

Artykuł recenzowany

Diagnostyka oraz wrażliwość na antybiotyki drobnoustrojów wyizolowanych z klinicznych przypadków mastitis u bydła

Danuta Czernomysy-Furowicz,
Jolanta Karakulska, Magdalena Ferlas,
Jacek Borkowski, Paweł Nawrotek,
Antoni J. Furowicz

AR w Szczecinie

Bezpośrednią przyczyną powstawania zapalenia gruczołu mlekowego jest zakażenie specyficznymi drobnoustrojami chorobotwórczymi lub oportunistycznymi. Najczęściej są to bakterie: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Corynebacterium pyogenes* oraz drożdżaki z rodz. *Candida* [4, 12]. Zakażenie następuje przez kanał strzykowy (infekcja galaktogenna) i przez uszkodzoną skórę. Wszystkie drobnoustroje wywołujące zapalenie wymienia znajdują w gruczole mlekowym sprzyjające środowisko do wzrostu [16].

Do zakażenia gruczołu mlekowego paciorkowcami dochodzi przez kanał strzykowy. Najczęściej izolowany z przypadków mastitis paciorkowiec bezmleczności (*Streptococcus agalactiae*), ze względu na ograniczone możliwości przeżycia w środowisku zewnętrznym, rozprzestrzenia się w trakcie doju poprzez ręce dojarza, ścierki do czyszczenia wymion i kubki udojowe. Z kolei paciorkowce *Streptococcus uberis* i *Streptococcus dysgalactiae* występują w środowisku zewnętrznym [17].

Zakażenie wymienia gronkowcami następuje zarówno drogą galaktogenną, jak i poprzez skaleczenia skóry wymienia. Gronkowce posiadają zdolność wnikania do głębszych partii tkanki gruczolowej, gdzie tworzą zasklepione skupiska, dlatego też oddziaływanie antybiotyków, stosowanych w trakcie

leczenia mastitis, może być utrudnione [2]. Z kolei zapalenie wymienia na tle bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* może prowadzić do zaburzeń ogólnoustrojowych. Oprócz zakażenia drogą galaktogenną nie wyklucza się również zakażenia hematogenne tymi drobnoustrojami, które do krwioobiegu przedostają się z jelita. Jednym z przykładów takich infekcji jest kolimastitis [12].

Zapalenie wymienia wywoływane przez drożdże z rodzaju *Candida* występuje często w wyniku długotrwałej antybiotykoterapii. Powstająca wówczas nisza zasiedlana jest przez te drobnoustroje. Drożdże wykazujące naturalną oporność na antybiotyki przeciwbakteryjne mogą wykorzystywać je jako łatwo dostępne źródło azotu [6].

Stałe doskonalenie metod hodowlanych zwierząt gospodarskich powoduje pojawianie się nowych jednostek chorobowych, wśród których coraz większą rolę zaczynają odgrywać schorzenia polietiologiczne, wywoływane równocześnie przez kilka czynników zakaźnych (wirusy, bakterie, mykoplazmy) i niezakaźnych elementów środowiskowych [18]. Jednym z objawów mających wpływ na pojawianie się zakażeń polietiologicznych są u większości zwierząt niedobory odpornościowe. Do chorób takich należy między innymi mastitis u bydła.

Celem pracy było ustalenie odsetka krów z podklinicznymi i klinicznymi objawami mastitis na podstawie badania TOK, następnie izolacja drobnoustrojów wywołujących mastitis i ustalenie ich przynależności gatunkowej oraz określenie wrażliwości na antybiotyki wyosobnionych szczepów.

Materiał i metody

Doświadczenie zostało przeprowadzone na fermie bydła mlecznego. Badaniem TOK objęto 250 krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Od krów, u których wynik badania TOK był pozytywny, pobierano próby mleka do badań mikrobiologicznych. Mleko w ilości 1 ml wysiewano na następujące podłoża diagnostyczne: Chapmana, Mc Conkey'a, Edwardsa, CIN, Saborarauda i agar wzbogacony z dodatkiem 5% krwi baraniej. Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, w warunkach tlenowych. Mleko w ilości 1 ml wysiewano także na podłoże Wilson-Blaira, a hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 doby w warunkach beztlenowych. Oceny morfologicznej komórek (z wyrostłych kolonii) dokonywano poprzez wykonanie preparatów mikroskopowych, które barwiono metodą Grama.

