

Antybiotykooporność i mechanizmy jej powstawania w przypadku zakażeń *Mycoplasma bovis* u bydła

EWELINA SZACAWA, ANNA HORECKA*, DARIUSZ BEDNAREK, KRZYSZTOF NIEMCZUK

Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin

Otrzymano 30.09.2013

Zaakceptowano 21.01.2014

Szacawa E., Horecka A., Bednarek D., Niemczuk K.
**Antibiotic resistance and the mechanisms of its development
in the case of *Mycoplasma bovis* infection in cattle**

Summary

Mycoplasma bovis is the smallest known bacterium that does not have a cell wall. It is therefore resistant to some antibiotics that inhibit the synthesis of the cell structure. Little is known about the mechanisms of antibiotic resistance in *M. bovis*, since it has no plasmids and there are insufficient data about the role of the biofilm formation by these bacteria. Previous studies have shown that the development of antibiotic resistance is due to gene mutations. Antibiotics generally considered as effective against *M. bovis* infection are macrolides, fluoroquinolones, tetracyclines, lincosamides, aminoglycosides, and chloramphenicol. Several recent studies, however, indicate that the efficacy of tetracyclines, macrolides, and lincosamides has diminished. Increased resistance to erythromycin, spectinomycin, and tilmicosin, antibiotics commonly used in the treatment of *M. bovis* infections, has also been reported. Among field strains of *M. bovis* no resistance or rare resistance has only been observed for enrofloxacin, florfenicol, tylosin, and tulathromycin. Considering the rapidly growing antibiotic resistance of the isolated strains of *M. bovis*, it is necessary to search for alternative compounds that could effectively inhibit these bacteria.

Keywords: *Mycoplasma bovis*, antibiotic resistance, antibiotics

Bakterie z rodzaju *Mycoplasma* należą do klasy *Mollicutes*, nie posiadają ściany komórkowej i charakteryzują się niską zawartością zasad G+C. Są to najmniejsze ze znanych bakterii o bardzo prymitywnej budowie genomu. Najmniejszy genom posiada *Mycoplasma genitalium* liczący ok. 580 kbp, natomiast – dla porównania – genom *Escherichia coli* ma wielkość ok. 5 Mbp (6, 19). Natomiast *M. bovis*, jedna z najważniejszych mykoplazm bydłowych, ma ok. 1 Mbp (28). Fakt, że bakterie te posiadają bardzo mały genom, gwarantuje im daleko idącą zmienność, objawiającą się m.in. łatwym powstawaniem pojedynczych mutacji obejmujących nie tylko poszczególne geny, ale mogących obejmować nawet cały genom (19). *Mycoplasma bovis* to drugi, najbardziej patogeny u bydła gatunek z rodzaju *Mycoplasma* zaraz po *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* SC wywołującej szczególnie niebezpieczną dla tego gatunku zwierząt zarazę płucną bydła (CBPP) (18). W zwalczaniu zakażeń *M. bovis* za możliwe do stosowania uważa się takie antybiotyki, jak: makrolidy, fluorochinolony, tetracykliny, linkozamidy, aminoglikozydy i chloramfenikol (14), jednak o rzeczywistej skuteczności

poszczególnych przedstawicieli każdej z wymienionych grup *in vivo* można wnioskować jedynie orientacyjnie, tj. na podstawie ich badania w warunkach *in vitro*. Należy jednak pamiętać, że różnice te mogą być znaczące, ograniczając tym samym skuteczne stosowanie antybiotykoterapii w praktyce. W warunkach naturalnych w organizmie zwierzęcia bytują różne gatunki drobnoustrojów. *M. bovis* występuje często w ścisłej zależności z bakteriami zwłaszcza z rodzaju *Pasteurella* i *Haemophilus*, które odgrywają ważną rolę w rozwoju i patogenezie syndromu oddechowego bydła (BRD) (3). Takie zjawisko występuje często, zważywszy na ubikwitalny charakter tej bakterii i jej udział w zakażeniach różnych grup wiekowych zwierząt w stadach bydła, dlatego też po wprowadzeniu jej do stada wolnego od zakażenia, np. za pośrednictwem nowo zakupionych zwierząt – nosicieli, jest ona trudna do eliminacji. Powodem tego jest złożony charakter chorób wywoływanych przez tę bakterię, a w szczególności częste komplikacje i infekcje towarzyszące. Ponadto przy ograniczonej liczbie skutecznych antybiotyków problem ten nabiera jeszcze większego znaczenia (4).

