacylina %		Amoksycylina %		Amoks./kw. klaw. %		Cefoperazon %		Cefaleksyna %	
	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr
<i>S. aureus</i> lakt.-dodatnie	0,0	-	3,1	-	73,8	7,7	27,7	20,0	75,4	6,1	30,8	49,2	89,2	3,1
<i>S. aureus</i> lakt.-ujemne	89,1	-	87,3	-	94,5	0,0	89,1	10,9	100,0	0,0	85,4	12,7	98,2	0,0
CNS lakt.-dodatnie	5,3	-	7,2	-	64,9	15,8	28,1	36,8	89,5	1,7	38,6	45,6	86,0	7,0
CNS lakt.-ujemne	72,7	-	79,9	-	82,7	7,2	91,4	5,0	99,3	0,7	79,9	14,4	95,7	3,1
Pał. G-ujemne lakt.-dodatnie	0,0	0,0	19,5	1,3	0,0	0,0	9,1	24,7	51,9	18,2	46,7	32,5	44,2	16,9
Pał. G-ujemne lakt.-ujemne	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0	28,6	14,3	85,7	14,3	28,6	28,6	57,1	14,3

Objaśnienia: lakt. – laktamaza, wr – wrażliwy, śr – średnio wrażliwy



foperazon była prawie identyczna, nieco zaś mniejsza na cefaleksynę. Obecność kwasu klawulanowego spowodowała prawie dwukrotny wzrost aktywności *in vitro* amoksycyliny. Niezależnie od tego nastąpiło zmniejszenie procentowego udziału szczepów średniowrażliwych na korzyść wrażliwych. Laktamazo-ujemne gronkowce koagulazo-dodatnie były w 90-100% wrażliwe na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Gronkowce koagulazo-ujemne cechowały się podobną jak *S. aureus* wrażliwością na antybiotyki tej grupy. I w tym przypadku połączenie amoksycyliny z kwasem klawulanowym okazało się bardziej aktywne w stosunku do szczepów wytwarzających  $\beta$ -laktamazę w porównaniu z działaniem samej amoksycyliny. Wrażliwość na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych pałeczek Gram-ujemnych nie różniła się w sposób zasadniczy. Kwas klawulanowy poprawił aktywność *in vitro* amoksycyliny zarówno w stosunku do szczepów laktamazo-dodatnich, jak też laktamazo-ujemnych. Jednak mała liczba tych ostatnich nie upoważnia do wniosków.

W tab. 3 przedstawiono wrażliwość gronkowców i pałeczek na antybiotyki z grupy aminoglikozydów i makrolidów w zależności od wytwarzania  $\beta$ -laktamazy przez badane szczepy. Nie odnotowano różnic zależnych od produkcji wymienionego enzymu we wrażliwości na te antybiotyki gronkowców złocistych. Natomiast laktamazo-ujemne CNS wykazywały nieco lepszą wrażliwość, szczególnie na streptomycynę i erytromycynę. Z kolei laktamazo-dodatnie pałeczki Gram-ujemne były *in vitro* bardziej podatne na streptomycynę, gentamycynę, a w szczególności na neomycynę, niż szczepy laktamazo-ujemne.

Kształtowanie się wrażliwości laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych gronkowców i pałeczek na tetracyklinę, bacytracynę, linkomycynę, norfloksacynę i nowobiocynę przedstawiono w tab. 4. Wrażliwość na badane antybiotyki nie miała związku z wytwarzaniem przez szczepy  $\beta$ -laktamazy. Wyjątek stanowiła wrażliwość gronkowców na tetracyklinę. Szczepy laktamazo-dodatnie i koagulazo-dodatnie były bardziej, a laktamazo-dodatnie i koagulazo-ujemne – mniej wrażliwe na ten antybiotyk. Laktamazo-ujemne pałeczki cechowały się stosunkowo wysoką opornością na norfloksacynę.

