ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA
VOL. XXIV, 4 SECTIO EE 2006

Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu, Akademia Rolnicza w Lublinie
Lecznica dla Zwierząt w Sitnie

DANUTA BORKOWSKA, ROBERT POLSKI, EWA JANUŚ

Drobnoustroje wyizolowane z mleka ćwiartkowego krów i ich wrażliwość na antybiotyki

Microorganisms Isolated from the Cow Quarter Milk and Their Sensibility to Antibiotics

Obraz cytologiczny mleka warunkowany jest przez szereg czynników, a najważniejszym jest stan zdrowia wymienia. W Polsce od roku 1998 liczbę komórek somatycznych określa się w towarowym mleku zbiorczym. Wynik tego badania jest podstawą klasyfikacji mleka wg PN/95-A-86002, dostosowującej przepisy krajowe do Dyrektywy 92/46/EEC UE [2]. W aktywnej populacji krów liczbę komórek somatycznych określa się przy okazji próbnych udojów. Wyniki te mogą być wykorzystywane w profilaktyce chorób wymion.

Problem chorób wymion istnieje wszędzie, gdzie prowadzona jest intensywna produkcja mleka [1]. Zapalenie wymion jest najczęstszą i najdroższą chorobą krów mlecznych [3, 5]. W Polsce zapada na nie od 30 do 80% krów [4]. Podobne nasilenie notowane jest również w skali globalnej [3]. Polska jako eksporter mleka i produktów mlecznych do innych krajów UE jest zobowiązana zgodnie z ustawodawstwem unijnym do przestrzegania wszystkich norm wynikających z dyrektyw, zgodnie z którymi mleko musi pochodzić od zwierząt zdrowych, utrzymywanych w gospodarstwach zachowujących podstawowe zasady higieny. Dlatego też w produkcji mleka należy uwzględniać zarówno profilaktykę, jak i terapię chorób wymion.

Celem badań była identyfikacja patogenów występujących w mleku krów z kliniczną postacią *mastitis* lub charakteryzujących się podwyższoną liczbą komórek somatycznych oraz określenie ich wrażliwości na antybiotyki.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto krowy utrzymywane w 48 gospodarstwach położonych na Zamojszczyźnie. Ogółem przebadano 92 próby mleka ćwiartkowego. W 68 przypadkach pochodziły one od krów wykazujących kliniczną postać *mastitis.* W pozostałych 24 do badań wytypowano zwierzęta wykazujące się podwyższoną liczbą komórek somatycznych w mleku (dodatni lub silnie dodatni wynik testu TOK). Próby mleka z oczyszczonych i zdezynfekowanych strzyków pobierano bezpośrednio do wyjałowionych probówek, które po zabezpieczeniu i schłodzeniu transportowano do laboratorium.

