

## STAFILOKOKŲ, IŠSKIRTŲ IŠ OŽKŲ MASTITINIO PIENO, JAUTRUMAS ANTIMIKROBINĖMS MEDŽIAGOMS

Jūratė Šiugždaitė, Henrikas Žilinskas, Vilija Laurinavičiūtė, Antanas Banys, Arūnas Rutkauskas  
Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18. LT- 47181 Kaunas; tel. (8~ 37) 36 23 92;  
faks. (8~ 37) 36 24 17; el. paštas: [jurate.siugzdaite@lva.lt](mailto:jurate.siugzdaite@lva.lt)

**Santrauka.** Ištyrus 205 ožkų pieną laktacijos periodu, padidėjęs somatinių ląstelių skaičius (SLS) nustatytas 34,2% atvejų. Mūsų tyrimų duomenys parodė, kad tirtose privačiose ožkų fermose pagrindiniai slaptojo mastito sukėlėjai yra koaguliagai teigiami ir koaguliagai neigiami stafilokokai. Didžiausių nuostolių ožkų augintojams daro šios genties atstovas – *S. aureus*. Kontaginių mikroorganizmų plitimą predisponuoja užkrėstos plovimo pašluostės, melžimo aparatai ar melžimo įrenginiai, melžėjų rankos. Tirtose ožkų fermose kontaginis mikroorganizmas *S. aureus* išskirtas 44,4% atvejų. Ožkos, sergančios slaptuoju mastitu, antibiotikais dažniausiai gydomos laktacijos pabaigoje, prieš užtrūkimą. *S. aureus* sukeltiems slaptiesiems mastitams bandoje išnaikinti, ožkos gydomos ir laktacijos metu. Išskirtos *S. aureus* padermės testuotos fermento beta laktamazės atžvilgiu. Beta laktamazę gamino 60% tirtų *S. aureus* padermių. Išskirtų koaguliagai teigiamų ir koaguliagai neigiamų stafilokokų padermės jautriausios antimikrobinei medžiagai synuloksui – 82,2%. *S. aureus* padermės, gaminusios fermentą beta laktamazę, jautriausios synuloksui – 66,7% ir oksacilinui – 33,3%. Meticilinui atsparių *S. aureus* padermių neišskyrėme.

**Raktažodžiai:** ožkos, slaptasis mastitas, *Staphylococcus aureus*, antimikrobinės medžiagos.

## ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF STAPHYLOCOCCUS ISOLATED FROM MILK OF GOATS WITH MASTITIS

**Summary.** Milk samples were taken from 205 lactating dairy goats. The increase of somatic cell count was determined in 34.2 % of samples. *Staphylococcus aureus* is a major pathogen for goats, causing subclinical mastitis. It was estimated, that the main pathogens in goats were *Staphylococcus* genus microorganisms (70.3%). *Staphylococcus aureus*, which produced majority of damages, was isolated in 44.4% of the total cases. Milking machine liners, milker cloths, milkmaid hands transmit contagious microorganisms.

The isolated *S. aureus* strains were tested to beta lactamase production. Sixty percent of the strains of *S. aureus* produced beta lactamase. The isolated strains of coagulase positive and coagulase negative were sensitive for antimicrobial material – synulox (82.2%). The *S. aureus* strains produced the beta lactamase were sensitive for synulox – 66.7% and for the oxacillin – 33.3%. None of the *Staphylococcus aureus* strains isolated was methicillin – resistance.