Z przeprowadzonych badań wynika, że gronkowce i pałeczki wyizolowane z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów w gospodarstwach położonych w pobliżu Bydgoszczy cechowały się zróżnicowaną zdolno-

Tab. 3. Wrażliwość na antybiotyki aminoglikozydowe i makrolidowe bakterii laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych wyosobnionych z przypadków *mastitis* u krów

Bakterie	Streptomycyna %		Neomycyna %		Gentamycyna %		Erytromycyna %		Tylozyna %	
	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr
<i>S. aureus</i> lakt.-dodatnie	33,8	47,7	87,7	12,3	93,8	4,6	36,9	52,3	23,1	40,0
<i>S. aureus</i> lakt.-ujemne	40,0	40,0	83,6	14,5	98,2	0,0	45,5	41,8	20,0	52,7
CNS lakt.-dodatnie	57,9	8,8	89,5	3,5	89,5	7,0	45,6	26,3	36,8	33,3
CNS lakt.-ujemne	66,9	18,0	89,9	8,6	95,7	2,2	54,0	32,4	42,4	32,4
Pał. G-ujemne lakt.-dodatnie	15,6	49,3	32,5	50,6	85,7	3,9	1,3	1,3	0,0	1,3
Pał. G-ujemne lakt.-ujemne	0,0	42,9	0,0	14,3	71,4	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Tab. 4. Wrażliwość na inne antybiotyki bakterii laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych wyosobnionych z przypadków *mastitis* u krów

Bakterie	Tetracyklina %		Bacytracyna %		Linkomycyna %		Norfloksacyna %		Nowobiocyna %	
	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr	wr	śr
<i>S. aureus</i> lakt.-dodatnie	58,5	24,6	87,7	1,5	43,1	35,4	75,4	18,5	32,3	43,1
<i>S. aureus</i> lakt.-ujemne	38,2	18,2	89,1	10,9	50,9	29,1	70,9	21,8	74,5	9,1
CNS akt.-dodatnie	49,1	8,8	87,7	10,5	33,3	15,8	75,4	15,8	47,4	19,3
CNS lakt.-ujemne	74,8	7,2	90,6	6,5	38,1	17,3	74,1	18,0	52,5	20,1
Pał. G-ujemne lakt.-dodatnie	10,4	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	85,7	9,1	0,0	2,6
Pał. G-ujemne lakt.-ujemne	0,0	28,6	0,0	14,3	0,0	0,0	28,6	28,6	0,0	0,0

Objaśnienia: jak w tab. 2.

cią do produkcji  $\beta$ -laktamazy. Zbliżony odsetek laktamazo-dodatnich gronkowców złocistych, pochodzących z *mastitis* u krów stwierdzali też inni autorzy (5, 7, 28), chociaż w niektórych pracach odsetek ten był stosunkowo niski (1). Przeważnie notowano wzrost odsetka gronkowców złocistych zdolnych do wytwarzania wymienionego enzymu. W Danii stwierdzono wzrost z 4,5% do 20% w okresie 30 lat (1). W Finlandii nastąpił wzrost z 30% do 54% w okresie 15 lat (35), a Belgii najpierw zauważono wzrost odsetka laktamazo-dodatnich gronkowców złocistych z 36% do 80%, po czym nastąpił spadek do 50% i stan taki utrzymywał się ponad 20 lat (7). Przyrost gronkowców wytwarzających  $\beta$ -laktamazę wykazano także w Czechach (25) i USA (28). Z kolei w Austrii odnotowano spadek takich gronkowców z 35,2% do 15,4% między rokiem 1992 a 1996 (6).

Do tej pory tylko pojedyncze prace (26, 29) poświęcono zdolności wytwarzania wymienionego enzymu przez gronkowce koagulazo-ujemne, mimo że stanowią

one coraz częstszą przyczynę *mastitis* (3, 4, 21). Według Myllys i wsp. (26), laktamazo-dodatnie CNS mogą stanowić źródło genów oporności dla *S. aureus*. Gronkowce koagulazo-ujemne, które posiadają zdolność wytwarzania  $\beta$ -laktamazy, stanowią istotny problem w terapii zakażeń u ludzi (2, 14, 15). Stwierdzony w tej pracy odsetek Gram-ujemnych pałeczek, które produkowały  $\beta$ -laktamazę jest wyższy niż w danych piśmiennictwa (10).

