

STAFILOKOKŲ, IŠSKIRTŲ IŠ KARVIŲ MASTITINIO PIENO, ĮVAIROVĖ IR ATSPARUMAS ANTIMIKROBINĖMS MEDŽIAGOMS

Irena Klimienė¹, Modestas Ružauskas¹, Raimundas Mockeliūnas¹, Rita Šiugždinienė¹, Vytautas Špakauskas², Algimantas Matusevičius², Asta Pereckienė³, Česlova Butrimaitė-Ambrozevičienė³

¹*Veterinarijos institutas, Veterinarijos akademija, LSMU*

Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, tel. +370 698 87 699; el. paštas: klimiene@lva.lt

²*Neužkrečiamųjų ligų katedra, Veterinarijos akademija, LSMU; Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas*

³*Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas; J. Kairiūkščio g. 10, LT-08409 Vilnius*

Santrauka. Darbo tikslas – įvertinti *Staphylococcus* genties rūšių, išskirtų iš karvių mastitinio pieno, įvairovę ir nustatyti jų atsparumą antimikrobinėms medžiagoms. Iš karvių mastito buvo išskirta 516 *Staphylococcus* genties bakterijų padermių, t. y. 58,6 proc. visų tyrimo metu išskirtų bakterijų. Identifikuota keturios stafilokokų rūšys. Vyravo KTS atstovai: *Staphylococcus aureus* – 34,1 proc., *Staphylococcus hyicus* – 26,4 proc., *Staphylococcus intermedius* – 5,4 proc. Tyrimo metu identifikuotas KNS atstovas – *Staphylococcus epidermidis* – 34,1 proc. *S. aureus* padermės buvo atsparios streptomycinui (78,3 proc.), klindamicinui (22,3 proc.), neomicinui (13,3 proc.), tetraciklinui (13,0 proc.) ir eritromicinui (12,8 proc.). 78,6 proc. *S. intermedius* identifikuotų padermių buvo atsparios streptomycinui, 3,6 proc. – tetraciklinui, 14,3 proc. – enrofloksacinui, 21,4 proc. – norfloksacinui. 50 proc. *S. hyicus* padermių buvo atsparios streptomycinui, 18,0 proc. – tetraciklinui, 17,2 proc. – enrofloksacinui ir 16,7 proc. – norfloksacinui. KNS atstovo *S. epidermidis* 74,1 proc. padermių buvo atsparios streptomycinui, 24,2 proc. – tetraciklinui, 18,6 proc. – linkomicinui, 11,8 proc. – eritromicinui. Fluorchinolonomams buvo jautrūs *S. aureus*, *S. epidermidis*, o 16,9 proc. *S. hyicus* ir 17,8 proc. *S. intermedius* padermių buvo atsparios. Skirtingų rūšių stafilokokai buvo atsparūs skirtingoms antimikrobinėms medžiagoms, tačiau mažiau atsparių padermių buvo KNS *S. epidermidis* (17,8 proc.), o daugiau – KTS (20,9 proc.).

Raktažodžiai: karvių mastitas, *Staphylococcus* padermės, antimikrobinis atsparumas.

THE VARIETY OF STAPHYLOCOCCUS, EXTRACTED FROM COWS MASTITIS SAMPLES, AND THEIR RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

Irena Klimienė¹, Modestas Ružauskas¹, Raimundas Mockeliūnas¹, Rita Šiugždinienė¹, Vytautas Špakauskas², Algimantas Matusevičius², Asta Pereckienė³, Česlova Butrimaitė-Ambrozevičienė³

¹*Veterinary Institute of Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences*

Tilžės str. 18, LT-47181, Kaunas, Lithuania, Tel: +370 698 87699; E-mail: klimiene@lva.lt

²*Department of Non-Infectious Diseases, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences*

Tilžės str. 18, LT-47181, Kaunas, Lithuania

³*National Food and Veterinary Risk Assessment Institute, J. Kairiūkščio str. 10, 08409 Vilnius*

