

Oporność na antybiotyki patogenów izolowanych z przypadków mastitis u krów

TOMASZ PIECH, WŁADYSŁAW WAWRON, MARIOLA BOCHNIARZ,
LESZEK KRAKOWSKI, PIOTR BRODZKI

Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Otrzymano 29.04.2014

Zaakceptowano 16.07.2014

Piech T., Wawron W., Bochniarz M., Krakowski L., Brodzki P.
Antibiotic resistance of pathogens isolated from bovine mastitis cases

Summary

The studies on resistance to selected antibiotics were conducted on a total of 5154 isolates, including 2661 *Staphylococcus* sp., 2349 *Streptococcus* sp. and 144 *E. coli*, obtained from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. Milk came from dairy farms in the Lubelskie Voivodeship. During the five-year research period (2007-2011), the isolated bacteria proved susceptible to the following antibiotic medications: penicillin, streptomycin, tetracycline, neomycin, ampicillin, amoxicillin and clavulanic acid, cephalexin, cefoperazone and lincomycin. Throughout the study period, the highest percentage of staphylococcus were resistant to tetracycline (23.8-38.5%) and lincomycin (16.4-33%), whereas the lowest number of staphylococcus isolates were resistant to cefoperazone (7.2% on average). With regard to streptococci, the least amount of isolates were resistant to amoxicillin (6% on average), whereas the highest rate of resistance was observed for streptomycin (49.4-70.8%), followed by neomycin (51.6% on average). Relatively low sensitivity to the antibiotics was displayed by *E. coli* isolates. Nearly 100% of the isolates showed resistance to penicillin. A high percentage of isolates (89.2% on average) proved resistant to lincomycin, as well. In total, the lowest number of isolates were resistant to cefoperazone (7.3% on average) and neomycin (14.9% on average). In the study period, no substantial deviations were observed in the percentage of isolates of each bacteria type resistant to a given antibiotic.

Keywords: mastitis, antibiotic resistance, antibiotic drug

Zapalenia gruczołu mlekowego są przyczyną olbrzymich strat ekonomicznych dla producentów mleka i zakładów przemysłu mleczarskiego (21). W zależności od nasilenia objawów chorobowych można je podzielić na zapalenia kliniczne i podkliniczne. Kliniczna postać *mastitis* charakteryzuje się występowaniem wyraźnych zmian w wyglądzie i składzie fizykochemicznym mleka, wzrostem liczby komórek somatycznych i bakterii oraz zmianami w obrębie tkanki gruczołowej wymienia, a nawet objawami ogólnymi. Postaci podklinicznej nie towarzyszą żadne widoczne objawy choroby, a jedynym symptomem jest wzrost LKS oraz obecność drobnoustrojów w mleku (1, 22).

Terapia zapaleń wymion u krów oparta jest głównie na dowymieniom podawaniu antybiotyków, niestety, skuteczność leczenia nie zawsze jest satysfakcjonująca. Przyczyny braku pozytywnego efektu terapeutycznego upatruje się między innymi w stale rosnącej oporności bakterii na antybiotyki, nieodpowiednim czasie rozpoczęcia terapii, wyborze antybiotyku o małej skuteczności działania, braku sprawności układu immunologicznego zwierzęcia oraz przebiegu choroby (14).

Jednym ze sposobów podnoszenia skuteczności leczenia i profilaktyki zapaleń wymion jest dobór jak najbardziej skutecznych antybiotyków. Efekt ten można uzyskać poprzez identyfikację drobnoustrojów wywołujących stan zapalny wymienia oraz określenie ich oporności na dostępne antybiotyki. Stale zmieniająca się wrażliwość bakterii na antybiotyki uzasadnia prowadzenie badań monitorujących z tego zakresu, co w znacznym stopniu przyczynić się może do ograniczenia strat wynikających z leczenia bez określania wrażliwości. Aktualne dane przydatne są także do odpowiedniego doboru antybiotyków stosowanych w okresie zasuszenia.

Stale prowadzenie badań monitoringowych oporności bakterii na antybiotyki uznane zostały, między innymi przez Światową Organizację Zdrowia i Parlament Europejski, za działania priorytetowe (9). Z jednej strony daje to możliwość dysponowania aktualnymi danymi oporności bakterii na antybiotyki, z drugiej zaś – jest podstawą do racjonalnego stosowania i nie nadużywania antybiotyków w weterynarii, zwłaszcza w sektorze produkcji żywności zwierzęcego pocho-

dzenia. Istnieją bowiem przykłady wzrostu oporności bakterii na antybiotyki po stosowaniu ich w celach leczniczych u zwierząt, które potem przenoszone są na ludzi (7).