Minimalne stężenie antybiotyku hamujące wzrost drobnoustroju (MIC) można określić za pomocą metody seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym lub metody seryjnych rozcieńczeń na podłożu stałym. Parametr ten pozwala na zaklasyfikowanie badanych szczepów jako wrażliwe, umiarkowanie wrażliwe lub odporne na dany antybiotyk. Brak wystandaryzowanych procedur na określenie MIC antybiotyków za pomocą wyżej wymienionych metod dla drobnoustrojów klasy *Mollicutes* powoduje występowanie różnic w wartościach MIC oraz w interpretacji wyników pochodzących z poszczególnych laboratoriów (9).

Ogólnie mykoplazmy są odporne na antybiotyki β -laktamowe, takie jak penicyliny i cefalosporyny, co wynika z braku typowej dla bakterii właściwej ściany komórkowej, na którą te leki działają. Pojawia się też oporność na inne, powszechnie stosowane antybiotyki, np. fluorochinolony (16). Badania Siugzdaite i wsp. (24) dowodzą, że tylozyna i tulatromycyna mogą być z powodzeniem stosowane w leczeniu zespołu oddechowego bydła (BRD). Wspomniani autorzy, w odróżnieniu od Aylinga i wsp. (2) oraz Nicholasa (16), wykazali, że nie stwierdza się obecnie narastającej oporności mykoplazm w stosunku do tych związków. Tylozyna jest znanym od dawna antybiotykiem makrolidowym hamującym w komórce bakteryjnej proces translokacji poprzez hamowanie jednostki 50S rybosomu. Z kolei tulatromycyna jest półsyntetycznym antybiotykiem makrolidowym, z grupy triamilidów, charakteryzującym się wydłużonym czasem działania (do 9 dni w odniesieniu do najważniejszych patogenów układu oddechowego u bydła). Spowodowane jest to występowaniem trzech grup aminowych w strukturze związku (10). W komórce wiąże się z rybosomalnym RNA bakterii, hamując proces biosyntezy białka. Niektóre szczepy *M. bovis* pochodzące z Anglii wytworzyły oporność na wiele leków przeciwbakteryjnych, takich jak: makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy oraz tetracykliny. Niepokojący jest fakt, że można u tych bakterii wywołać antybiotykooporność *in vitro*, prowadząc hodowlę na poziomie poniżej poziomu MIC dla wszystkich leków przeciwbakteryjnych, również fluorochinolonów i makrolidów nowej generacji (3, 4).

Ostatnio w badaniach *in vitro* obserwuje się stopniowe narastanie oporności mykoplazm występujących u bydła na antybiotyki stosowane w leczeniu zakażeń powodowanych przez te drobnoustroje, tj.: erytromycynę, spektynomycynę, linkomycynę i tilmikozynę (2, 3, 7, 8, 11, 22, 27). Erytromycyna zaliczana jest do naturalnych antybiotyków makrolidowych wytwarzanych przez *Saccharopolyspora erythraea* (26). Makrolidy te zawierają C₁₂₋₁₆ rdzeń laktamowy. Mechanizm ich działania polega na blokowaniu biosyntezy białka poprzez odwracalne wiązanie z podjednostką 50S rybosomu i zaburzaniu procesu wydłużania łańcucha polipeptydowego. Wykazano też, że omawiane antybiotyki makrolidowe wykazują działanie synergistyczne z układem odpornościowym

zwierząt poprzez wzmocnienie aktywności fagocytów. Spektynomycyna z kolei jest antybiotykiem z grupy aminoglikozydów. Jej działanie polega na hamowaniu biosyntezy białka w komórce bakteryjnej, gdzie łączy się z podjednostką 30S rybosomu. Oprócz mykoplazm antybiotyk ten wykazuje silne działanie bakteriobójcze również na inne bakterie Gram-ujemne, takie jak *Escherichia coli* oraz *Salmonella* i *Pasteurella* sp. (21). Ponadto spektynomycyna w połączeniu z linkomycyną (preparat Linco-Spectin) posiada znacznie silniejsze, o charakterze addycyjnym, działanie bakteriobójcze na mykoplazmy (1). Natomiast tilmikozyna jest półsyntetycznym antybiotykiem makrolidowym działającym głównie bakteriostatycznie, a dopiero w dużych stężeniach wykazuje właściwości bakteriobójcze (21).