Summary. The objective of this study was to evaluate the variety of *Staphylococcus* species isolated from milk samples of cow mastitis and to determine their resistance to antimicrobials. 516 strains of *Staphylococcus* were isolated from cow mastitis samples with total rate of 58.6%. In general, four species of staphylococci were identified. CPS were the most predominant: *Staphylococcus aureus* – 34.1 %, *Staphylococcus hyicus* – 26.34 % and *Staphylococcus intermedius* – 5.4 %. *Staphylococcus epidermidis* as CNS species was found as well in amount of 34.1 % from all staphylococci. *S. aureus* isolates demonstrated clinical resistance to streptomycin (78.3 %), clindamycin (22.3 %), neomycin (13.3 %), tetracycline (13.1 %) and erythromycin (12.8 %), whereas *S. intermedius* were resistant to streptomycin (78.6 %), tetracycline (3.6 %), enrofloxacin (14.3 %) and norfloxacin (21.4 %). 50 % of identified *S. hyicus* were resistant to streptomycin, 18.0 % to tetracycline, 17.2 % to enrofloxacin and 16.7 % to norfloxacin. 74.1 % of *S. epidermidis* isolates demonstrated resistance to streptomycin, 24.2 % to tetracycline, 18.6 % to lincomycin and 11.8 % to erythromycin. *S. aureus*, *S. epidermidis* were sensitive to fluoroquinolones. Different species staphylococcus were resistant to different antimicrobial substances. However, less resistances strains were CNS *S. epidermidis* (17.8 %), and more resistant CPS (20.9 %).

Keywords: cow mastitis, *Staphylococcus* spp., antimicrobial resistance.

Įvadas. Stafilokokai gyvulininkystę plėtojančiose šalyse, sukelia 27–69 proc. karvių mastito. Tai plazmokoaguliaciškai teigiami (KTS) ir plazmokoaguliaciškai neigiami (KNS) stafilokokai – *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. xylophilus*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* subs. *coagulans*

ir koaguliaciškai kintamas *S. hyicus*. Sukėlėjo rūšies nustatymas ir paplitimo mastas priklauso nuo diagnostikos metodų (Taponen et al., 2008). *S. aureus* yra patogeniškas žmonėms ir gyvūnams, todėl laikomas svarbiausiu KTS. Pieno ūkyje persistuojantis *S. aureus* 3,2–63,0 proc. gali būti subklinikinio mastito priežastis. Tyrėjai nurodo, kad *S. aureus* sukėlto mastito Europos

šalyse mažėja, o svarbiais tampa kiti mastito sukėlėjai (Pitkälä et al., 2004; Bradley et al., 2007; Ericsson Unnerstad et al., 2009).

Ilgą laiką buvo manoma, kad kiti stafilokokai kaip tešmens patogenai nereikšmingi, ir jų sukulto mastito epidemiologija nebuvo detalai studijuota. Buvo teigta, kad KNS yra spenio odos oportunistai, kurie paprastai gyvena ant tešmens odos. Tačiau pastaraisiais metais atlikti tyrimai požiūrį pakeitė. S. Pyörälä ir S. Taponen (2009) nurodo, kad vien tik 16 KNS rūšių atstovų yra galvijų mastito priežastis, o anot T. L. Bannerman ir S. J. Peacock (2007), 30 KNS rūšių ir kai kurios iš jų yra pripažintos kaip potencialūs patogenai ir žmonėms, ir gyvūnams. Dėl tokios gausios rūšinės įvairovės ir jos kaitos reikalingi ne tik rutininiai laboratoriniai tyrimai atliekant gyvūnų ligų diagnostiką, bet ir nuolatiniai moksliniai tyrimai nustatant vyraujančius mastito etiologinius agentus, jų biologinių savybių kintamumą. Lietuvoje nėra tyrimų duomenų, kokią dalį karvių mastito sukelia kitos stafilokokų (be *S. aureus*) rūšys.

Stafilokokai, kurie dažniausiai sukelia ligas žmonėms, yra *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* ir *S. saprophyticus*, o *S. simulans*, *S. chromogenes* ir *S. epidermidis* – labiau paplitę galvijų mastito sukėlėjai. Šių mikroorganizmų sukulto uždegimo metu somatinių ląstelių piene padaugėja 2–3 kartus. KNS sukeltas mastitas yra dažniau subkliniškas, o telyčios ir pirmaveršės karvės yra imlesnės KNS (Lüthje, Schwarz, 2006; Taponen et al., 2008).

Pienininkystės ūkiuose karvėms nuo mastito gydyti dažnai naudojami vaistai, kurių sudėtyje yra aminoglikozidų, cefalosporinų, makrolidų, linkozamidų, beta laktamų, jų derinio su beta laktamazių inhibitoriais, svarbiais ir žmogaus medicinoje. Antibiotikai karvėms, sergančioms mastitu, gydyti ar prevencijai yra atsparių mikroorganizmų išsivystymo šiems antibiotikams priežastis. Be to, bakterijų atsparumas per maisto grandinę perduodamas žmonėms (Weese et al., 2005; Hawari, Al-Dabbas, 2008).