Wrażliwość gronkowców na kloksacylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, cefoperazon i cefaleksynę, a także na neomycynę, gentamycynę, erytromycynę, bacytracynę i norfloksacynę była dość wysoka. Mieściła się jednak w przedziałach podawanych przez innych autorów (4, 7, 9, 11, 12, 26, 28) i nie odbiegała od wyników wcześniejszych badań własnych (19, 20, 21). Prawie takie same wyniki, szczególnie w przypadku oporności gronkowców na penicylinę, erytromycynę i neomycynę uzyskali Chertcoff i wsp. (4). Większość autorów odnotowała wzrost oporności na antybiotyki gronkowców oraz innych drobnoustrojów izolowanych z *mastitis* (1, 11, 26, 29). W Finlandii wzrosła proporcja szczepów *S. aureus* opornych na więcej niż jeden antybiotyk z 36,9% do 63,6% w okresie 8 lat (26). Czynnikiem, który ogranicza efektywność antybiotykoterapii zapaleń spowodowanych przez gronkowca złocistego jest zdolność szczepów do wytwarzania  $\beta$ -laktamazy (8, 29, 35, 37). Z wymienionych powodów Watts i Salmon (43) podkreślają konieczność identyfikacji gronkowców opornych na meticylinę (MRSA – Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*), ponieważ szczepy te są odporne na wiele lub wszystkie antybiotyki dopuszczone do terapii *mastitis*. Z drugiej strony, de Oliveira i wsp. (28) na podstawie MIC dla szczepów *S. aureus* z 11 krajów stwierdzili, że ogólny poziom oporności jest stosunkowo niski. Jednakże oporność na antybiotyki patogenów *mastitis* może rosnąć i obniżyć się w kolejnych latach (11, 20).

Przeprowadzone badania wskazują, że najbardziej aktywne *in vitro* w stosunku do pałeczek Gram-ujemnych były: cefoperazon i amoksycylina z kwasem klawulanowym z grupy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych oraz norfloksacyna, gentamycyna i neomycyna (z wyjątkiem szczepów laktamazo-ujemnych). Podobną wrażliwość notowali także inni autorzy (9, 10). Stosunkowo wysoka oporność na norfloksacynę laktamazo-ujemnych pałeczek Gram-ujemnych wydaje się przypadkowa, podobnie jak oporność tych drobnoustrojów na neomycynę. Liczba pałeczek Gram-ujemnych, które nie wytwarzały  $\beta$ -laktamazy była bowiem minimalna.

Markiewicz i Kwiatkowski (24) niedawno przypomnieli klasyfikację podstawowych mechanizmów oporności drobnoustrojów, zaproponowaną przez Davisa i Maasa w 1952 r., która ciągle pozostaje aktualna. Do mechanizmów tych zaliczono: modyfikację miejsca w komórce będącego celem działania antybiotyku, inaktywację leku za pomocą enzymów komórkowych (np. hydroliza przez  $\beta$ -laktamazy), zahamowanie transportu antybiotyku do komórki bakteryjnej, wytworzenie alternatywnej drogi pozwalającej ominąć etap przemian wrażliwy na lek, zwiększenie stężenia enzymów, które powodują in-

aktywację leku lub zwiększenie stężenia metabolitu, będącego antagonistą inhibitora oraz zmniejszenie zapotrzebowania na produkt, którego synteza ulega zahamowaniu. Według cytowanych autorów wymienioną klasyfikację należałoby obecnie uzupełnić o następujące punkty: aktywne usuwanie chemioterapeutyku z komórki bakteryjnej, zmiany w systemach regulacyjnych nie związanych bezpośrednio z mechanizmem działania leku oraz zmniejszenie aktywności enzymu przeprowadzającego nieczynną formę chemioterapeutyku do aktywnej wewnątrz komórki. Podkreślono także, że oporność jest procesem skomplikowanym. W powstawaniu oporności jednego drobnoustroju na jeden antybiotyk może brać udział wiele różnych mechanizmów, a często ten sam mechanizm decyduje o oporności wielu drobnoustrojów na różne antybiotyki (24).