Średni poziom oporności mykoplazm zaobserwowano w stosunku do oksytetracykliny i chlorotetracykliny (8, 22). Związki te należą do antybiotyków tetracyklinowych, których mechanizm działania polega na zahamowaniu translacji RNA poprzez blokowanie jednostki 30S rybosomu i procesów fosforylacji (10). Oksytetracyklina wytwarzana przez *Streptomyces rimosus* (26) wykazuje szerokie spektrum działania. Poza działaniem bakteriostatycznym posiada też właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Stosowana jest w formie chlorowodoru lub dwuwodzianu (17). Natomiast chlorotetracyklina (aureomycyna) wytwarzana jest przez *Streptomyces aureofaciens* i podobnie jak oksytetracyklina może być stosowana w postaci chlorowodoru (10, 26).

Brak oporności lub oporność sporadycznie występującą zaobserwowano w badaniach odnośnie do *M. bovis* w warunkach *in vitro* jedynie dla enrofloksacyny i florfenikolu (7, 8, 11, 22). Enrofloksacyna zaliczana do fluorchinolonów wykazuje szerokie spektrum działania. Hamuje aktywność enzymu – gyrazy DNA warunkującej związanie podwójnej nici DNA. W efekcie transkrypcja DNA i biosynteza białek bakteryjnych zostają zahamowane. Natomiast florfenikol jest syntetycznym antybiotykiem o szerokim spektrum działania, hamującym biosyntezę białek drobnoustroju na poziomie rybosomalnym (10).

Badania dowiodły, że *Mycoplasma bovis* może nabywać oporność na antybiotyki w drodze mutacji genów kodujących enzymy (20). Oporność na niektóre antybiotyki mogą powodować np. mutacje punktowe w genie *parC* regionu *quinolone resistance-determining region* (QRDR), dając w rezultacie oporność na fluorochinolony (12, 23). Natomiast mutacja punktowa w genie *Gyr A*, który również występuje w regionie QRDR, powoduje powstanie średniego poziomu wrażliwości na fluorochinolony (12).

U niektórych bakterii, w tym również mykoplazm, mniejsza wrażliwość na warunki środowiskowe (nasłonecznienie, wzrost temperatury otoczenia, obniżona wilgotność, działanie antybiotyków) wiązać się może ze zdolnością tych mikroorganizmów do tworzenia biofilmu. Uważa się, że bakterie, które bytują w formie

biofilmu, są średnio o 10 do 1000 × bardziej odporne na działanie antybiotyków niż w zwykłych warunkach (13). Tworzenie biofilmu przez mykoplazmy zostało po raz pierwszy zbadane przez McAuliffe i wsp. w 2006 r. (15). Dowiedli oni, że również *M. bovis* jest zdolna do formowania biofilmu, jednakże w przypadku tego gatunku mykoplazm jego wpływ na wartość MIC ocenianych antybiotyków nie miał aż takiego znaczenia jak początkowo oczekiwano. Wykazano jedynie, że stosowanie oksytetracykliny w kilkukrotnie zwiększonych powyżej MIC dawkach powoduje zauważalne zmniejszenie wielkości ochronnej otoczki polisacharydowej tworzonej z udziałem biofilmu przez *M. bovis*. Ponadto wykazano, że *M. bovis* nie posiada plazmidów, które są powszechnie uznawane za narzędzie umożliwiające horyzontalny transfer genów u bakterii oraz ewolucję genomu w kierunku powstawania oporności na antybiotyki (5).

Wzrastający zakres oporności drobnoustrojów na antybiotyki (tab. 1) oraz kontrowersje związane z ich dotychczasowym, nie zawsze właściwym, stosowaniem w praktyce klinicznej wymusiły potrzebę poszukiwania nowych, alternatywnych metod i leków do zwalczania infekcji, w tym zwłaszcza na tle *M. bovis*. Jednym z kierunków poszukiwań jest badanie nowych, niskocząsteczkowych związków chemicznych posiadających zdolność hamowania wzrostu tych bakterii, jak też działanie nastawione na bardziej precyzyjny dobór dawki i czasu podawania leku. Wykorzystanie niskocząsteczkowych związków chemicznych ułatwić może w przyszłości prowadzenie ekologicznej hodowli zwierząt, która przez to będzie bardziej bezpieczna i efektywna. Badania prowadzone ostatnio przez Soehnlena i wsp. (25) pokazały, że 32 spośród 480 przebadanych związków chemicznych jest zdolnych do zahamowania wzrostu omawianych bakterii. Do dalszych badań wybrano 7 związków chemicznych, m.in. dihydrotachysterol, kwas L-asparaginowy i kwas metanosulfonowy. Wykazano też, że poziom zahamowania wzrostu drobnoustrojów jest zależny od podanej dawki związku.