Patogeninių bakterijų atsparumo didėjimas antibiotikams kelia grėsmę antibakterinio gydymo sėkmei. Atsparūs antibiotikams mikroorganizmai plinta gyvūnų bandose, jų sukeltos ligos yra sunkiai gydomos. Mastitą sukelia įvairios bakterijų rūšys, todėl reikia žinoti atskirame areale (ar šalyje) labiausiai paplitusius mastito sukėlėjus ir jų atsparumą. Nors pageidaujama, kad esant bakterinės kilmės infekcijai būtų nustatyta bakterijų jautrumas antibiotikams kiekvienu atveju, praktika rodo, kad tas atliekama ne visada. Kol taikomas ir empirinis antibiotikų parinkimas gydymui, reikia žinoti atskirų bakterijų rūšių ir populiacijų jautrumą antibiotikams atskirame regione. Tokie duomenys turėtų būti nuolat atnaujinami, nes situacija nuolat kinta.

Darbo tikslas – nustatyti *Staphylococcus* genties rūšių, išskirtų iš karvių mastitinio pieno, įvairovę ir įvertinti jų atsparumą antimikrobinėms medžiagoms.

Medžiagos ir metodai. Karvių mastito sukulto *Staphylococcus* genties rūšių įvairovė ir jų atsparumas antimikrobinėms medžiagoms tirta 2008–2010 m. Karvių,

sergančių mastitu, pienas pristatytas iš įvairių šalies rajonų, skirtingo dydžio karvių bandų įvairiu metų laiku. Sergančių klinikiniu mastitu ar turinčių didelį SLS karvių pienas iš pažeistų tešmens ketvirčių po melžimo aseptiškai imtas į sterilius indelius. Bakteriologiniai tyrimai atlikti akredituotoje pagal LST EN ISO/IEC 17025 standarto reikalavimus laboratorijoje. Mastito sukėlėjai buvo identifikuoti pagal standartizuotą metodiką SDP 5.4.4.B.6 „Pagrindinių mastitą sukeliančių bakterijų nustatymas piene“ (2009). Mėginiai mikrobiologiniam tyrimui sėti į Petri lėkšteles su kraujo agaru ir selektyvinėmis mitybinėmis terpėmis (Oxoid, Anglija). Užsėtose Petri lėkštelėse 24–48 val. kultivuotos termostate +37°C temperatūroje. Išskirtų mikroorganizmų morfologijai nustatyti iš kultūrų paruošti tepinėliai dažyti Gramo metodu („Diagnostika Merck“, Vokietija) ir stebėti mikroskopu. Išaugusios kultūros sėtos į manitolio druskos agarą, DNR-azės, šlapalo terpes. Taip pat vertinta hemolizė, maltozės skaldymas, oksidazės testas ir plazmokoaguliazė, su 3 proc. vandenilio peroksido tirpalu įvertinta katalazės gamyba.

Bakterijų jautrumas antimikrobinėms medžiagoms tirtas Kirby-Bauer metodu pagal CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, JAV) rekomendacijas (NCCLS, 2002). Tyrimui naudota vienos serijos kieta terpė „Mueller Hinton Agar II“ (Oxoid, Anglija). Naudoti šių koncentracijų antibiotikų diskai: streptomicino (10 µg), kanamicino (30 µg), neomicino (10 µg), tetraciklino (30 µg), eritromicino (15 µg), linkomicino (15 µg), klindomicino (2 µg), enrofloksacino (5 µg) norfloksacino (10 µg) (Oxoid, Anglija). Pagal diskų gamintojo lenteles atskirai vertinta kiekviena antimikrobinė medžiaga. Vertinimas atliktas pagal kliniškes ribines atsparumo reikšmes.