**Keywords:** goats, subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial materials.

**Įvadas.** Mastito etiologijoje svarbų vaidmenį vaidina mechaniniai, fiziniai ir cheminiai veiksniai. Tačiau svarbiausias vaidmuo tenka mikroorganizmams. Ožkoms slaptąjį ir klinikinį mastitą dažniausiai sukelia *Staphylococcus* genčių mikroorganizmai. Gyvulių registro duomenimis, Lietuvoje 2005 metų sausio 1 dieną registruotos 6 819 ožkos, iš jų 3 495 ožkavedės (VĮ Žemės ūkio informacijos ir kaimo verslo centras, 2005). Literatūros šaltinių duomenimis, kontaginiai mikroorganizmai iš *Staphylococcus* genties mūsų šalyje sukelia nuo 29,03% iki 54,84% mastitų (Šiugždaitė, Ambrozienė, 1999; Laurinavičiūtė ir kt., 2003). Išskyrus mastito sukėlėjus ir juos identifikavus, būtina nustatyti atsparumą antimikrobinėms medžiagoms (Franklin, 1999; Olsen, 1999; Wawron et al., 2000; Oppegaard, 2000). Iš *Staphylococcus* genties mikroorganizmų daugiausia problemų ožkų augintojams kelia *Staphylococcus aureus* (Schelegova, Šeidiva, 1999; White, Hinckley, 1999; Amen, Tari, 2000). Šio mikroorganizmo sukeltoms infekcijoms gydyti iki 1950 metų buvo taikomas penicilinas G. Pastebėta, kad nuo 1950 metų *Staphylococcus aureus* atsparumas šiam antibiotikui padidėjo (Olsen, 1999). Priežastis – *Staphylococcus aureus* padermių gaminamas fermentas beta laktamazė. Ją (penicilazę) gaminantys stafilokokai jautrūs tik meticilino (oksacilino) grupės arba kitiems penicilinams, jeigu jie

naudojami su beta laktamazių slopintojais (klavulano rūgštimi, tazobaktamu) (Huovinen, 1999; Franklin, 1999). 1959 metais pavyko susintetinti penicilino (metcilino) darinius, atsparius beta laktamazės hidrolizei. Deja, pradėjus naudoti metciliną gydymui, *Staphylococcus aureus* padermės tapo atsparios metcilinui (MASA) (Huovinen, 1999; Alborzi et al., 2000). Mokslinės literatūros šaltiniuose nurodoma, kad atsparumo priežastis ne beta laktamazės gamyba, o bakterijoje esantis *mecA* genas (Udo et al., 2001; Japoni et al., 2004). Manoma, kad MASA padermės atsirado dėl jų sukeltų infekcijų gydymo, kadangi antimikrobinių medžiagų pasirinkimas limituotas. MASA padermės atsparios makrolidams ir tetraciklinams (Chopra, Roberts, 2001).

Ožkos, sergančios slaptuoju mastitu, antibiotikais dažniausiai gydomos laktacijos pabaigoje, prieš užtrūkimą. Tačiau *S. aureus* infekcijoms bandoje išnaikinti ožkos gydomos ir laktacijos metu. Išskirtos iš ožkų mastitinio pieno *S. aureus* padermės jautrios vankomicinui – 100%, cefalotinui – 96%, atsparios – penicilinui nuo 39,2% iki 96,1%, ampicilinui – 88,2%, oksacilinui – 3,4%, tetraciklinui – 10,8% (Vierira-Da-Motta et al., 2000). *E. coli* padermės, išskirtos iš mastitinio pieno, jautrios norfloksacinui – 96,96%, gentamicinui – 78,78%, atsparios – amoksacilinui

(Schelegova, Šeivida, 1999). Sergančių ožkų gydymas turėtų būti tikslus – gydyti reikia tomis antimikrobinėmis medžiagomis, kurioms jautrios grynios mikroorganizmų kultūros. Pagal antibiogramos duomenis turi būti parenkamas tinkamas gydymas, nes kitu atveju skatinamas atsparių antimikrobinėms medžiagoms padermių vystymasis. Nepasveikusias ožkas, kad neplatintų kontaginių mikroorganizmų, greitai plintančių bandoje, reikia išbrokuoti.

**Darbo tikslas** – iš ožkų mastitinio pieno išskirti koaguliazę teigiamus ir koaguliazę neigiamus stafilokokus, juos identifikuoti ir nustatyti jautrumą antimikrobinėms medžiagoms.