Reasumując, mykoplazmy ze względu na swoje charakterystyczne cechy budowy, tj. brak ściany komórkowej, pozostają niewrażliwe na określone grupy antybiotyków (penicyliny, cefalosporyny), których mechanizm działania wiąże się z hamowaniem syntezy białek strukturalnych tej części komórki. Ponadto fakt, że bytują one w różnych układach i narządach zwierząt, często w koinfekcji z innymi bakteriami chorobotwórczymi i wirusami dodatkowo utrudnia działanie zwykle dostatecznie skutecznych antybiotyków. Niewiele wiadomo o mechanizmach antybiotykooporności *M. bovis*, gdyż brak u niej plazmidów, które powszechnie uznawane są za kluczowe w jej powstawaniu u innych gatunków bakterii. Z kolei biofilm przez nie tworzony nie ma aż takiego znaczenia w oporności na antybiotyki, jak ma to miejsce u innych bakterii o podobnych zdolnościach. Obecnie

Tab. 1. Wartości MIC50 dla *M. bovis* wybranych antybiotyków (4)

Antybiotyk	Wartość MIC50 (µg/ml)
erytromycyna	> 32
oksytetracyklina	2
spektynomycyna	8
linkomycyna	> 32
enrofloksacyna	0,25
florfenikol	4
tylmikozyna	> 64
ciprofloksacyna	1
klindamycyna	> 32
danofloksacyna	0,25
chloramfenikol	8
norfloksacyna	8
tobramycyna	> 32
cefalotyna	> 64
gentamycyna	4
rifampicyna	32
streptomycyna	> 32
amikacyna	32
trimetoprim	> 32

wiadomo jedynie, że dochodzić może do tego na drodze mutacji punktowych oraz że antybiotykooporność mykoplazm wynika w dużej mierze z budowy jej komórki. Niepokoją przy tym publikowane ostatnio liczne dane o szybko narastającej antybiotykooporności u *M. bovis*. Najnowsze prace z tego zakresu donoszą, że antybiotyki, które uznawano dotychczas za efektywne w leczeniu chorób wywoływanych przez *M. bovis*, tj. tetracykliny, makrolidy lub linkozamidy są obecnie znacznie mniej skuteczne, a w niektórych przypadkach nie działają wcale. Pozostaje więc do wyboru coraz mniej antybiotyków zdolnych zwalczyć wspomniane infekcje, dlatego też poszukiwanie alternatywnych rozwiązań mogących skutecznie hamować rozprzestrzenianie się zakażeń *M. bovis* w hodowli bydła wydaje się w pełni uzasadnione i niezbędne. Stąd istnieje stała potrzeba odkrywania kolejnych mechanizmów związanych z antybiotykoopornością mykoplazm w celu skuteczniejszej ich eliminacji. Dzięki nowym badaniom będzie można poznać te mechanizmy i przeciwdziałać im w stosunku do leków już znanych oraz tych stosowanych w przyszłości. Należy też określić, czy geny odpowiadające za zjawisko powstawania antybiotykooporności łatwo przenoszą się nie tylko na inne szczepy *M. bovis*, ale też na inne gatunki *Mycoplasma* sp. lub bakterii właściwych. W tej dziedzinie konieczne są dalsze badania ukierunkowane zwłaszcza na poznanie roli odpowiednich genów odpowiedzialnych u mykoplazm za to zjawisko oraz innych mechanizmów współdziałających i umożliwiających ich przeżywanie w środowisku.