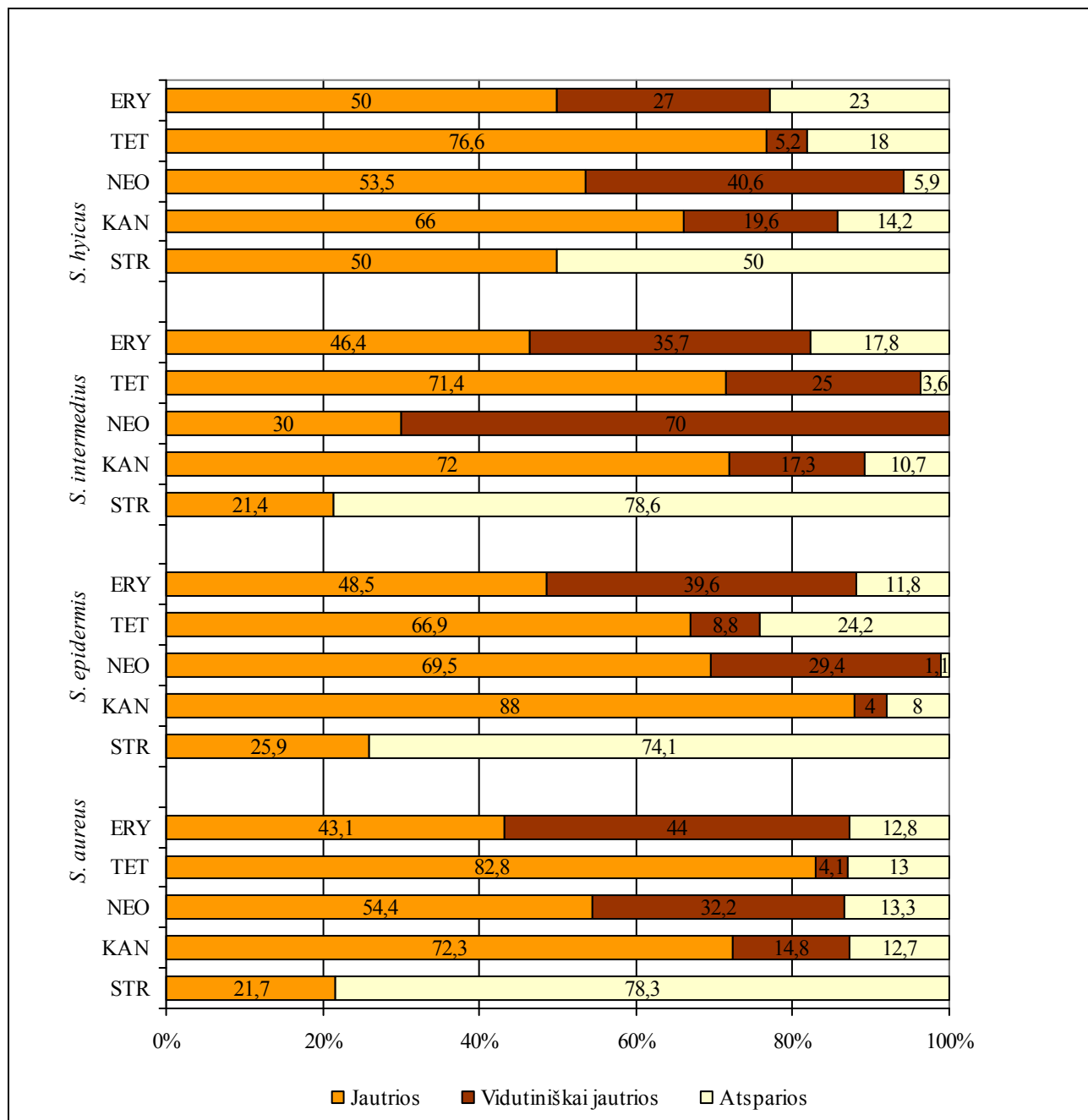
Tyrimo rezultatai ir statistiniai duomenys apskaičiuoti kompiuterine programa „Epi Info“ (1996; Centers for Disease Control and Prevention, U. S. A., Version 6.04), „Prism 3“ (GraphPad Software, Inc., U. S. A.). Apskaičiuoti gautų duomenų aritmetiniai vidurkliai (M), standartinis nuokrypis (SD), Pirono koreliacijos koeficientas (r). Skirtumo tarp grupių patikimumo kriterijui (p) nustatyti taikytas Stjudento daugybinio palyginimo metodas. Skirtumas laikytas statistiškai patikimas, jei $p < 0,05$.

