

## ETIOLÓGIA ENVIRONMENTÁLNYCH MASTITÍD OVIEC A VÝSKYT REZISTENCIE VOČI ANTIBIOTIKÁM U BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z KLINICKÝCH FORIEM AETIOLOGY OF ENVIRONMENTAL MASTITIS IN SHEEP AND THE OCCURRENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN BACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL FORMS

*Milan Vasil', Juraj Elečko, Zuzana Farkašová, František Zigo*

**Abstract:** In our study were examined 1376 individual sheep's milk samples. Aetiology of mastitis characterised by the representation of the bacteria *Staphylococcus spp.* 16,2 % (224), *Streptococcus spp.* 2,6 % (36), *E. coli* 1,0 %, *Aerococcus viridans* 0,8 % (11). Effects of applied preventive measures are manifested mainly in the reduction of the incidence of staphylococci. From coagulase-positive staphylococci 4,9 % (68) had *S. aureus* decreasing in occurrence from 7,2 %, 5,5 %, 5,3 %, to 1,3 %. CNS 11,3 % (156) had a dominant presence in the findings 22,3 %, 11,0 %, 6,3 % and 4,8 %. Clinical and subclinical mastitis in sheep were caused by 14,2 % (232) bacteria that have been tested to a range of disk-based method on resistance of the twelve antibiotics. The highest resistance was recorded against to penicilínu (27,6 %), streptomycín (25,9 %), novobiocín (22,8 %) and neomycín (23,3 %). The lowest resistance was against to cefoxitíne (2,2 %), and linkomycín (4,7 %). Increased resistance to antibiotics in the treatment of inflammations of the test indicates the use of antibiotics in sheep mammary glands on the basis of regularly updated tests of sensitivity.

**Keywords:** mastitis, environmental bacteria, sheep, resistance, antibiotics

### ÚVOD

Pri mastitídach ako ekonomicky významnom ochorení oviec, napriek tlaku environmentálnych baktérií z prostredia chovu, sú tradične hlavnými pôvodcami baktérie *Staphylococcus spp.* (Bergonier et al., 2003; Mørk et al., 2007). Beheshti et al. (2010) uvádzajú, že na výskyte subklinických mastitíd mali stafylokoky podiel až 88,4%, z toho *S. aureus* 19,2 % a koaguláza negatívne stafylokoky (KNS) 69,2 %. Rozšírenie výskytu KNS je často sprevádzané zvýšeným výskytom rezistencie voči bežným antibiotikám a dezinfekčným látkam (Moniri et al., 2007). U nás v tejto súvislosti Vasil' et al. (2009) upozorňujú na zvyšujúci sa výskyt subklinických a latentných mastitíd spôsobených niektorými druhmi koaguláza negatívnych stafylokokov, u ktorých je častý výskyt rezistencie voči viacerým antibiotikám. Z toho dôvodu kontrola antibiotikorezistencie bakteriálnych patogénov mastitíd by mala byť východiskom zabezpečenia účinnosti uplatňovaných tlmiacich metód (Virdis et al., 2010; Bennedsgaard et al., 2006).

Cieľom práce bolo stanoviť podiel jednotlivých druhov baktérií na výskyte environmentálnych mastitíd oviec počas sezóny dojenia a zistiť výskyt rezistencie ku antibiotikám u druhov baktérií, ktoré zapríčiňujú klinické formy mastitíd.

### MATERIÁL A METÓDY

**Charakteristika experimentálneho chovu :** Terénna časť štúdie bola vykonávaná na farme 400 oviec plemena zošľachtená valaška v okrese Gelnica. Sledovanie etiológie a výskytu mastitíd prebiehalo počas jednej sezóny (apríl až september 2012) v technológii

strojového dojenja oviec. Boli vykonané 4 komplexné vyšetrenia stáda v nasledovných intervaloch: na začiatku sezóny dojenja (apríl), v ďalšom priebehu ( jún a august ) a pred ukončením sezóny (september).