W laboratorium Lecznicy dla Zwierząt za pomocą sterylnej ezy mleko przenoszono na podłoże namnażające, jakim był agar z krwią. Do identyfikacji grzybów drożdżopodobnych użyto podłoża różnicowego Sabourauda. Po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C drobnoustroje identyfikowano [6]. W następnym etapie wyizolowane bakterie badano pod kątem ich wrażliwości na antybiotyki metodą krążkowo-dyfuzyjną [6]. Wyróżniono cztery stopnie wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki: niewrażliwy, słabo wrażliwy, średnio wrażliwy i silnie wrażliwy. Testowano (w różnych kombinacjach) następujące antybiotyki: amoksycylinę (AML), enrofloksacynę (ENR), gentamycynę (CN), tetracyklinę (T), chloramfenikol (C), kanamycin (K), linkomycin (MY), tetra-deltę (NP-SN), kolistynę (CT), kloksacylinę (OB) oraz enrobiofloksacynę (ENB), cephalexin (CL), streptomycynę (S), erytromycynę (ERT) i penicylinę (P).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z ogółu badanych prób mleka wyizolowano i zidentyfikowano 10 różnych drobnoustrojów, przy czym w blisko połowie (48%) stwierdzono występowanie tylko jednego gatunku (tab. 1). W 28 przypadkach (30,3%) wyizolowano po dwa gatunki drobnoustrojów, a w pozostałych 20 próbach (21,7%) ich liczba wynosiła 3 lub więcej. Podobnie jak w innych badaniach [7] najczęstszymi patogenami były *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus.* Paciorkowiec bezmleczności występował w 78 (84,8%) próbach, przy czym w 36 (46,2%) jako gatunek pojedynczy i w 42 (53,8%) wchodził w skład flory mieszanej. Gronkowiec złocisty wyizolowano z 47 (51,0%) prób i tylko w ośmiu (17,0%) występował samodzielnie. *Candida albicans* występował w 13 (14,1%) przypadkach, wyłącznie jako drobnoustrój towarzyszący. Patogeny takie, jak *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes, Corynebacterium bovis,* oraz flora mieszana, której składu nie zidentyfikowano, występowały z podobną częstotliwością, mieszczącą się w przedziale 6,5–2,2% prób. Najrzadziej identyfikowano *Streptococcus dysgalactiae, Actinomyces pyogenes* i *Proteus*. Drobnoustroje te odnotowano tylko w pojedynczych próbach (1,1%). Na stosunkowo niewielkie patogenne znaczenie *Streptococcus dysgalactiae* i *Corynebacterium bovis* wskazują także inne badania [4].

Spośród 15 testowanych antybiotyków największej skuteczności leczenia *mastitis* można było oczekiwać w przypadku stosowania enrofloksacyny (ENR) – ryc. 1. W 77,5% przypadkach stwierdzono trzeci stopień wrażliwości na ten

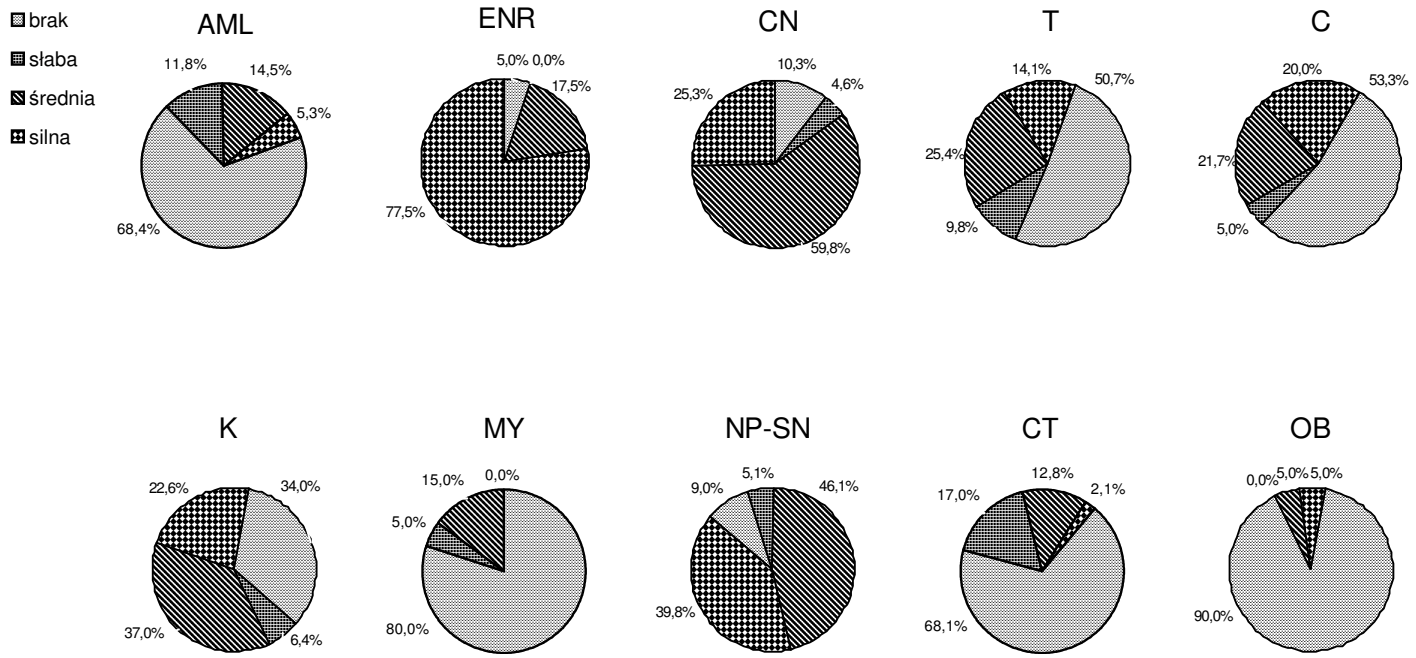
lek. Stosunkowo wysoką efektywność w zwalczaniu patogenów wykazała także tetra-delta (NP-SN), bowiem 85,9% wyników świadczyło o silnej i średniej wrażliwości drobnoustrojów. W odniesieniu do gentamycyny (CN) w większości stwierdzono drugi (59,8%) lub trzeci (25,3%) stopień wrażliwości.