Cechy biochemiczne bakterii określano przy użyciu testów API firmy BioMerieux. Przynależność gatunkową bakterii wyselekcjonowanych oznaczano: na podłożu Chapmana – w teście API-Staph; na podłożach Mc Conkey i CIN – w teście API-20E; na podłożu Edwardsa – w teście API-20Strep; na podłożu Sabourauda – w teście API-20C. Chorobotwórczość gronkowców określano testem na obecność koagulazy (BioMerieux). Wrażliwość wyosobnionych szczepów na 16

Tabela 1
Obecność drobnoustrojów chorobotwórczych w mleku krów w pełnej laktacji z objawami mastitis (n=52)

Wyszczególnienie	Liczba izolacji	Procent izolacji
<i>Streptococcus agalactiae</i>	20	38,5
<i>Streptococcus uberis</i>	4	7,7
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1,9
<i>Streptococcus sp.</i>	3	5,8
Ogółem <i>Streptococcus</i>:	28	53,9
<i>Staphylococcus hyicus</i>	10	19,2
<i>Staphylococcus intermedius</i>	9	17,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	13,5
<i>Staphylococcus hyicus ssp. chromogenes</i>	7	13,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	7,7
Ogółem <i>Staphylococcus</i>	37	71,2
<i>Escherichia coli</i>	8	15,4
<i>Citrobacter diversus</i>	6	11,5
<i>Serratia fonticola</i>	6	11,5
<i>Proteus vulgaris</i>	2	3,9
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1,9
Ogółem <i>Enterobacteriaceae</i>	23	44,2
<i>Candida sp.</i>	16	30,8
<i>Geotrichum candidum</i>	8	15,4
Ogółem grzyby drożdżopodobne	24	46,2
<i>Bacillus cereus</i>	2	3,9

antybiotyków oznaczono w teście dyfuzyjno-krążkowym, zgodnie z zaleceniami NCCLS.

Wyniki i dyskusja

Pozytywny wynik badania TOK stwierdzono u 52 krów (20,8%), w tym 8 krów (15,4%) wykazywało kliniczne objawy mastitis. Spośród pozostałych 44 krów, tylko u jednej zapalenie obejmowało trzy ćwiartki wymienia, u pozostałych zapalenie dotyczyło dwóch bądź jednej ćwiartki wymienia.

Mikroorganizmy wyizolowane z mleka chorych krów przedstawiono w tabeli 1. U 11 krów drobnoustroje izolowane były w czystej hodowli: u 3 krów wyizolowano *Staphylococcus hyicus*, u 2 – *Staphylococcus intermedius*, u 2 innych – *Bacillus*

cereus, u 1 – *Staphylococcus aureus* i u 3 krów drożdże z rodzaju *Candida*. Drożdże z rodzaju *Candida* wyizolowano z mleka aż od 16 krów, a *Geotrichum candidum* – od 8 krów. W mleku pobranym od krów chorych na mastitis najczęściej izolowanymi drobnoustrojami były bakterie z rodzaju *Staphylococcus*; ich obecność stwierdzono w 37 (71,2%) próbach mleka. Malinowski i wsp. [12] obecność tych bakterii stwierdzili w 79,2% prób mleka pobranego od krów z objawami zapalenia gruczołu mlekowego. Gronkowce nie muszą być florą pierwotnie zakażającą wymię, ale mogą wkleć przebieg pierwotnej infekcji. Za chorobotwórcze uznawane są przede wszystkim koagulazo-dodatnie szczepy z rodz. *Staphylococcus* [18].

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że poza *Staphylococcus aureus* również szczepy gatunków *S. intermedius* i *S. hyicus* wytwarzały koagulazę. Gatunkiem najczęściej izolowanym był *S. hyicus* (19,2%). Koagulazo-dodatnie szczepy z rodz. *Staphylococcus* często są izolowane nie tylko z przypadków klinicznych mastitis, ale także innych stanów chorobowych bydła [2], ponadto z żywności pochodzenia zwierzęcego [10, 15]. Koagulazo-ujemne szczepy *Staphylococcus*, z reguły uznawane za oportunistyczne lub saprofityczne, izolowane są zarówno z przypadków klinicznych, jak i podklinicznych mastitis u bydła mlecznego w wielu krajach [12, 14, 16]. W przeprowadzonych badaniach z 11 (21,2%) prób mleka wyizolowano koagulazo-ujemne szczepy gronkowców (*S. hyicus ssp. chromogenes*, *S. epidermidis*).

Streptococcus agalactiae jest drobnoustrojem bezwzględnie chorobotwórczym i najbardziej zjadliwym ze wszystkich paciorkowców, które powodują zapalenie gruczołu mlekowego nie tylko u bydła [1]. W 20 próbach (38,5%) badanego mleka stwierdzono obecność tego drobnoustroju. Tak częsta izolacja *S. agalactiae* wynika z jego dużej zaraźliwości [17]. Drobnoustrój ten wykazuje także znaczną patogenność dla człowieka, zwłaszcza dla niemowląt i ciężarnych kobiet [18].