**Uplatňované protimastitídne opatrenia:** a) selekcia oviec podľa zdravotného stavu mliečnej žľazy; b) vyradovanie bahníc s chronickou formou mastitídy zo stáda dojených oviec; c) dodržiavanie optimálnej doby dojenja s individuálnym dodojovaním; d) dodržiavanie zásad hygienického programu počas dojenja s dôrazom na dezinfekciu ceckov po vydojení; e) liečba klinických prípadov mastitíd na základe výsledkov antibiogramu.

**Komplexné vyšetrenia stáda:** Komplexné vyšetrenia predstavovali klinické vyšetrenie vemena doplnené o NK test a bakteriologické vyšetrenie individuálnych vzoriek ovčieho mlieka podľa zásad ako uvádzajú autori Kováč et al. (2001); Vasil' (2004); Lam et al. ( 2009).

**Bakteriologické vyšetrenie:** Vzorky ovčieho mlieka boli vyočkované na platne s 5 % krvným agarom, inkubované pri 37 °C a po 24 hodinách odčítavané a následne podľa rastových vlastností kultivované na selektívnych živných pôdach. Určenie jednotlivých druhov bolo vykonané setmi STAPHYtest 24, STREPTOtest 24 a ENTEROtest 24 a programom TNW 7.0 ProAuto (Erba-Lachema, Brno, ČR).

**Testovanie citlivosti baktérií k antibiotikám:** Baktérie izolované z akútnych a subakútnych foriem mastitíd (n = 232) boli *in vitro* otestované na Mueller-Hinton agare diskovou metódou (NCCLS, 2002) hodnotenia zón inhibície rastu po 24 h inkubácii pri 37 °C na citlivosť ku dvanástim antibiotikám: Ampicilín (10 µg); Amoxycilín (25 µg); Cloxacilin (5 µg); Cefoxitin (30 µg); Erytromycín (10 µg); Linkomycín (15 µg); Neomycín (10 µg); Novobiocín (5 µg); Penicilín (10 U ); Streptomycín (10 µg); Oxacilin (5 µg); Tetracyklín (10 µg) (OXOID Ltd. Basingstoke, Hants, UK). Rezistencia alebo citlivosť testovaných baktérií bola interpretovaná podľa referenčných zón v súlade s pokynmi NCCLS.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z hodnotenia bakteriologických nálezov pri jednotlivých vyšetreniach sledovaného stáda oviec (Tab.1) vyplýva, že bola zaznamenaná postupná redukcia prevalencie mastitíd z úvodných 39,9 % na 20,5 %, 18,2 %, resp. na 10,3 % pri ukončení sezóny dojenja.

**Tab. 1** Vyhodnotenie zastúpenia pôvodcov mastitíd pri jednotlivých vyšetreniach stáda oviec

Druhy baktérií	vyšetrenia stáda v roku 2012								Celkový nález	
	I.		II.		III.		IV.			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Aerococcus viridans</i>	6	1.7	1	0.3	2	0.6	2	0,6	11	0,8
<i>Arcanobacterium spp.</i>	1	0.3	1	0.3					2	0,1
<i>Enterococcus spp.</i>	5	1.4	3	0.8	1	0.3	3	1,0	12	0,9
<i>Bacillus spp.</i>	2	0.6							2	0,1
<i>E.coli</i>	8	2.3			2	0.6	4	1,3	14	1,0
<i>Proteus mirabilis</i>	7	2.0			2	0.6			9	0,6
<i>Staphylococcus spp.</i>	102	29.5	66	16.5	37	11.6	19	6,1	224	16,2
KPS*	25	7,2	22	5,5	17	5,3	4	1,3	68	4,9
KNS**	77	22,3	44	11,0	20	6,3	15	4,8	156	11,3
<i>Streptococcus spp.</i>	7	2,0	11	2,8	14	4,4	4	1,3	36	2,6
<i>S.bovis</i>	1	0.3	2	0.5	2	0.6			6	0,4
<i>S.dysgalactiae</i>	1	0.3	6	1.5	3	0.9	1	0,3	11	0,8
<i>S.mitis</i>	2	0.6	1	0.3	2	0.6			4	0,3
<i>S.uberis</i>	3	0.9	2	0.5	7	2.2	3	1,0	15	1,1