Znane są cztery mechanizmy oporności gronkowców na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe (18). Jednym z nich jest zdolność drobnoustrojów do produkcji  $\beta$ -laktamaz. Enzymy te hydrolizują penicylinę, ampicylinę, amoksycylinę, piperacylinę, karbenicylinę i mezlocylinę. Następny mechanizm polega na nadprodukcji enzymu lub syntezie enzymu o zmienionym spektrum substratowym. Kolejny mechanizm związany jest ze zmianami struktury białek wiążących penicyliny (PBP – Penicillin Binding Protein). Z syntezą białka PBP2, które nie posiada wystarczającego powinowactwa do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, wiąże się mechanizm czwarty, uważany za najważniejszy (2, 18). Z białkiem PBP2a związana jest oporność gronkowców na meticylinę. Szczepy takie cechują się brakiem wrażliwości na wszystkie antybiotyki  $\beta$ -laktamowe (14, 41, 43), niezależnie od obecności inhibitora  $\beta$ -laktamazy.

Ograniczenie skutków działania  $\beta$ -laktamaz można uzyskać dwiema drogami. Jedną jest stosowanie połączeń antybiotyku z inhibitorem tych enzymów, którym jest kwas klawulanowy (28, 35). Podobny efekt dają kombinacje dwóch różnych antybiotyków, np. penicyliny z nowobiocyną (40). Poza tym aktywność  $\beta$ -laktamazy hamuje laktoferyna (8). Drugą drogą jest wykonywanie antybiotykogramów, dzięki czemu istnieje możliwość doboru antybiotyku aktywnego *in vitro* w stosunku do bakterii wywołujących stan zapalny (4, 29, 30). Należy jednak dodać, że terapia zapaleń wywołanych przez gronkowce laktamazo-dodatnie jest mniej skuteczna niż zapaleń na tle gronkowców laktamazo-ujemnych, nawet w przypadku użycia antybiotyku aktywnego *in vitro* (32, 35, 37, 38).

Kolejnym kryterium, równie ważnym w doborze antybiotyku, jest jego dystrybucja w tkankach wymienia, mieszanie się z wydzieliną zapalną oraz utrzymywanie stężenia terapeutycznego przez odpowiednio długi czas. Dobre właściwości rozprzestrzeniania się, niezależnie od drogi podania, posiadają antybiotyki z grupy makrolidów i niektóre antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Antybiotyki cechujące się słabszą dystrybucją (aminoglikozydowe) dłużej niż inne utrzymują w wydzielinie zapalnej stężenie wyższe od MIC (36). Z kolei zapalnie zmienione mleko obniża aktywność potencjalizowanych sulfona-



midów, ampicyliny i spiramycyny (17). Do ogólnego stosowania, o ile wynika to z antybiotykoogramu, nadaje się między innymi oksytetracyklina, tetryzyna, erytromycyna i spiramycyna, a w dalszej kolejności – penicylina oraz amoksylicyna (36). Wiele antybiotyków obniża jednak zdolność granulocytów do efektywnej fagocytozy (13, 33), co stanowi jedną z przyczyn niskich efektów terapii. Dlatego w leczeniu należy uwzględniać podnoszenie odporności pacjenta, niezależnie od precyzyjnego doboru leków (14, 45), co jednocześnie daje szansę na zahamowanie narastania antybiotykooporności (39).

Ocena wrażliwości *in vitro* pozwala na dobór leków aktywnych, a tym samym na wyższą skuteczność terapii i mniejsze zużycie antybiotyków, a także odpowiednio wczesną orientację w pojawianiu się szczepów opornych. Wyniki przedstawionych badań wskazują na konieczność stałego monitorowania wrażliwości na antybiotyki bakterii wywołujących *mastitis* u krów z uwzględnieniem wytwarzania  $\beta$ -laktamazy. Nie ma bowiem uniwersalnego antybiotyku ani też złożonego preparatu dowymieniowego, który można zastosować niezależnie od wrażliwości bakterii, stanowiących czynnik etiologiczny choroby.