Tab. 1. Gatunki i częstotliwość występowania drobnoustrojów wyizolowanych z prób mleka ćwiartkowego
The species and frequency of the occurence of microorganisms isolated from the quarter milk

Gatunek wyizolowanych drobnoustrojów	n	%
Streptococcus agalactiae	78	84,8
Staphylococcus aureus	47	51,0
Candida albicans	13	14,1
Escherichia coli	6	6,5
Pseudomonas aeruginosa	4	4,3
Streptococcus pyogenes	3	3,3
Corynebacterium bovis	2	2,2
Streptococcus dysgalactiae	1	1,1
Actinomyces pyogenes	1	1,1
Proteus	1	1,1
Flora mieszana	2	2,2
Próby ogółem	92	100,0
Liczba prób z 1 wyizolowanym gatunkiem	44	48,0
Liczba prób z 2 wyizolowanymi gatunkami	28	30,3
Liczba prób z 3 i więcej wyizolowanymi gatunkami	20	21,7

Przeciętnej skuteczności leczenia *mastitis* można oczekiwać przy stosowaniu kanamycinu (K). Preparat ten testowano w 62 próbach, z czego w 21 (34,0%) wykazano brak wrażliwości. Słaby, średni i silny stopień wrażliwości stwierdzono odpowiednio w 4 (6,4%), 23 (37,0%) oraz 14 (22,6%) próbach.

Testowanie amoksycyliny (AML) w wielu przypadkach wykazywało zupełną oporność patogenów – 68,4% prób wskazywało na brak wrażliwości. Podobna do (AML) była skuteczność kolistyny (CT). Brak wrażliwości na ten preparat stwierdzono w 68,1% prób, a słabą i średnią odpowiednio w 17,0 i 12,8%. Podobnie jak w przypadku AML i CT zupełną oporność patogenów w większości prób stwierdzono w odniesieniu do tetracykliny (T – 50,7%), chloramfenikolu (C – 53,3%), linkomycinu (MY – 80,0%) i kloksacyliny (OB – 90,0%). Do preparatów o najniższej efektywności terapeutycznej zaliczono kloksacylinę (OB), linkomycin (MY) oraz antybiotyki pozostałe.



Ryc. 1. Wrażliwość drobnoustrojów wyizolowanych z mleka ćwiartkowego na testowane antybiotyki
Sensibility of the microorganisms isolated from the quarter milk to tested antibiotics

Antybiotyki stanowią ciągle podstawową grupę środków stosowanych w leczeniu i zapobieganiu *mastitis* u krów. Jednak analiza piśmiennictwa wskazuje na coraz mniejsze efekty terapii przeciwbakteryjnej, mimo ciągłego wytwarzania nowych generacji antybiotyków. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest nabywanie oporności na preparaty antybiotykowe przez drobnoustroje, uważane za czynnik etiologiczny *mastitis* [8, 9]. Przedstawione wyniki wskazują na to, że antybiotykoterapia *mastitis* powinna być poprzedzona diagnozą stopnia wrażliwości drobnoustrojów wyizolowanych z mleka na leki. W przeciwnym razie leczenie może okazać się nieskuteczne, a hodowca poniesie koszty wynikające z przedłużającej się terapii oraz ze zmniejszenia ilości produkowanego mleka.