**Tyrimo objektas ir metodai.** Tyrimai atlikti 2003–2004 metais Kauno (125 ožkos) ir Vilniaus (80 ožkų) apskričių ožkų ūkiuose. Mėginiai imti iš 112 Zaaneno ir 93 vietinės veislės 2–6 metų ožkų vakarinio melžimo pieno. Slaptojo mastito tyrimas atliktas nustatant somatinių ląstelių skaičių (SLS) piene. Visų ožkų tešmens pusių pieno mėginiai tirti netiesioginiu greituoju „California Mastitis Test“ (CMT). Iš tešmens pusių, kuriose nustatyta teigiama CMT reakcija, slaptojo mastito sukėlėjams išskirti mikrobiologijos laboratorijoje iš sterilius mėgintuvėlius paimta po 5 ml pieno.

Pieno mėginiai (po 0,01 ml) pasėti ant paprastų maitinamųjų terpių – Kolumbijos kraujo agarą, kraujo agarą, mėsos peptono agarą ir selektyvinių maitinamųjų terpių – Levino, Mac-Conkey, Manito agarą (Oxoid, Anglija). Užsėtos lėkštelės kultivuotos aerobinėmis ir fakultatyvinėmis anaerobinėmis sąlygomis 37°C temperatūroje. Išskirti patogeniniai mikroorganizmai identifikuoti pagal kultūrinės, biocheminės ir antigeninės savybes. Jų morfologija iširta paruoštus preparatus nudažius Gramo būdu (Diagnostica Merck, Vokietija) ir mikroskopavus. Koaguliazės testu (Liofilchem, Italija) nustatyti koaguliazę teigiami (KTS) – patogeniniai ir koaguliazę neigiami – sąlyginai patogeniniai stafilokokai (KNS). *S. aureus* iki rūšies identifikuoti „Staphytest Kit“ (Oxoid, Anglija) testu. Nustatyti, ar *Staphylococcus aureus* gamina fermentą beta laktamazę (penicilazę), naudotas beta laktamazės testas (Liofilchem, Italija). Streptokokai identifikuoti CAMP ir „Streptococcal grouping Kit“ (Oxoid, Anglija). *E. coli* patogeninėms rūšims identifikuoti naudoti monovalentiniai ir polivalentiniai serumai (Sanofi diagnostics Pasteur, Prancūzija). *Pseudomonas aeruginosa* identifikuota naudojant diferencinę–diagnostinę terpę Mac Conkey agarą ir selektyvinę terpę „Pseudomonas Cetrimide agar“ (Liofilchem, Italija). *Bacillus* spp. identifikuota pagal hemolizę kraujo agarą ir morfologiją.

Išskirtų mikroorganizmų jautrumas antimikrobinėms medžiagoms nustatytas modifikuotu Kirby ir Bauerio metodu (indikatorinių diskų metodu), kaip rekomenduojama NCCLS (National Committee for Clinical Standards, 1995). Jautrumui antimikrobinėms medžiagoms nustatyti mikroorganizmų gryną kultūrą sėta į specialią maitinamąją Miuler–Hinton terpę. Mikroorganizmai resuspenduoti fiziologiniame tirpale iki 0,5 Mac Farland vieneto optinio tankio. Tiriamosios mikroorganizmų kultūros (0,25 ml) pasėtos į atskiras Petri lėkštes, ant lėkštelės paviršiaus sudėti įvairūs indikatoriniai antibiotikų diskai (Oxoid, Anglija): oksacilino (1 µg), amoksicilino (20 µg), synulokso (30

µg), karbenicilino (10 µg), oksitetraciklino (30 µg), tetraciklino (30 µg), penicilino G (10 v/v), eritromicino (15 µg), cefalotino (30 µg), enrofloksacino (5 µg), orbenino (25 µg), gentamicino (10 µg), neomicino (30 µg) ir ampicilino (10 µg). Petri lėkštelės su pasėtomis tiriamosiomis mikroorganizmų padermėmis kultivuotos 24–48 valandas termostate 37°C temperatūroje. Tada liniuote išmatuotos visų diskų sritys (skersmuo mm), kuriose slopintas mikroorganizmų augimas, kaip rekomenduojama NCCLS (National Committee for Clinical Standards, 1995).

