
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XXII, 12

SECTIO EE

2004

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska

Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej w Lublinie

MAGDALENA POPIOŁEK-PYRZ

*Ocena wrażliwości na antybiotyki wybranych szczepów
bakteryjnych wyizolowanych z mleka zbiorczego**

Assessment of Sensitivity to Antibiotics of Selected Bacterial Strains Isolated
from Collected Milk

W obecnej sytuacji, kiedy wysoki procent bakteryjnych szczepów chorobotwórczych pochodzenia zwierzęcego wykazuje brak wrażliwości na podstawowe preparaty antybiotykowe, wykonywanie antybiogramów jest stałą koniecznością. Niezależnie od stanu oporności bakterii, jaka może wystąpić w rejonie danej praktyki lekarsko-weterynaryjnej, obejmującej także leczenie różnych postaci *mastitis*, niezbędne jest wykonywanie szerokiego przeglądu wrażliwości drobnoustrojów na podstawowe antybiotyki (8). Zagadnienie to wydaje się wyjątkowo ważne w aspekcie zanieczyszczenia florą patogenną produktów pochodzenia zwierzęcego, a w szczególności mleka. Wykaz chorób, które mogą przenosić się przez mleko, przedstawił w swojej pracy Heesch (2). Na tym tle powstają też trudności z doбором antybiotyku do leczenia infekcji u ludzi wskutek nabywania oporności przez bakterie (3, 4).

Kiedy człowiekowi lub zwierzęciu podaje się antybiotyk, każdorazowo stwarza się pewien nacisk selekcyjny w kierunku rozwoju opornych szczepów bakteryjnych. Nacisk ten zależy od rodzaju stosowanego antybiotyku, liczby leczonych zwierząt oraz od sposobu dawkowania i czasu stosowania leku. Jest więc sprawą pierwszorzędnej wagi ograniczenie stosowania antybiotyków wyłącznie do sytuacji, w których jest to absolutnie konieczne (1).

Antybiotyki stanowią ciągle podstawową grupę środków stosowanych w leczeniu i zapobieganiu *mastitis* u krów. Jednakże coraz częściej widoczne są obniżone efekty terapii przeciwbakteryjnej mimo wprowadzania coraz to nowych generacji antybiotyków (5). Uzasadnione wydaje się więc prowadzenie badań

* Praca realizowana w ramach projektu badawczego KBN NR 3 PO6Z 057 24

monitorujących zmiany wrażliwości bakterii wywołujących zapalenia gruczołu mlekowego. Celem pracy była ocena antybiotykooporności szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka zbiorczego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło mleko surowe, pochodzące od dostawców indywidualnych z terenu Lubelszczyzny. Łącznie pobrano 120 prób mleka konwioowego. Badania prowadzone były od listopada 2002 r. do marca 2003 r. Pobrane jałowo mleko posiewano na następujące podłoża: agarowe wzbogacone krwią, Edward's–Chodkowskiego, Sabourauda (bio-Merieux) i Mac Conkeya (bio-Merieux). Po inkubacji w tem. 37°C przez 24 h wyrosłe kolonie identyfikowano wykorzystując próbę katalazową, koagulazową, test hemaglutynacji (Sildex Staph kit) i test API. Próbę uznawano za dodatnią, jeżeli wzrosło co najmniej 5 kolonii bakteryjnych.

Materiał do dalszych badań stanowiły wyizolowane szczepy *Staphylococcus aureus*, gronkowców koagulazo-ujemnych (CNS), paciorkowców i *Escherichia coli*. Wrażliwość na antybiotyki określano metodą krążkową na podłożu agarowym z dodatkiem 5% krwinek baranich oraz na podłożu Muellera-Hintona. Używano krążków produkcji krajowej (Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Warszawie). Interpretacji wyników dokonywano według zaleceń producenta.

Dokonano analizy oporności bakterii na następujące preparaty: penicylina, gentamycyna, streptomycyna, cefalosporyny, chloramphenicol, rifampicina, tetracyklina, ampicylina i neomycyna.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Omawiając otrzymane wyniki, należy stwierdzić, że mikroflora chorobotwórcza i warunkowo chorobotwórcza pochodząca z mleka zbiorczego charakteryzuje się antybiotykoopornością zbliżoną do szczepów izolowanych z wydzieliny zapalnej. Antybiotykooporność wybranych szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka zbiorczego przedstawia tabela 1.