Spośród drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* najczęściej izolowano pałeczki *Escherichia coli* (15,4%), natomiast z jednej próby wyosobniono szczep *Yersinia enterocolitica*, co należy uznać za rzadki przypadek.

Tabela 2
Odsetek szczepów bakteryjnych wrażliwych na antybiotyki

Antybiotyk	<i>Streptococcus</i>			<i>Staphylococcus</i>				<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
	<i>agalactiae</i>	<i>uberis</i>	<i>dysgalactiae</i>	<i>hyicus</i>	<i>intermedius</i>	<i>aureus</i>	<i>chromogenes</i>							<i>epidermidis</i>
Penicillin G	15	19	11	25	16	15	43	18	14	12	26	17	58	12
Methicillin	84	61	75	78	47	66	86	87	17	64	66	47	88	54
Ampicillin	54	26	47	78	12	17	64	24	37	47	79	67	78	83
Amoxicillin + clavulanic acid	74	31	66	78	41	61	84	62	77	97	79	81	88	86
Imipenem	100	100	100	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100
Amikacin	45	63	65	27	39	64	73	72	47	42	86	61	58	72
Gentamicin	17	29	31	47	16	15	23	27	41	72	36	63	51	80
Kanamycin	25	79	57	65	76	35	43	58	44	72	26	53	57	42
Streptomycin	11	14	17	21	24	19	63	29	19	18	26	8	74	69
Erythromycin	16	16	13	27	24	18	46	14	24	32	56	9	49	68
Linkomycin	65	73	74	65	69	57	81	49	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.
Vancomycin	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100
Rifampicin	97	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	100	100
Oxytetracycline	55	69	71	73	49	43	49	54	63	67	76	79	69	72
Doxycycline	75	78	82	85	67	71	63	82	76	73	79	77	78	83
Acid nalidixic	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	92	91	74	79	83	74

n.o. – nie oznaczano

Grzyby drożdżopodobne wyizolowano z 24 prób mleka (46,2%). W 16 próbach stwierdzono obecność drożdżaków z rodzaju *Candida*, a w 8 z rodzaju *Geotrichum*. *Geotrichum candidum* najczęściej wywołuje zakażenia oskrzeli i płuc u człowieka i innych ssaków. Gatunek ten izolowany jest nie tylko ze zmian skóry oraz przewodu pokarmowego [5], ale także coraz częściej z mleka i jego przetworów [9]. Zakażenia drożdżami z rodzaju *Candida* są coraz częstszą przyczyną mastitis, na co zwraca uwagę wielu autorów [6, 7, 13]. Zjawisko to nasila się w wyniku podawania antybiotyków, zwłaszcza o szerokim spektrum działania. Antybiotyki są głównymi preparatami stosowanymi w leczeniu mastitis na tle zakażeń bakteryjnych. Są także stosowane podczas zaszczepiania krów. Podawanie terapeutyków przeciwbakteryjnych o szerokim spektrum działania prowadzi do zmiany ekologii gruczołu mlekowego, zahamowania wytwarzania przeciwciał i procesu fagocytozy oraz stymulacji wzrostu grzybów drożdżopodobnych [8].

Wrażliwość na antybiotyki wyizolowanych szczepów bakteryjnych zestawiono w tabeli 2. Częste podawanie antybiotyków z wyboru prowadzi również do narastania oporności bakterii [11]. Wyizolowane szczepy wykazywały bardzo dużą oporność na antybiotyki stosowane powszechnie w medycynie weterynaryjnej, były natomiast wrażliwe na antybiotyki podawane tylko ludziom. Należy podkreślić, że zaledwie 15% szczepów *Staphylococcus aureus* było wrażliwych na penicylinę i gentamycynę, 18% – na erytromycynę, 19% – na streptomycynę. Natomiast szczepy tego gatunku wykazywały największą wrażliwość na imipenem, wankomycynę i rifampycynę. Wrażliwość pozostałych gronkowców na penicylinę wahała się od 16 do 43%, na gentamycynę od 16 do 47%, na streptomycynę od 21 do 63%, na erytromycynę od 14 do 46%. Corti i wsp. [3], w badaniach nad wrażliwością szczepów z rodzaju *Staphylococcus* i *Streptococcus* oraz gatunku

E. coli, wyizolowanych z mleka krów z objawami mastitis stwierdzili, że 91% szczepów *Staphylococcus aureus* było wrażliwych na penicylinę G i ampicylinę, a 53% pozostałych przebadanych przez nich ziarniaków z rodzaju *Staphylococcus* wykazywało wrażliwość na te antybiotyki. W wyniku badań własnych stwierdzono, że spośród badanych szczepów największą wrażliwość *in vitro* na antybiotyki wykazywała pałeczka *Yersinia enterocolitica*.