**Rezultatai.** Ištyrus 205 ožkų pieną laktacijos periodu, padidėjęs somatinių ląstelių skaičius (SLS) nustatytas 34,2% atveju. Slaptojo mastito sukėlėjams išskirti tirti ožkų mastitinio pieno mėginiai su padidėjusiu SLS. Mikrobiologinio tyrimo duomenys parodė, kad pagrindiniai slaptojo mastito sukėlėjai tirtose Kauno ir Vilniaus apskričių ožkų fermose yra koaguliazę teigiami ir koaguliazę neigiami stafilokokai – 70,3%. Kontaginis mikroorganizmas *S. aureus* identifikuotas 44,4% atveju. Išskirtos *S. aureus* padermės testuotos fermento beta laktamazės atžvilgiu. Ją (penicilazę) gamino 60% tirtų *S. aureus* padermių.

Nustatyta, kad aplinkos slaptąjį mastitą sukėlė *Escherichia coli* – 9,3%, *Streptococcus uberis* – 7,8%, *Pseudomonas aeruginosa* – 6,3%, *Bacillus* spp. – 6,3%. Mikrobiologinio tyrimo duomenys pateikti 1 paveiksle.

Nustatytas identifikuotų grynų mikroorganizmų kultūrų jautrumas antimikrobinėms medžiagoms. *S. aureus* padermės, kurios gamino fermentą beta laktamazę, naudoti oksacilino ir synulokso indikatoriniai diskai. Išskirtų koaguliazę teigiamų ir koaguliazę neigiamų stafilokokų padermės jautriausios antimikrobinei medžiagai synuloksui – 82,2% (37 padermės), atspariausios enrofloksacinui – 13,3% (6 padermės), cefalotinui – 4,5% (2 padermės) (2 pav.).

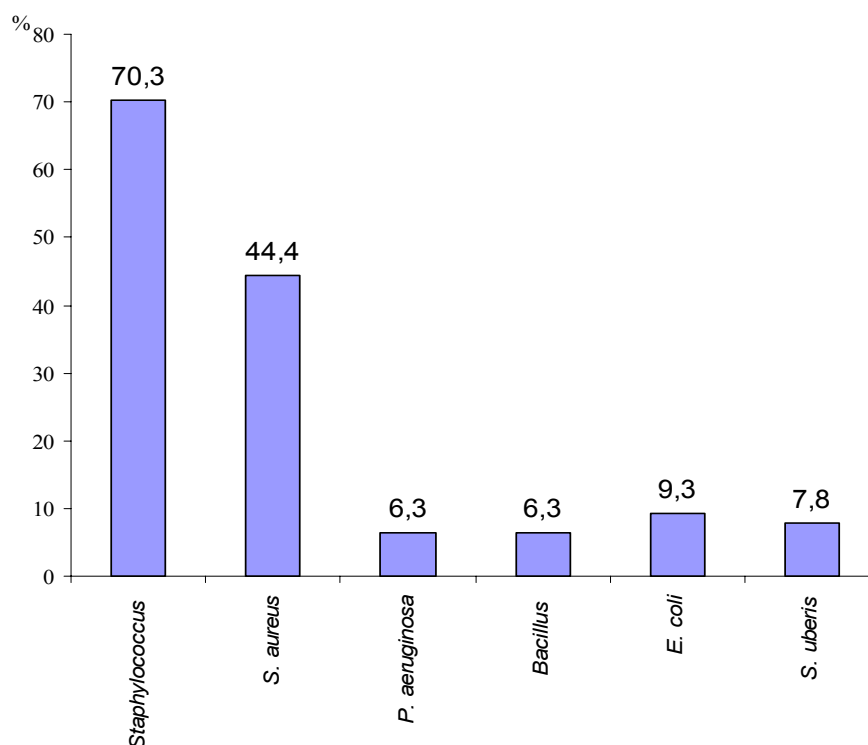
*S. aureus* padermės, gaminusios fermentą beta laktamazę, jautriausios synuloksui – 66,7% (8 padermės) ir oksacilinui – 33,3% (4 padermės). Nustatyta, kad *S. aureus* padermės rezistentiškos oksacilinui, nejautrios – aminoglikozidams, tetraciklinams, makrolidams. Meticilinui atsparių *S. aureus* padermių nebuvo nustatyta.