Celem przeprowadzonych badań było określenie oporności na wybrane antybiotyki drobnoustrojów wyizolowanych z klinicznych i podklinicznych postaci zapalenia wymienia krów. Wykorzystane do badań antybiotyki dostępne są w gotowych preparatach dowymieniowych, stosowanych do leczenia zapaleń wymion u krów w okresie laktacji oraz w zasuszeniu.

Materiał i metody

Badanie zostało przeprowadzone na 5154 izolatach drobnoustrojów, w tym 2661 gronkowców, 2349 paciorkowców oraz 144 *E. coli* wyizolowanych z klinicznych i podklinicznych przypadków zapaleń wymion krów w latach 2007-2011. Próbkę mleka pobierano zgodnie z przyjętą procedurą, z gospodarstw znajdujących się na terenie woj. lubelskiego. Po uprzednim oczyszczeniu, wymyciu i osuszeniu skóry wymienia oraz dezynfekcji 70% roztworem alkoholu ujęcia strzyków mleko zostało pobrane do sterylnych, dokładnie oznaczonych próbek bez dodatku konserwantów, schłodzone do temperatury 4°C i dostarczone do laboratorium Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt.

Badanie bakteriologiczne mleka przeprowadzono zgodnie ze standardowymi procedurami (13): posiew mleka na podłoże agarowe z dodatkiem 5% krwi baraniej, inkubacja 24 h w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C, ocena morfologii kolonii bakteryjnych na podłożu hodowlanym i komórek bakteryjnych w preparatach barwionych metodą Grama oraz wykonanie próby na katalazę (3% woda utleniona, Polfa). Równolegle prowadzono hodowlę bakterii na podłożach wybiórczo-różnicujących: Chapmana (*Staphylococcus* sp.), MacConkeya i Endo (pałeczki Gram-ujemne), Edwardsa i CAMP-test (*Streptococcus* sp.).

Ocenę wrażliwości drobnoustrojów na wybrane antybiotyki przeprowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną na podłożu Mueller-Hinton, zgodnie ze wskazaniami CLSI (4). Do badań użyto krążków bibułowych firmy Oxoid Limited zawierających następujące antybiotyki: penicylinę (10 µg), streptomycynę (10 µg), tetracyklinę (30 µg), neomycynę (30 µg), ampicylinę (10 µg), amoksycylinę z kwasem klawulanowym (30 µg), cefaleksynę (30 µg), cefoperazon (75 µg) oraz linkomycynę (15 µg).

Płytki z krążkami pozostawiono na 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie poddano 24-godzinnej

inkubacji w temperaturze 35°C. Miarę wrażliwości badanego szczepu stanowiła wielkość strefy zahamowania jego wzrostu wokół krążka nasyczonego antybiotykiem określona przez CLSI, na podstawie której dokonano podziału na szczepy wrażliwe (+), średniowrażliwe (+/-) i odporne (-).

Wyniki i omówienie

Oporność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* na wybrane antybiotyki przedstawiono w tab. 1. Z danych w niej zawartych wynika, że w badanym okresie największy odsetek gronkowców był odporny na tetracyklinę – od 23,8% do 38,5% oraz linkomycynę, średnio 26,4% (od 16,4% w 2008 r. do 33% w 2011 r.). Najmniej izolatów opornych w badaniach *in vitro* było na cefoperazon. W żadnym roku odsetek gronkowców opornych na ten antybiotyk nie przekroczył 9% (średnio 7,2%). Pozostałe antybiotyki cechowały się podobnym odsetkiem izolatów opornych, wynoszącym średnio od 13,3% w przypadku amoksycyliny do 19,1% dla streptomycyny.