## Potravinárstvo

pozitívne spolu	138	39.9	82	20.5	58	18.2	32	10,3	310	22,5
negatívne	208	60.1	318	79.5	261	81.8	279	89,7	1066	77,5
Spolu vyšetrené	346	100.0	400	100.0	319	100.0	311	100,0	1376	100,5

\*- (KPS) koaguláza-positívne stafylokoky (*S. aureus*, *S. intermedius*);

\*\* - (KNS) koaguláza-negatívne stafylokoky;

Celkový bakteriologický nález 22,5 % predstavovalo 310 pozitívnych z 1376 vyšetrených vzoriek ovčieho mlieka. Etiológiu mastitíd v sledovanom chove charakterizuje zastúpenie predovšetkým baktérií *Staphylococcus spp.* 16,2 % (224), *Streptococcus spp.* 2,6 % (36), *E. coli* 1,0 %, *Aerococcus viridans* 0,8 % (11). Sporadicky a minimálny bol výskyt nasledovných druhov: *Proteus mirabilis* 0,6 % (9), *S. bovis* 0,4 % (6), *S. mitis* 0,3 % (4), *Arcanobacterium spp.* a *Bacillus spp.* 0,1 % (2).

Efekt uplatňovaných preventívnych opatrení sa prejavil hlavne na redukcii výskytu stafylokokov, pričom u koaguláza pozitívnych baktérií 4,9 % (68) *S. aureus* bol v priebehu celej sezóny zaznamenaný pokles výskytu zo 7,2 %, 5,5 %, 5,3 %, resp. na 1,3 %. KNS 11,3 % (156) mali dominantné zastúpenie v nálezoch postupne: 22,3 %, 11,0 %, 6,3 % a 4,8 %. Celosezónny výskyt okrem stafylokokov mali baktérie *S. uberis*, *Enterococcus spp.* *S. dysgalactiae* a *Aerococcus viridans*.

Z celkového bakteriologického nálezu sa na výskyte klinických a subklinických mastitíd oviec podieľalo 14,2 % (232) baktérií, ktoré boli otestované na citlivosť, resp. rezistenciu ku škále dvanástich antibiotík (Tab. 2).

**Tab. 2 Výskyt rezistencie voči antibiotikám u druhov baktérií, ktoré boli izolované z 232 prípadov klinických foriem mastitíd v chove oviec**

Baktérie	n	Rezistencia ku testovaným antibiotikám <sup>1</sup> v %											
		Amp	Aml	Clox	Fox	E	Lin	N	Nv	P	S	Ox	Te
<i>Aerococcus vir.</i>	7	28,6	14,3	28,6		28,6		14,3	28,6	57,1	28,6	14,3	
<i>Enterococcus spp.</i>	11	9,1		18,2	9,1	9,1		18,2	27,3	45,5	36,4	27,3	9,1
<i>E. coli</i>	9	33,3	11,1	22,2		22,2		22,2	33,3	22,2	11,1	11,1	22,2
<i>Proteus spp.</i>	8	12,5	25,0	50,0	25,0	12,5	12,5	37,5	37,5	62,5	50,0	37,5	12,5
KPS*	67	6,0	4,5	3,0	1,5	4,5	1,5	16,4	17,9	19,4	13,4	7,5	4,5
KNS**	110	15,5	18,2	9,1	0,9	12,7	6,4	26,4	22,7	24,5	31,8	4,5	7,3
<i>S. dysgalactiae</i>	8	25,0	12,5					25,0	25,0	37,5	25,0		
<i>S. uberis</i>	12	25,0	16,7	8,3		8,3	16,7	16,7	33,3	41,7	25,0	16,7	8,3
celkom	232	14,2	12,9	9,1	2,2	10,3	4,7	22,4	23,3	27,6	25,9	8,6	6,9

<sup>1</sup> : Amp - Ampicilin 10µg, Aml - Amoxycilin 25µg, Clox (OB) - Cloxacilin 5µg, Fox - Cefoxitin 30µg,

E - Erytromycin 15µg., Lin (MY) - Linkomycin 15 µg, N - Neomycin 10 µg, Nv - Novobiocin 5 µg,