Tyrimo duomenys parodė, kad aplinkos mastito sukėlėjai streptokokai jautriausi synuloksui (60%) ir penicilinui G (40%). *E. coli* išskirtos padermės jautriausios enrofloksacinui – 66,7%, gentamicinui – 33,3%, *P. aeruginosa* padermės – gentamicinui (75%) ir enrofloksacinui (25%).

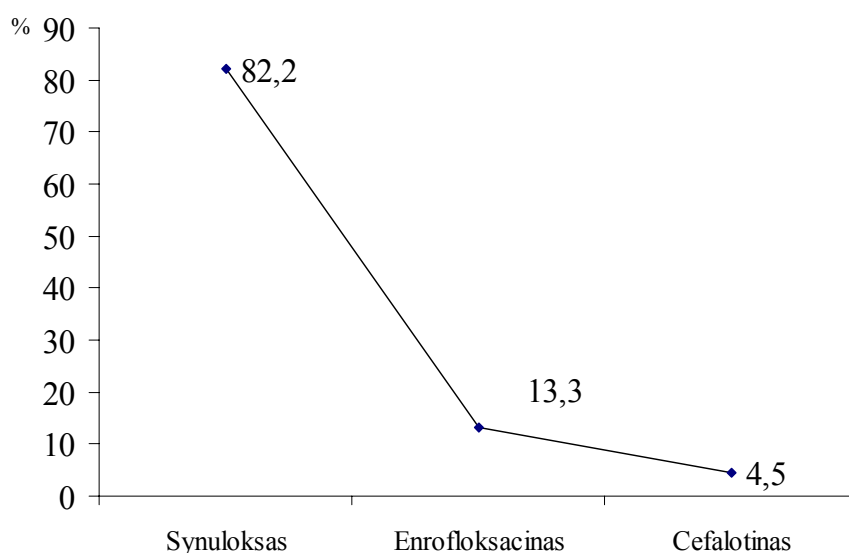
**Rezultatų aptarimas.** Mūsų tyrimų duomenys parodė, kad tirtose privačiose ožkų fermose pagrindiniai slaptojo mastito sukėlėjai – *Staphylococcus* genties mikroorganizmai (70,3%). Didžiausių nuostolių ožkų augintojams daro šios genties atstovai – *S. aureus*. Kontaginių mikroorganizmų plitimą predisponuoja užkrėstos plovimo pašluostės, melžimo aparatai ar melžimo įrenginiai, melžėjų rankos. Tirtose ožkų fermose *S. aureus* išskirtas 44,4% atveju. Literatūros šaltinių duomenimis, mūsų šalyje ožkoms slaptąjį mastitą *Staphylococcus* genties mikroorganizmai sukelia 29,03–54,84% atveju (Šiugždaitė, Ambrozienė, 1999; Laurinavičiūtė ir kt., 2003). Ypač žalingos *Staphylococcus aureus* padermės, gaminančios fermentą

beta laktamazę (penicilazę) (Franklin, 1999; Huovinen, 1999). Ją gaminantys stafilokokai ardo laktaminį žiedą, kuris yra penicilinų ir cefalosporinų struktūros pagrindas, ir lemia jų baktericidinį poveikį (Olsen, 1999). Nustatėme, kad beta laktamazes gamina 60% išskirtų *S. aureus* padermių. Beta laktamazes gaminantys stafilokokai jautrūs tik meticilino (oksacilino) grupės penicilinams arba penicilinams, naudojamiems su beta laktamazių slopintojais (klavulano rūgštimi, tazobaktamu) (Franklin, 1999). Tyrimais nustatėme, kad stafilokokų

padermės, gaminusios beta laktamazes, jautriausios synuloksui (66,7%). Į šios antimikrobinės medžiagos sudėtį įeina ir beta laktamazių slopintojas – klavulano rūgštis. *S. aureus* padermės, gaminusios beta laktamazes, jautrios ir oksacilinui (33,3%). Literatūroje nurodoma, kad pradėjus gydyti meticilinu *S. aureus* atsirado padermės, atsparios šiam antibiotikui (Huovinen, 1999; Alborzi et al., 2000; Japoni et al., 2004). Tyrimais neišskyrėme *S. aureus* padermių, atsparių meticilinui.