## Piśmiennictwo

1. Aarestrup F. M., Jensen N. E.: Penicillinresistens blandt *Staphylococcus aureus* fra bovin mastitis i Danmark og andre lande. Dansk Veterinaertidsskrift. 1999, 82, 45-54.
2. Bartoszewicz-Potyrala M., Przondo-Mordarska A.: Cechy gronkowców koagulazoujemnych warunkujących ich chorobotwórczość. Post. Mikrobiol. 2002, 41, 351-366.
3. Bradley A. J., Green M. J.: Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. Vet. Rec. 2001, 148, 683-686.
4. Chertcoff R. E., Acuña C. N., Izak E.: Prevalence and antimicrobial susceptibilities of mastitis pathogens from clinical cases of Argentina dairy cows. Proc. 2<sup>nd</sup> Inter. Symp. Mastitis and Milk Quality. Vancouver, Canada 2001, s. 418-419.
5. Craven N., Anderson J. C., Jones T.: Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Vet. Rec. 1986, 118, 290-291.
6. Deutz A., Obritzhauser W., Kover J.: Zur Resistenz von *Staphylokokken* im Mastitisgeschehen. Tierärztl. Umsch. 1998, 53, 597-598.
7. Devriese L. A., Haesebrouck F., Hommez J., Vandermeersch R.: A 25-year survey (1971-1996) of antibiotic susceptibility testing in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Belgium, with special reference to penicillinase. Vlam Diergeneesk. Tijdschr. 1997, 66, 170-173.
8. Diarra M. S., Cloutier A., Perree M., Petitclerc D., Lacasse P.: Bovine lactoferrin affects growth, morphology and  $\beta$ -lactamase activity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mammary gland. Proc. National Mastitis Council Annual Meeting. Atlanta, Georgia 2000, s. 188-190.
9. Erskine R. J., Walker R. D., Bolin C. A., Bartlett P. C., White D. G.: Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci. 2002, 85, 1111-1118.
10. Garino F., Costa E. O.: In vitro sensitivity pattern and betalactamase production of *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis cases. Proc. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Mastitis and Milk Quality. Vancouver, Canada 2001, s. 454-455.
11. Garrison L. L., Schukken Y. H., Hilton B.: Antibiotic susceptibility patterns for various bacterial intramammary pathogens over 15 years: results and analysis of a database. Proc. National Mastitis Council Annual Meeting. Atlanta, Georgia 2000, s. 215-216.
12. Gentilini E., Denamiel G., Ilarante P., Godaly S., Rebuerto M., DeGregorio O.: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 2000, 83, 1224-1227.
13. Hoeben D., Burvenich C., Heyneman R.: Antibiotics commonly used to treat mastitis and respiratory burst of bovine polymorphonuclear leukocytes. J. Dairy Sci. 1998, 81, 403-410.
14. Hryniewicz W.: Terapia przeciwbakteryjna u progu XXI wieku. Mikrobiologia Medycyna 1996, 4, 59-62.
15. Janicka G., Kłyszczko Cz., Porada J., Hareńska K.: Incidence of methicillin-resistant staphylococci in clinical material in 1994-1996. Med. Sci. Monit. 1999, 5, 304-308.
16. Kossaibati M. A., Hovi M., Esslemont R. J.: Incidence of clinical mastitis in dairy herds in England. Vet. Rec. 1998, 143, 649-653.
17. Lauhti-Lenttiö M., Sandholm M., Myllyls V., Honkanen-Buzalski T.: Antibacterial susceptibility of bovine mastitis pathogens tested directly in milk from infected quarters. J. Vet. Med. B. 41, 101-112, 1994.
18. Lopaciuk M., Dzierżanowska D.: Gronkowce metacyclinooporne: mechanizmy oporności, czynniki zjadliwości oraz metody genotypowania. Post. Mikrobiol. 2002, 41, 401-418.
19. Malinowski E., Kłossowska A., Kuźma K., Krukowski H.: Wrażliwość na antybiotyki bakterii wyisobnionych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów. Medycyna Wet. 1992, 48, 366-367.
20. Malinowski E., Pilaszek J., Kłossowska A., Sobolewska S., Sobolewski J.: Zmiany wrażliwości na antybiotyki bakterii wyisobnionych z klinicznych postaci mastitis u krów w latach 1987-1996. Medycyna Wet. 1997, 53, 722-725.
21. Malinowski E., Kłossowska A., Kaczmarowski M., Lassa H., Kuźma K.: Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows. Bull. Vet. Inst. Puławy 2002, 46, 289-294.
22. Malinowski E., Kłossowska A.: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. Wyd. PiWet. Puławy 2002, 1-96.