W tabeli 2 przedstawiono kształtowanie się oporności na antybiotyki izolatów paciorkowców. Wynika

Tab. 1. Oporność na wybrane antybiotyki gronkowców wyizolowanych z przypadków *mastitis* u krów w latach 2007-2011

Antybiotyki	2007	2008	2009	2010	2011	Razem
	(n = 626)	(n = 523)	(n = 557)	(n = 458)	(n = 497)	(n = 2661)
	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %
Penicylina	16,8	2,1	19,2	25,3	28,8	18,4
Streptomycyna	20,3	17,1	12,9	19,4	26,0	19,1
Tetracyklina	23,8	25,4	34,0	38,5	31,6	30,7
Neomycyna	8,5	8,6	15,7	20,8	14,0	13,5
Ampicylina	13,7	19,5	17,4	21,0	18,4	18,0
Amoksycylina z kwasem klawulanowym	12,5	9,9	13,9	14,5	15,9	13,3
Cefaleksyna	13,2	16,2	15,9	15,1	15,5	15,2
Cefoperazon	5,5	7,5	6,8	7,4	8,8	7,2
Linkomycyna	26,4	16,4	24,2	32,0	33,0	26,4

Tab. 2. Oporność na wybrane antybiotyki paciorkowców wyizolowanych z przypadków *mastitis* u krów w latach 2007-2011

Antybiotyki	2007	2008	2009	2010	2011	Razem
	(n = 530)	(n = 620)	(n = 576)	(n = 283)	(n = 340)	(n = 2349)
	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %
Penicylina	8,9	5,5	2,8	16,3	12,7	9,2
Streptomycyna	60,5	57,9	49,4	53,0	70,8	58,3
Tetracyklina	32,9	30,5	33,6	47,0	34,0	36,0
Neomycyna	49,9	46,1	45,5	71,1	68,1	56,1
Ampicylina	7,7	9,0	5,4	11,4	12,0	8,3
Amoksycylina z kwasem klawulanowym	5,0	5,1	2,7	8,6	8,4	6,0
Cefaleksyna	13,8	16,4	24,4	20,7	15,7	18,2
Cefoperazon	7,9	8,8	4,9	8,4	5,9	7,2
Linkomycyna	18,0	36,7	13,8	32,0	36,8	27,5

z niej, że największą skutecznością cechowała się amoksyacylina, średnio 6% izolatów opornych. Niewielki odsetek izolatów paciorkowców opornych notowano także w przypadku cefoperazonu – od 4,9% do 8,8% (średnio 7,2%), ampicyliny 5,4-12,0% (średnio 8,3%) oraz penicyliny 2,8% w 2009 r. do 16,3% w 2010 r. (średnio 9,2%). Najwięcej paciorkowców było opornych na streptomycynę – od 49,4% w 2009 r. do 70,8% w 2011 r. Podobnie niską skutecznością cechowała się neomycyna (średnio 56,1% opornych izolatów). W przypadku pozostałych antybiotyków odsetek paciorkowców opornych kształtował się w zakresie od 18,2% dla cefaleksyny do 36,0% dla tetracykliny.

Dane dotyczące oporności pałeczek *E. coli* na antybiotyki przedstawiono w tabeli 3. Wynika z nich, że w badanym okresie niemalże 100% *Escherichia coli* było niewrażliwych na działanie penicyliny. Równie wysoki odsetek izolatów opornych był na linkomycynę (średnio 89,2%). Oporność *E. coli* na pozostałe antybiotyki była różna i wahała się od 21,2% w przypadku streptomycyny do 48,6% w stosunku do ampicyliny. Najmniej izolatów opornych było na cefoperazon (średnio 7,3%) oraz neomycynę (średnio 14,9%). Tym samym antybiotyki te cechowały się najwyższą efektywnością działania przeciwko temu drobnoustrojowi.

Długotrwałe i powszechne stosowanie antybiotyków w terapii *mastitis* krów doprowadziło do powstania wieloopornych szczepów bakterii. Przyczyną narastania lekooporności jest przede wszystkim nadużywanie antybiotyków w leczeniu i profilaktyce zakażeń bakteryjnych, stosowanie leków bez uprzedniej identyfikacji czynnika etiologicznego i określenia jego lekooporności, ale także pojawienie się u drobnoustrojów nowych, nie do końca poznanych mechanizmów oporności.

Bakterie posiadają naturalną lub nabytą oporność na antybiotyki. Większe znaczenie w praktyce ma oporność nabyta przez drobnoustroje, która rozwija się w wyniku mutacji lub nabywania obcego DNA, czyli przenoszenia genów oporności. Oporność naturalna wynika natomiast z biologii organizmu danego drobnoustroju. Może być ona związana m.in. z nieprzepuszczalną dla leku ścianą komórkową czy też wytwarzaniem enzymów inaktywujących antybiotyki (3, 8, 10). Przykładem stanowiącym mogą pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, które posiadają naturalną oporność na linkomycynę, klindamycynę i erytromycynę. Potwierdzają to wyniki badań własnych, gdzie prawie 90% izolatów *E. coli* było opornych na linkomycynę.

Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów oporności drobnoustrojów jest ich zdolność do wytwarza-

Tab. 3. Oporność na wybrane antybiotyki *E. coli* wyizolowanych z przypadków *mastitis* u krów w latach 2007-2011

Antybiotyki	2007	2008	2009	2010	2011	Razem
	(n = 27)	(n = 29)	(n = 24)	(n = 35)	(n = 29)	(n = 144)
	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %	Oporne %
Penicylina	100,0	100,0	100,0	97,1	96,6	98,7
Streptomycyna	22,2	20,0	18,5	12,9	12,2	21,2
Tetracyklina	25,9	26,7	29,2	31,4	32,1	29,1
Neomycyna	11,1	21,4	16,0	14,7	11,1	14,9
Ampicylina	51,9	47,1	53,6	44,1	46,4	48,6
Amoksyacylina z kwasem klawulanowym	37,0	45,7	28,0	47,1	44,8	38,5
Cefaleksyna	41,4	43,2	45,0	44,1	42,3	43,2
Cefoperazon	0,0	11,1	13,0	8,8	3,6	7,3
Linkomycyna	89,4	89,0	87,0	88,2	92,3	89,2

nia enzymów inaktywujących działanie antybiotyku. Wiele szczepów gronkowców oraz *E. coli* wytwarza β -laktamazy, które hydrolizują pierścień β -laktamowy w antybiotykach β -laktamowych. Cecha ta ujawnia się w sposób niezależny od kontaktu bakterii z antybiotykiem ani też częstotliwości jego stosowania, istniała bowiem przed wprowadzeniem penicyliny. W badaniach własnych zanotowano niemalże 100% oporność izolatów *E. coli* na penicylinę, co koreluje z wynikami badań własnych przeprowadzonych w latach 2001-2006 oraz wynikami innych autorów (23). Odsetek opornych izolatów tego patogenu na pozostałe antybiotyki β -laktamowe był również wysoki i wynosił, odpowiednio dla: ampicyliny 48,6%, amoksyacyliny 38,5% i cefaleksyny 43,2%.

Najważniejszym mechanizmem oporności gronkowców na antybiotyki beta-laktamowe, obok wytwarzania enzymu β -laktamazy, jest oporność uwarunkowana syntezą zmienionego białka PBP2 zwanego białkiem PBP2a lub PBP2^{''}, o obniżonym powinowactwie do tej grupy antybiotyków. Białko to przejmuje funkcje innych białek wiążących penicylinę (PBP) z inaktywowanych przez antybiotyki. Synteza PBP2a uwarunkowana jest integracją do chromosomu gronkowca obcego fragmentu DNA zawierającego gen *mecA*. Zmiana białka PBP implikuje powstanie oporności na wszystkie antybiotyki β -laktamowe (penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy) (2, 12, 20).

Przeprowadzone badania bakteriologiczne mleka w Finlandii w latach 1998-2005 wykazały, że zdecydowanie zwiększyła się liczba szczepów gronkowców opornych przynajmniej na 1 antybiotyki (z 27% do 50%) (16, 19). Ponadto w ostatnim czasie wzrosła ilość szczepów gronkowców wytwarzających β -laktamazy oraz szczepów z genem *mecA*, niewrażliwych na wszystkie grupy antybiotyków β -laktamowych. Znaczącą liczbę szczepów gronkowców opornych na antybiotyki β -laktamowe uzyskali również inni autorzy (6, 15, 18). Badania własne nie potwierdziły tych

doniesień, odsetek izolatów gronkowców opornych na działanie antybiotyków β -laktamowych był bowiem stosunkowo niewielki. Podobne wyniki uzyskali także inni autorzy (11, 17).

Z przeprowadzonych badań wynika, że w przeciągu 5 lat badań stwierdzono niekiedy znaczące odchylenia w odsetku izolatów poszczególnych rodzajów bakterii opornych na dany antybiotyk. Porównując średnie oporności izolatów bakterii do wyników uzyskanych w poprzednim okresie (lata 2001-2006) (23), nie stwierdzono jednak wyraźnego wzrostu ilości drobnoustrojów opornych na badane antybiotyki, a w niektórych przypadkach nawet zwiększenie odsetka izolatów wrażliwych. Podobne wyniki uzyskali także inni autorzy (5). Sugeruje to, że antybiotyki są coraz bardziej roztropnie stosowane w leczeniu *mastitis* u krów. Wynikać to może z większej dostępności do programów edukacyjnych, możliwości wykonywania badań bakteriologicznych, ale także konieczności dostosowania się producentów mleka do surowych przepisów regulujących warunki pozyskiwania mleka w gospodarstwach.