P - Penicillin 10 U, S - Streptomycin 10 µg, Ox - Oxacillin 5 µg, TE - Tetracyklin 10 µg,

\*- koaguláza-positívne stafylokoky – *Staphylococcus aureus*; \*\* - koaguláza-negatívne stafylokoky

Podiel jednotlivých druhov baktérií na klinických a subklinických mastitídach oviec bol nasledovný: *Aerococcus viridans* – 7, *Enterococcus spp.* – 11, *E. coli* – 9, *Proteus spp.* – 8, KPS – 56, KNS – 110, *S. dysgalactiae*. – 8, resp. *S. uberis* – 12. Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná voči penicilínu (27,6 %), streptomycínu (25,9 %), novobiocínu (22,8 %) a neomycínu (23,3 %). Najnižšia rezistencia voči cefoxitínu (2,2 %), linkomycínu (4,7 %). Najmenej rezistentné boli druhy *S. dysgalactiae* 7/12, *Aerococcus viridans* 8/11. Najviac rezistentné boli KPS, KNS a *Proteus spp.* 15/15. V rámci škály antibiotík u KPS bola zaznamenaná rezistencia v rozmedzí 1,5 % až 19,4 %, avšak najvyššia bola ku penicilínu 19,4 %, novobiocínu 17,9 % a neomycínu 16,4 %. KNS boli rezistentné v rozmedzí 0,9 % (cefoxitin) až 31,8 % (streptomycin), pričom významné boli aj hodnoty rezistencie ku neomycínu 26,4 %, penicilínu 24,5 % a novobiocínu 24,5 %. Antibiotickou liečbou hlavne

klinických mastitíd sa zredukoval jednak výskyt *Staphylococcus spp.* a v rámci toho postupne boli z chovu eliminované kmene s vysokou rezistenciou k testovaným antibiotikám.

Z hľadiska baktérií environmentálneho pôvodu sú opodstatnené záznamy o výskyte rezistencie u kmeňov *S. uberis*, keď okrem citlivosti ku cefoxitínu, sú hodnoty v rozsahu od 8,3 % (cloxacilin, erytromycin, tetracyklin) až do 41,7 % (penicilin). Rovnako aj izolácia druhu *A. viridans* je spojená s výskytom rezistencie s tendenciou ako pri *S. uberis*. Kmene rezistentné voči oxacilínu, ampicilínu a cefoxitínu boli následne otestované na produkciu beta-laktamázy, pričom z 58 testovaných bolo pozitívnych 7 kmeňov pochádzajúcich z mastitíd u oviec.

Rezistencia patogénov pri klinických a subklinických formách mastitíd naznačuje ich expanzívny vplyv na rozvoj zápalového procesu a tým aj významnosť ako faktora virulencie. Zaznamenaná zvýšená rezistencia k testovaným antibiotikám vyžaduje používanie antibiotík pri liečbe zápalov mliečnej žľazy u oviec zásadne podľa zistenej rezistencie.

### ZÁVER

V našej štúdií pri vyšetrení 1376 vyšetrených vzoriek ovčieho mlieka 310 pozitívnych vzoriek predstavovalo bakteriologický nález 22,5%. Etiológiu mastitíd charakterizuje zastúpenie predovšetkým baktérií *Staphylococcus spp.* 16,2 % (224), *Streptococcus spp.* 2,6 % (36), *E. coli* 1,0 %, *Aerococcus viridans* 0,8 % (11). Celosezónny výskyt okrem stafylokokov mali baktérie *S. uberis*, *Enterococcus spp.*, *S. dysgalactiae* a *Aerococcus viridans*. Efekt uplatňovaných preventívnych opatrení sa prejavil hlavne na redukcii výskytu stafylokokov, pričom u koaguláza pozitívnych baktérií 4,9 % (68) bol *S. aureus* v priebehu celej sezóny zaznamenaný pokles výskytu zo 7,2 %, 5,5 %, 5,3 %, resp. na 1,3 %. KNS 11,3 % (156) mali dominantné zastúpenie v nálezoch postupne: 22,3 %, 11,0 %, 6,3 % a 4,8 %. Celosezónny výskyt okrem stafylokokov mali baktérie *S. uberis*, *Enterococcus spp.*, *S. dysgalactiae* a *Aerococcus viridans*.