23. Malinowski E., Kłossowska A.: Oporność na antybiotyki patogenów mastitis u krów. Medycyna Wet. 2003, 59, 230-235.
24. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z. A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001, 118-119.
25. Mazura F.: Zjistování produkce betalaktamazy u kmenu *Staphylococcus aureus* izolovaných z mléka krav. Vet. Med. Praha 1990, 35, 267-274.
26. Myllyls V., Asplund K., Brofeldt E., Hirvelä-Koski V., Honkanen-Buzalski T., Junttila J., Kulkas L., Myllykangas O., Niskanen M., Saloniemi H., Sandholm M., Saranpää T.: Bovine mastitis in Finland in 1998 and 1995 – changes in prevalence and antimicrobial resistance. Acta vet. Scand. 1998, 39, 119-126.
27. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement. NCCLS Document M 1000-911 (ISBN 1-56238-426-0), NCCLS, Pennsylvania 19087-1898 USA 2001.
28. Oliveira A. P. de, Watts J. L., Salmon S. A., Aerestrup F. M.: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and in the United States. J. Dairy Sci. 2000, 83, 855-862.
29. Owens W. E., Watts J. L.: Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase testing of staphylococci isolated from dairy herds. J. Dairy Sci. 1988, 71, 1934-1939.
30. Owens W. E., Ray C. H., Watts J. L., Yancey R. J.: Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J. Dairy Sci. 1997, 80, 313-317.
31. Owens W. E., Nickerson S. C., Ray C. H.: Efficacy of parenterally or intramammarily administered Tilmicosin or Ceftiofur against *Staphylococcus aureus* mastitis during lactation. J. Dairy Sci. 1999, 82, 645-647.
32. Østeras O., Edge V. L., Martin S. W.: Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. J. Dairy Sci. 1999, 82, 1221-1231.
33. Paape M. J., Miller R. H., Ziv G.: Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. Am. J. vet. Res. 1991, 52, 363-366.
34. Pyörälä S. H., Pyörälä E. O.: Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998, 212, 407-412.
35. Pyörälä S., Taponen S., Jantunen A., Pyörälä E.: Efficacy of targeted 5-day parenteral and intramammary treatment of clinical *Staphylococcus aureus* mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant bacteria strains. Proc. IDF Inter. Symp. Immunology of Ruminant Mammary Gland. Stresa, Italy 2000, 382-384.
36. Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L., Pyörälä S.: The bovine udder and mastitis. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä, Finland, 169-186.
37. Sol J., Sampimon O. C., Snoep J. J., Schukken Y. H.: Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical staphylococcal mastitis with antibiotics. J. Dairy Sci. 1994, 77, 75-79.
38. Sol J., Sampimon O. C., Barkema H. W., Schukken Y. H.: Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 2000, 83, 278-284.
39. Taylor D. J.: Antimicrobial use in animals and its consequences for human health. Clin. Microbiol. Infect. 1999, 5, 119-124.
40. Thornsberry C., Burton P. J., Yee Y. C., Watts J. L., Yancey R. J.: The activity of combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens. Development of a disc diffusion test. J. Dairy Sci. 1997, 80, 413-421.
41. Trzcinski K., Tyski S., Zareba T., Hryniewicz W.: Oporność na chemioterapeutyki ważnych klinicznie bakterii izolowanych w Polsce w latach 1994-1995. Mikrobiologia Medycyna 1996, 4, 64-71.
42. Waage S.: Comparison of two regimens for treatment of clinical bovine mastitis caused by bacteria sensitive to penicillin. Vet. Rec. 1994, 141, 616-620.
43. Watts J. L., Salmon J. A.: Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce  $\beta$ -lactamase. J. Dairy Sci. 1997, 80, 788-791.
44. Wilson D. J., Sears P. M., Gonzalez R. N., Smith B. S., Schulte H. F., Bennett G. J., Das H. H., Johnson C. K.: Efficacy of florfenicol for treatment of clinical and subclinical bovine mastitis. Am. J. vet. Res. 1996, 57, 526-528.
45. Zecconi A., Smith K. L.: IDF position paper on ruminant mammary gland immunity. IDF Inter. Symp. Immunol. Ruminant Mammary Gland. Stresa, Italy 2000 s. 6-120.