1 pav. Ožkų slaptojo mastito sukėlėjai



2 pav. *Staphylococcus* spp. jautrumas antibiotikams

Ožkos, sergančios slaptuoju mastitu, antibiotikais dažniausiai gydomos laktacijos pabaigoje, prieš užtrūkimą. Gydant labai svarbu parinkti tinkamą antimikrobinio vaisto dozę. Jei vaisto kiekis

nepakankamas, audiniuose nesusidaro terapinė vaisto koncentracija ir slapta infekcija gali pereiti į lėtinę, o sukėlėjai įgyja atsparumą naudojamoms antimikrobinėms medžiagoms.

**Išvados.**

1. Mūsų tirtose ožkų fermose slaptasis mastitas išplitęs 34,2% atvejų.
2. Tirtose ožkų fermose vyravo koaguliazei teigiami ir koaguliazei neigiami stafilokokai – 70,3%.
3. Kontaginis mikroorganizmas *Staphylococcus aureus* identifiikuotas 44,4% atvejų.
4. *Staphylococcus aureus* padermės, gaminusios fermentą beta laktamazę, jautriausios synuloksui – 66,7%.

## Literatūra

1. Amen J. A., Tari I. S. Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. Small Ruminant Research, 2000. Vol. 35. P. 1–5.
2. Alborzi A., Pourabbas B. A., Salehi H., Pourabbas H., Oboodi B., Panheshahin M. R. Prevalence and pattern of antibiotic sensitivity of methicillin – sensitivity and methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in shiraz. Iran. J. Med. Sci., 2000. Vol. 25. Vol. 1–8.
3. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2001. Vol. 82. P. 243–259.
4. Franklin A. Current status of antibiotic resistance in animal production. Acta Veterinaria Scandinavica, 1999. Suppl. Vol. 92. P. 23–28.
5. Huovinen P. Bacterial resistance; an emerging health problem. Acta Veterinaria Scandinavica, 1999. Suppl. Vol. 92. P. 7–13.
6. Japoni A., Alborzi A., Orafa F., Rasouli M., Farshad S. Distribution patterns of methicillin resistance genes (*mec A*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. Iranian Biomedical Journal, 2004. Vol. 8. P. 173–178.
7. Laurinavičiūtė V., Šiugždaitė J., Urbšienė D. Ožkų slaptosio mastito diagnozavimas ir patogeninių mikroorganizmų išskyrimas. Veterinarija ir zootechnika, 2003. T. 24 (45). P. 30–33.
8. National Committee for Clinical Standards. Approved standard M 7-A. methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania. USA. 1995.
9. Olsen J. E. Antibiotic resistance: genetic mechanisms and mobility. Acta Veterinaria Scandinavica, 1999. Suppl., Vol. 92. P. 23–28.
10. Oppegaard H. Antibiotic resistance in staphylococci isolated from dairy cows with mastitis – genetic aspects. Nors Veterinaertidsskrift, 2000. Vol. 112. P. 681–684.
11. Schelegova J., Šeidiava I. Resistance to antimicrobial drugs of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk. Veterinarstvi, 1999. Vol. 49. P. 470–472.
12. Šiugždaitė J., Ambroziene S. Ožkų mastito sukėlėjai. Veterinarija ir zootechnika, 1999. T. 7 (29). P. 28–29.
13. VĮ Žemės ūkio informacijos ir kaimo verslo centras. www.vic.lt.
14. Vierira–Da–Motta O., Donatele D. M., Oliveira P. R., Folly M. M. Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* from mastitic milk in Rio-de Janeiro State, Brazil. Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria, 2000. Vol. 2000. Vol. 7. P. 123–126.
15. Wawron W., Szczubial M., Piech T., Krzyzanowski L. Antibiotic – sensitivity of bacteria isolated from cases of bovine mastitis. Medycyna Weterynaryjna, 2000. Vol. 56. P. 675–679.
16. White E., Hinckley L. S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. Small Ruminant Research, 1999. Vol. 33. P. 117–121.
17. Udo F. F., Jacob I. F., Mathew R. Genetic analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* expressing high and low mupirocin resistance. J. Med. Microbiol., 2001. Vol. 50. P. 909–915.