Szczepy gronkowca złocistego okazały się odporne w 100% na penicylinę i w ponad 86% na ampicylinę, a 53,85% szczepów wykazało oporność w stosunku do tetracykliny. Niską oporność tych szczepów wykazano w stosunku do streptomycyny – 8% oraz chloramphenicolu – 16%. Zaobserwowano natomiast wyjątkowo wysoką wrażliwość na gentamycynę – 100%, rifampicynę – 100% i neomycynę – 100%. Wyniki badań Malinowskiego i wsp. (5) potwierdzają wysoką aktywność neomycyny w stosunku do gronkowców. Zakres wrażliwości na ten antybiotyk mieścił się w granicach 66,1–100%. W cytowanych badaniach wykazano również wysoką oporność gronkowców na penicylinę. W badaniach prowadzonych przez Wawrona i wsp. (8) również wykazano wysoką skuteczność neomycyny (92,2–100%) w stosunku do szczepów gronkowca złocistego oraz niską wrażliwość na kloksacyklinę, obniżającą się z 39,5% w 1994 r. do 18,9% w 1999 r.

Tab. 1. Ocena wrażliwości na antybiotyki wybranych szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka zbiorczego
The assessment of sensitivity to antibiotics of selected bacterial strains isolated from collected milk

Antybiotyki	Gronkowiec złocisty				Gronkowce koagulazo-ujemne (CNS)				Paciorkowce				Pałeczka okrężnicy (<i>E. coli</i>)			
	średnio wrażliwe i wrażliwe		oporne		średnio wrażliwe i wrażliwe		oporne		średnio wrażliwe i wrażliwe		oporne		średnio wrażliwe i wrażliwe		oporne	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Penicyllina	0	0	25	100	0	0	16	100	3	4,76	60	95,24	0	0	31	100
Gentamycyna	25	100	0	0	15	100	0	0	63	100	0	0	31	100	0	0
Streptomycyna	23	92	2	8	13	81,25	3	18,75	56	88,89	7	11,11	29	93,55	2	6,45
Cefalosporyny	4	66,67	2	33,33	6	85,71	1	14,29	22	88	3	12	7	77,78	2	22,22
Chloramphenicol	21	84	4	16	12	75	4	25	54	85,71	9	14,29	29	93,55	2	6,45
Rifampicyna	10	100	0	0	6	100	0	0	33	100	0	0	12	100	0	0
Tetracyklina	6	46,15	7	53,85	3	42,9	4	57,14	15	55,56	12	44,44	11	61,11	7	38,89
Ampicyllina	2	13,33	13	86,67	2	20	8	80	1	3,33	29	96,67	1	5,26	18	94,74
Neomycyna	6	100	0	0	3	100	0	0	11	100	0	0	4	100	0	0
Razem	97	64,67	53	35,33	60	67,2	36	32,8	258	68,25	120	31,75	124	67,39	60	32,61

Szczepy gronkowców koagulazo-ujemnych (Coagulase Negative Staphylococci) cechowały się najwyższą wrażliwością w stosunku do gentamycyny, rifampicyny i neomycyny (100%), nieco niższą do cefalosporyn (85,71%) i streptomycyny (81,25%), zaś nieaktywna, podobnie jak w przypadku *Staphylococcus aureus*, okazała się penicylina.

Paciorkowce – mieszana flora (*Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*) izolowane z mleka zbiorczego charakteryzowały się wysoką opornością w stosunku do ampicyliny i penicyliny – odpowiednio 96,67% i 95,24% szczepów. Wysoką zaś wrażliwość zaobserwowano w stosunku do neomycyny, gentamycyny i rifampicyny – 100%. Streptomycyna, cefalosporyny i chloramphenicol wykazywały aktywność wobec badanych szczepów, zawartą w przedziale 85,71–88,89%. W badaniach Malinowskiego i wsp. (5) wrażliwość paciorkowców na neomycynę i streptomycynę nie znalazła potwierdzenia, zaś Wawron i wsp. (8) stwierdzili, iż zdolność hamowania wzrostu paciorkowców przez neomycynę i streptomycynę była wysoka i mieściła się w granicach do 60 do 100%.

Oporność pałeczek okrężnicy (*E. coli*) kształtowała się następująco. Penicylina, wykazująca najniższą aktywność w stosunku do omawianych szczepów drobnoustrojów i w tym przypadku okazała się najmniej skuteczna. Wysoką oporność pałeczek *E. coli* wykazano także w stosunku do ampicyliny 94,74%, zaś wysoką wrażliwość badanych szczepów pałeczki okrężnicy zaobserwowano wobec rifampicyny, gentamycyny i neomycyny. Odsetek szczepów opornych na pozostałe antybiotyki kształtował się od 38,89% (tetracyklina) do 6,45% (streptomycyna). Wysoką wrażliwość *E. coli* wobec neomycyny zaobserwowali w swoich badaniach Roliński i wsp., jednakże wyniki własne nie potwierdzają wysokiej skuteczności streptomycyny wobec wyizolowanych szczepów *E. coli*.