Podsumowując należy stwierdzić, że stały monitoring wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki jest jednym z najważniejszych elementów programu zwalczania *mastitis* w stadach krów mlecznych. Z jednej strony daje to możliwość dysponowania aktualnymi danymi dotyczącymi oporności poszczególnych rodzajów drobnoustrojów na określone grupy antybiotyków. Wydaje się to szczególnie przydatne w ostrych, klinicznych przypadkach *mastitis*, kiedy konieczne jest podanie do wymienia antybiotyku bez oznaczenia jego lekowrażliwości. Z drugiej strony – badania antybiotykooporności stanowią podstawę do racjonalnego stosowania antybiotyków u zwierząt i ograniczają w ten sposób możliwość przenoszenia opornych szczepów drobnoustrojów z żywnością zwierzęcego pochodzenia na człowieka.

Piśmiennictwo

1. *Anakalo S., Gathoni K.*: Assessment of the California mastitis test usage in smallholder dairy herds and risk of violative antimicrobial residues. *J. Vet. Sci.* 2004, 5, 5-9.
2. *Bartoszewicz-Potyrala M., Przado-Mordarska A.*: Cechy gronkowców koagulazo-ujemnych warunkujące ich chorobotwórczość. *Postępy Mikrobiologii* 2002, 41, 351-366.
3. *Bush K., Jackoby G. A., Mendeiros A. A.*: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1211-1233.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard M31-A3. CLSI, Wayne, USA 2008.
5. *Erskine R. J., Walter 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.
6. *Gentilini E., Denamiel G., Betancor A., Rebuelto M., Rodriguez M., De Torrest R. A.*: Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 1913-1917.
7. *Guardabassi L., Jansen L. B., Kruse H. Ed.*: Guide to Antimicrobial use in Animals. Blackwell Publishing 2008, 1-223.
8. *Jacoby G. A.*: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41, 120-126.
9. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal* 2009, 7, 1372.
10. *Kowalska-Krochmal B.*: Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2000, 9, 309-322.
11. *Lassa H., Kubiak J., Malkińska-Horodyska M.*: Bakterie najczęściej izolowane z klinicznych postaci mastitis u krów oraz ich wrażliwość na antybiotyki. *Życie Wet.* 2013, 88, 651-653.
12. *Łopaciuk U., Dzierżanowska D.*: Gronkowce metycylinooporne: mechanizmy oporności, czynniki zjadliwości oraz metody genotypowania. *Postępy Mikrobiologii* 2002, 41, 401-418.
13. *Malinowski E., Klossowska A.*: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. *PIW Puławy* 2002, s. 42.
14. *Malinowski E., Klossowska 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.
15. *Moon J. S., Lee A. R., Kang H. M., Lee E. S., Joo Y. S., Park Y. H., Kim M. N., Paik Y. H., Koo H. C.*: Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 1176-1185.
16. *Myllys V., Asplund K., Brofeldt E., Hirvela-Koski V., Honkanen-Buzalski T., Junttila J., Kulkas L., Myllykangas O., Niskanen H., Saloniemä H., Sandholm M., Saranpää T.*: Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 – changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.* 1998, 39, 119-126.
17. *Oliveira L., Langoni H., Hulland C., Ruegg P. L.*: Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 2012, 95, 1913-1920.
18. *Persson Waller K., Aspan A., Nyman A., Persson Y., Grönlund Andersson U.*: CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 2011, 152, 112-116.
19. *Pitkälä A., Haveri M., Pyörälä S., Myllys V., Honkanen-Buzalski T.*: Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 2433-2441.
20. *Sawant A. A., Gillespie B. E., Oliver S. P.*: Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet. Microbiol.* 2009, 134, 73-81.
21. *Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F.*: Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 2003, 34, 475-491.
22. *Sol J., Sampimon O. C., Hartam E., Barkema H. W.*: Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Vet. Microbiol.* 2002, 85, 241-249.
23. *Wawron W., Piech T., Bochniarz M.*: Wrażliwość na antybiotyki patogenów izolowanych z przypadków mastitis u krów. *Med. Weter.* 2008, 64, 1132-1135.

Adres autora: dr Tomasz Piech, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin; e-mail: tomasz.piech@up.lublin.pl