Na výskyte klinických a subklinických mastitíd oviec sa podieľalo 14,2 % (232) baktérií, ktoré boli otestované na citlivosť, resp. rezistenciu ku škále dvanástich antibiotík. Podiel bol nasledovný: *Aerococcus viridans* – 7, *Enterococcus spp.* – 11, *E. coli* – 9, *Proteus spp.* – 8, KPS – 56, KNS – 110, *S. dysgalactiae*. – 8, resp. *S. uberis* – 12. Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná voči penicilínu (27,6 %), streptomycínu (25,9 %), novobiocínu (22,8 %) a neomycínu (23,3 %). Najnižšia rezistencia bola voči cefoxitínu (2,2 %), linkomycínu (4,7 %). Rezistencia patogénov pri mastitídach naznačuje ich expanzívny vplyv na rozvoj zápalového procesu a indikuje zásadné používanie antibiotík pri liečbe zápalov mliečnej žľazy u oviec podľa zistenej rezistencie.

### LITERATÚRA

- BEHESHTI, R., SHAIEGHI, J., ESHRATKHAH, B. et.al. 2010. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in ewes of the Tabriz region, Iran. In *Global Veterinaria*, 2010, 4 (3), 299-302. ISSN 1992-6197.
- BENNEDSGAARD, T. W., THAMSBORG, S. M., AARESTRUP, F. M., ENEVOLDSEN, C., VAARST, M., CHRISTOFFERSEN, A. B. 2006. Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark. In *Acta Vet. Scand.*, 2006, 48, 24.
- BERGONIER, D., BERTHELOT, X. 2003. New advances in epizootology and control of ewe mastitis. In *Livest. Prod. Sci.* 2003, 79, 1-16.
- GONZALO, C., ARIZNABARRETA, A., SAN PRIMITIVO, F. 2002. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. In *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 1460-1467.
- KOVÁČ, G. a kol. 2001. Choroby hovädzieho dobytku, *Vydavateľstvo M&M*, Prešov, 2001, 874s.
- LAM, T. J. G., OLDE RIEKERING, R. G. M., SAMPIMON, O. C., SMITH, H. 2009. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. In *Irish Vet. J.*, 62, 2009,34-39.
- MONIRI, R., DASTEGHOLI, K., AKRAMIAN, A. 2007. Increasing Resistant CNS in Bovine Clinical Mastitis. In *Pakistan J. Biolog. Sci.*, 2007 (15), 10, 2465-2469.
- MØRK, T., WAAGE, S., TOLLERSRUD, T., KVITILE, B., SVILAND, S. 2007. Clinical mastitis in ewes, bacteriology, epidemiology and clinical features. In *Acta Vet. Scand.* 2007, 49, 23.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. NCCLS 2002, 22, 1, Jan. 2002.

VASIĽ, M. 2004. Zápaly mliečnej žľazy dojníc, Vyd. Univerzita veterinárskeho lekárstva Košice, Elektronická verzia, 2004, ISBN 80-8077-005-0.

VASIĽ, M., ELEČKO, J., FARKAŠOVÁ, Z., BÍREŠ, J. 2009. The reduction on the occurrence of mastitis in dairy herd using the innovation of housing conditions, sanitary of milk storage and applying the therapy of mastitis during the lactation. In *Folia veterinaria* (ISSN 0015-5748), 2009, 53, Suppl. II, 186-189.

VIRDIS, S., SCARANO, CH., COSSU, F., SPANU, V., SPANU, C., DE SANTIS, E. P. L. 2010. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* isolated from goats with subclinical mastitis. In *Vet. Med. International*, 2010, Art. ID 517060, 6 p.

**Pod'akovanie:** Práca bola podporovaná projektom APVV-0679-10 a projektom APVV-0629-07

**Kontaktná adresa:** doc. MVDr. Milan Vasiľ, CSc., Ústav chovu zvierat, UVLF, Komenského 73, 041 81, Košice, telefón, fax : + 421 55 2982 630, mail: [vasil@uvm.sk](mailto:vasil@uvm.sk)