W ostatnich latach wzrasta presja konsumentów w kierunku ograniczania lub nawet zaniechania stosowania antybiotyków, przede wszystkim w profilaktyce i terapii *mastitis*. Odnotowuje się wzrost, ale także wahania lekooporności *in vitro* oraz wyraźny spadek skuteczności antybiotyków, szczególnie w przypadku zapaleń gronkowcowych. Jednakże antybiotyki stanowią ciągle podstawową grupę środków stosowanych w leczeniu i profilaktyce *mastitis* (6). Ocena ich skuteczności z wykorzystaniem metody minimalnego stężenia hamującego potwierdza konieczność i celowość badań monitorujących antybiotykooporność.

WNIOSKI

1. Ziarniaki gram dodatnie (paciorkowce i gronkowce) oraz *E. coli* izolowane z badanego mleka cechowały się najwyższą opornością w stosunku do penicyliny (95,24%–100%) oraz ampicyliny (86,67%–96,67%).

2. Najwyższą aktywność w stosunku do badanych szczepów, zarówno gronkowców, paciorkowców, jak i pałeczki okrężnicy, wykazały rifampicyna, gentamycyna i neomycyna.

PIŚMIENNICTWO

1. Federacja Lekarzy Weterynarii Europy (FVE) z zaleceniem opublikowania we wszystkich krajach członkowskich i kandydujących do członkostwa. Antybiotykooporność a racjonalne stosowanie antybiotyków w weterynarii. *Życie Wet.*, 74, 483, 1999.
2. Heeschen W. H.: Health and hygiene requirements for raw milk. Proc. XVIII World Buiatrics Congress. Bologna, vol. 1, 195, 1994.
3. Kania B. F.: Działanie, stosowanie i dawkowanie antybiotyków polipetydowych u zwierząt. *Med. Wet.*, 57, 171, 2001.
4. Malinowski E.: Przyczyny, leczenie i zapobieganie *mastitis* u krów. PIWET, Puławy 1997.
5. Malinowski E., Pilaszek J., Kłossowska A., Sobolewska S., Sobolewski J.: Zmiany wrażliwości na antybiotyki bakterii wyisobnionych z klinicznych postaci *mastitis* u krów w latach 1987–1996. *Med. Wet.*, 53, 722, 1997.
6. Malinowski E., Kłossowska A., Kaczmarowski M., Kotowski K., Nadolny M., Kuźma K.: Stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów i czynniki etiologiczne *mastitis* w przypadkach wysokiej liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym. *Med. Wet.*, 59, 128, 2003.
7. Roliński Z., Sobol M., Skrotwicz J.: Komputerowa analiza antybiogramów drobnoustrojów izolowanych od bydła i owiec. *Med. Wet.*, 55, 30, 1999.
8. Wawron W., Szczubiał M., Piech T., Krzyżanowski J., Wrona Z., Krakowski L.: Ocena wrażliwości na antybiotyki bakterii wyizolowanych z przypadków *mastitis* u krów. *Med., Wet.* 56, 675, 2000.

SUMMARY

Currently, antibiotics constitute the main treatment method used both in prophylaxis and curing of mastitis. However, it was noted that the effectiveness of such treatment deteriorates despite the introduction of new generations of antibiotics. The aim of the study was to assess the resistance to antibiotics of bacterial strains isolated from collected milk and which are the most common cause of mastitis in cows. The research material were *Staphylococcus aureus*, CNS, *Streptococcus* and *E. coli* strains. The antibiotics used in the analysis of the bacterial resistance were: penicilin, gentamicin, streptomycin, cephalosporus, chloramphenicol, rifampicin, tetracyclin and neomycin. The sensitivity to antibiotics was evaluated with the use of the paper disc method on the agar base with 5% of sheep blood cells added and on Mueller-Hinton base. The paper discs were Polish-made and the results were interpreted according to the producer suggestions. The research results indicate that streptococci, staphylococci and *E. coli* strains isolated from milk were characterized by the highest resistance to penicilin (95.24–100%) and ampicilin (86.67–96.67%). The highest effectiveness in respect of all the examined strains was shown by rifampicin, gentamicin and neomycin.