Piśmiennictwo

1. *Alavi-Shoushtari S. M., Ahmadi M., Shahvarpour S., Kolahian S.*: Effects of tiamulin, neomycin, tetracycline, fluorophenicol, penicillin G, Linco-Spectin, erythromycin and oxytetracycline on controlling bacterial contaminations of the river buffalo (*Buballus bubalis*) semen. *Pak. J. Biol. Sci.* 2007, 10, 3200-3204.
2. *Ayling R., Nicholas R., McAuliffe L.*: *Mycoplasma diseases of ruminants*. CAB International. 2008, 1-239.
3. *Ayling R. D., Baker S. E., Peek M. L., Simon A. J., Nicholas R. A. J.*: Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.* 2000, 146, 745-747.
4. *Ayling R. D., Nicholas R. A. J.*: Zastosowanie antybiotyków w leczeniu infekcji wywołanych przez mykoplazmy u bydła, [w:] Najważniejsze czynniki etiologiczne, patogenezna i najnowsze trendy w profilaktyce i terapii syndromu oddechowego bydła (BRD). Monografia pod red. Bednarek D. PIWet-PIB, Puławy 2008, 42-47.
5. *Breton M., Tardy F., Dordet-Frisoni E., Sagne E., Mick V., Renaudin J., Sirand-Pugnet P., Citti C., Blanchard A.*: Distribution and diversity of mycoplasma plasmids: lessons from cryptic genetic elements. *BMC Microbiol.* 2012, 12, 1-15.
6. *Cress B. F., Greene Z. R., Linhardt R. J., Koffas A. G. K.*: Draft genome sequence of *Escherichia coli* strain ATCC 23506 (serovar O10:K5:H4). *Genome Announc.* 2013, 1, 1-2.
7. *Francoz D., Fortin M., Fecteau G., Messier S.*: Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Vet. Microbiol.* 2005, 105, 57-64.
8. *Gerchman I., Levisohn S., Mikula I., Lysnyansky I.*: In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle. *Vet. Microbiol.* 2009, 137, 268-275.
9. *Hannan P. C. T.*: Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.* 2000, 31, 73-395.
10. *Herman Z., Kostowski W.*: *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
11. *Hirose K., Kobayashi H., Ito N., Kawasaki Y., Zako M., Kotani K., Ogawa H., Sato H.*: Isolation of *Mycoplasmas* from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. *J. Vet. Med.* 2003, B 50, 347-351.
12. *Lysnyansky I., Mikula I., Gerchman I., Levisohn S.*: Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 2009, 53, 4911-4914.
13. *Mah T.-F. C., O'Toole G. A.*: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001, 9, 34-39.
14. *Maunsell F. P., Donovan G. A., Risco C., Brown M. B.*: Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine* 2009, 27, 2781-2788.
15. *McAuliffe L., Ellis R. J., Mile K., Ayling R. D., Nicholas A. J.*: Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* 2006, 152, 913-922.
16. *Nicholas R. A. J.*: The other *M. bovis*: *Mycoplasma bovis*. *UK Vet.* 2010, 15, 1-3.
17. *Olszewska M.*: Mechanizm działania i zastosowanie oksytetracykliny w chorobach skóry. *Wiad. Lek.* 2006, LIX, 11-12.
18. *Poumarat F., Le Grand D., Philippe S., Calavas D., Schelcher F., Cabanié P., Tessier P., Navetat H.*: Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. *Vet. Microbiol.* 2001, 80, 23-35.
19. *Razin S., Yogev D., Naot Y.*: Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 64, 1094-1156.
20. *Reinhardt A. K., Bebear C. M., Kobisch M., Kempf I., Gautier-Bouchardon A. V.*: Characterization of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV involved in quinolone resistance of *Mycoplasma gallisepticum* mutants obtained in vitro. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 2002, 46, 590-593.
21. *Roliński Z.*: *Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 2001.
22. *Rosenbush R. F., Kinyon J. M., Apley M., Funk N. D., Smith S., Hoffman L. J.*: In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 436-441.
23. *Shabat M. B., Mikula I., Gerchman I., Lysnyansky I.*: Development and evaluation of a novel single-nucleotide-polymorphism real-time PCR assay for rapid detection of fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48, 2909-2915.
24. *Stugzdaitė J., Gabinaitienė A., Kerziene S.*: Susceptibility of *Mycoplasma bovis* field isolates to antimicrobial agents. *Vet. Med.* 2012, 57, 575-582.
25. *Soehlen M. K., Tran M. A., Lysczek H. R., Wolfgang D. R., Jayarao B. M.*: Identification of a novel small molecule antimicrobials targeting *Mycoplasma bovis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011, 66, 574-577.
26. *Solecka J., Ziemska J., Rajnisz A., Laskowska A., Guśpiel A.*: Promienionoc – występowanie i wytwarzanie związków biologicznie czynnych. *Post. Mikrobiol.* 2013, 52, 83-91.
27. *Uemura R., Sueyoshi M., Nagamoto H.*: Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2010, 72, 1661-1663.
28. *Wise K. S., Calcutt M. J., Foecking M. F., Röske K., Madupu R., Methé B. A.*: Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG 45 (ATCC 25523). *Infect. Immun.* 2011, 982-983.

Adres autora: mgr inż. Ewelina Szacawa, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ewelina.szacawa@piwet.pulawy.pl