Literatura: 1. Bohnsack J.F., Whiting A.A., Martinez G., Jones N., Adderson E.E., Detrick S., Blaschke-Bonkowsky A.J., Bishar N., Gottschalk M., 2004 – Emerging Infectious Diseases 10 (8), 1412-1419. 2. Capurro A., Concha C., Nilsson L., Ostensson K., 1999 – Acta Veterinaria Scandinavica 40 (4), 315-321. 3. Corti S., Sicher D., Regli W., Stephan R., 2003 – Schweizer Archiv für Tierheilkunde 145 (12), 571-575. 4. Falkenberg U., Tenhagen B.A., Baumgartner B., Heuwieser W., 2004 – Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 111 (9), 355-358. 5. Greenfield R.A., 1992 – Journal of Medecinal and Veterinary Mycology 30, 89-104. 6. Keller B., Scheibl P., Bleckmann E., Hoedemaker M., 2000 – Mycoses 43 Suppl. 1, 17-19. 7. Krukowski H., Tietze M., Majewski T., Rozanski P., 2001 – Mycopathologia 150 (1), 5-7. 8. Lagneau P.E., Lebtahi K., Swinne D., 1996 – Mycopathologia 135 (2), 99-102. 9. Leclercq-Perlat M.N., Buono F., Lambert D., Latrille E., Spinnler H.E., Corrieu G., 2004 – The Journal of Dairy Research 71 (3), 355-366. 10. Majczyna D., Białasiewicz D., 2004 – Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia 56 (1), 11-17. 11. Makovec J.A., Ruegg P.L., 2003 – Journal of the American Veterinary Medical Association 222 (11), 1582-1589. 12. Malinowski E., Kłossowska A., Kaczmarski M., Kuźma K., 2003 – Bulletin Veterinary Institute Puławy 47, 165-170. 13. Moretti A., Pasquali P., Mencaroni G., Boncio I., Piergili Fioretti D., 1998 – Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 45 (3), 129-132. 14. Myllys V., 1995 – The Journal of Dairy Research 62, 51-60. 15. Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A., De-castelli L., Mioni R., Scuto S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Salinetti A.P., La Salandra G., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia N.C., Celano G.V., 2005 – International Journal of Food Microbiology 98 (1), 73-79. 16. Smith K.L., 2001 – Mastitis Newsletter 24, 24-45. 17. Zadoks R.N., Gonzalez R.N., Boor K.J., Schukken Y.H., 2004 – Journal of Food Protection 67 (12), 2644-2650. 18. Zaremba L.M., Borowski J., 1997 – Mikrobiologia lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.

Artykuł recenzowany

Analiza wykorzystania rozplodowego elitarnych klaczy czystej krwi arabskiej hodowli SK Kurozwęki

Krystyna Chmiel, Dorota Sobczuk

Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu

W Stadninie Koni Kurozwęki hodowla koni czystej krwi arabskiej prowadzona była w latach 1973-1998 [5, 6]. Po jej przy-

watyzacji klacze stadne znalazły się w rękach różnych właścicieli, gdzie kontynuowały karierę hodowlaną, ale 25-letni okres działania stadniny wart jest podsumowania, tym bardziej, że na bazie klaczy przekazanych z innych stadnin ukształtowały się tam swoiste sublinie żeńskie, niektóre niereprezentowane w innych stadninach. Porównanie wskaźników rozrodu uzyskanych podczas działalności SK Kurozwęki pozwala na dokonanie oceny wyników hodowlanych tej stadniny.

Materiał i metody

Badaniem objęto 91 elitarnych klaczy czystej krwi arabskiej należących do 19 sublinii żeńskich, wpisanych do XIII, XIV i XV Tomu PASB [7], użytkowanych rozplodowo przez co najmniej 5 sezonów hodowlanych (do 2002 roku). Zostało zatem przeprowadzone porównanie sublinii najlepszych pod względem wskaźników rozrodu. Obliczono dla każdej z nich: długość użytkowania rozplodowego, liczbę urodzonych źrebiąt (łącznie oraz klaczek i ogierków), liczbę względną i bezwzględną źrebiąt martwo urodzonych, padłych i zgładzonych wkrótce po urodzeniu, żrebnosć, płodność, liczbę oraz procent jałowieni i poronień. Średnie długości użytkowania rozplodowego i liczby urodzonych źrebiąt porównano ze sobą,