WNIOSKI

1. Spośród 10 różnych drobnoustrojów wyizolowanych z mleka ćwiartkowego najczęściej identyfikowano *Streptococcus agalactiae* (84,8% prób) oraz *Staphylococcus aureus* (51,0%). Patogeny te występowały samodzielnie lub towarzyszyły im inne drobnoustroje.

2. W odniesieniu do wszystkich wyizolowanych z mleka patogenów najbardziej skuteczne w leczeniu mogły okazać się enrofloksacyna (ENR) oraz tetradelta (NP-SN). Na 11 spośród 15 testowanych antybiotyków drobnoustroje były niewrażliwe lub słabo wrażliwe.

3. W celu poprawy efektywności leczenia *mastitis* przed rozpoczęciem terapii niezbędne jest wykonanie antybiotykogramów służących określeniu lekooporności poszczególnych gatunków drobnoustrojów.

PIŚMIENNICTWO

1. C z u p a S.: *Mastitis* „chorobą zawodową" krów mlecznych. Przegl. Mlecz., 1, 20–23, 1998.
2. G ó r s k a A.: Jakość mleka towarowego w rejonie południowego Podlasia z uwzględnieniem wpływu niektórych czynników ją warunkujących. Rozpr. Nauk., 67, AP w Siedlcach, 2002.
3. K r o l l J., S u r a ż y ń s k i A., N o w a k H.: Stany zapalne wymienia krów – wpływ na jakość i przydatność technologiczną mleka. Przegl. Mlecz., 12, 369–370, 1996.
4. K r u k o w s k i H.: Występowanie zapaleń wymienia wywołanych przez drobnoustroje środowiskowe u krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej i ich mieszańców. Rozpr. Nauk., 268, AR w Lublinie, 2003.
5. M a l i n o w s k i E., K ł o s s o w s k a A.: Stan zdrowia wymienia krów punktem krytycznym w produkcji mleka. Przegl. Mlecz., 9, 308–311, 2000.
6. M a l i n o w s k i E., K ł o s s o w s k a A.: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. Wyd. PIW Puławy, 2002.

7. Malinowski E., Kłossowska A., Krukowski H., Lesiak M., Janik K.: Zdrowotność wymion krów i czynniki etiologiczne *mastitis* w gospodarstwach położonych w różnych regionach kraju. Med. Wet., 48 (5), 216–218, 1992.
8. Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Lesiak M.: Wrażliwość na antybiotyki laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych bakterii wyosobnionych z przypadków *mastitis* u krów. Med. Wet., 60 (2), 176–180, 2004.
9. Malinowski E., Pilaszek J., Kłossowska A., Sobolewska S., Sobolewski J.: Zmiany wrażliwości na antybiotyki bakterii wyosobnionych z klinicznych postaci *mastitis* u krów w latach 1987-1996. Med. Wet., 53 (12), 722–725, 1997.

SUMMARY

From 92 samples of quarter milk from cows with a clinical *mastitis* or showing an enlarged number of somatic cells, 10 different microorganisms were isolated. They occurred alone (48% of samples) or as a mixed flora. *Streptococcus agalactiae* (84.8% of samples) and *Staphylococcus aureus* (51.0%) belonged to the most frequently identified patogenes. The isolated microorganisms where insensitive or poorly sensitive to 11 out of the 15 tested antibiotics, whereas only 2 of them could be efficient in *mastitis* therapy. It was found that in order to improve the efficency of *mastitis* therapy, before its beginning it is necessary to prepare antibiograms defining the resistance to drugs of separate microorganisms species.