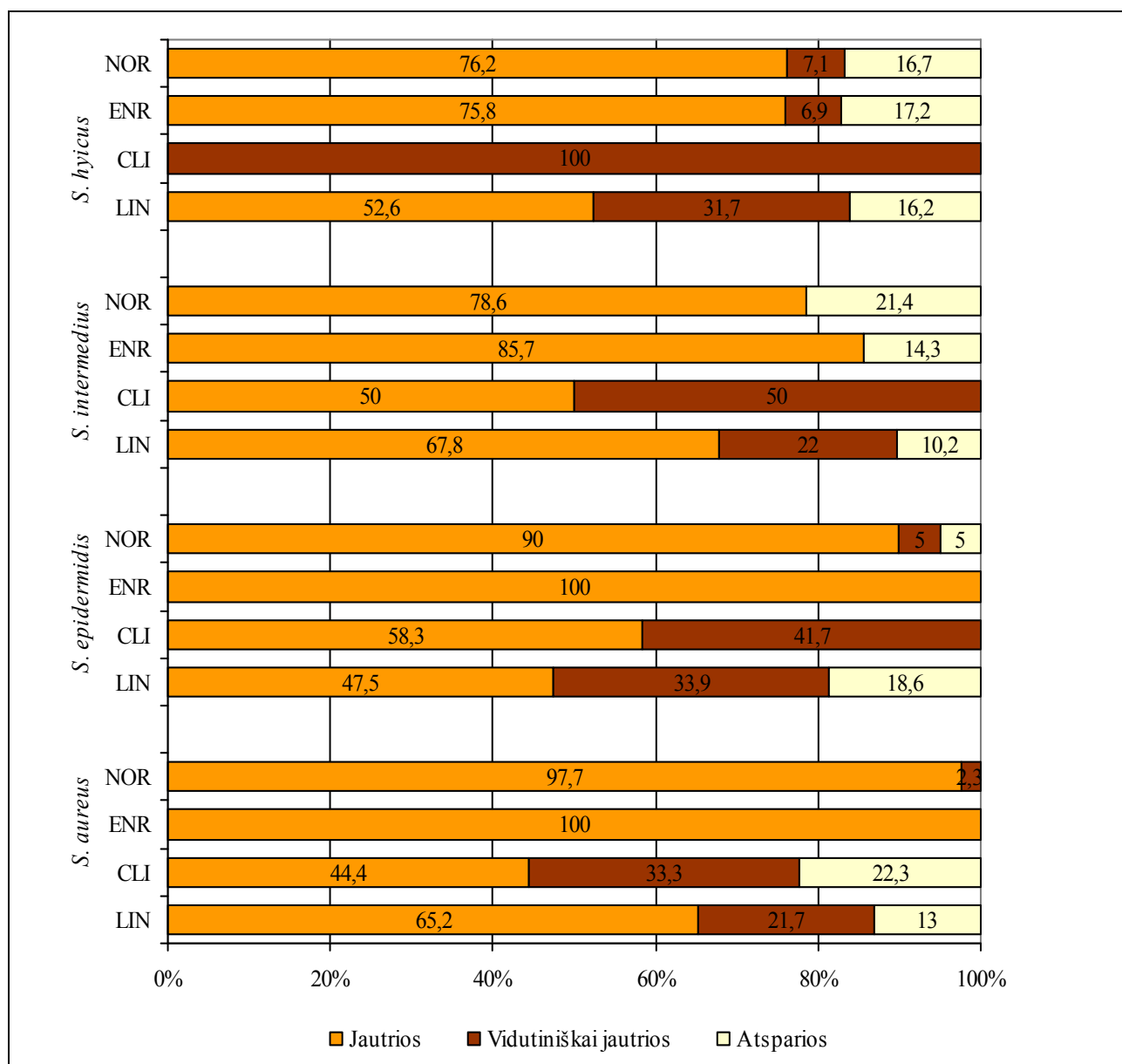
Tyrimų rezultatai. Iš karvių, sergančių mastitu, 1370 mėginių išskirta 881 gramteigiamas kokas, t. y. stafilokokų – 516, streptokokų – 196 ir enterokokų – 169. Vyravo stafilokokų genties (58,6 proc.) patogenai, todėl analizei pasirinkome šios genties mikroorganizmus. Iš karvių mastito identifikuota keturios stafilokokų rūšys. Vyravo KTS atstovai: *Staphylococcus aureus* – 34,1 proc., *Staphylococcus hyicus* – 26,4 proc., *Staphylococcus intermedius* – 5,4 proc. (1 lentelė). Vienintelis tyrimo metu identifikuotas KNS atstovas – *Staphylococcus epidermidis* – 34,1 proc. Analizuojant duomenis, patikimai mažiau ($p < 0,05$) nustatyta *S. intermedius* nei *S. epidermidis* ar *S. aureus*. Analizės metu nustatomo *S. intermedius* kiekis didėjo, o *S. hyicus* – mažėjo ($r = -0,99$).

1 lentelė. Identifikuotų stafilokokų rūšių pasiskirstymas skirtingais metais

Sukėlėjas	Tyrimo metai				
	2008	2009	2010	Iš viso	%
<i>Staphylococcus intermedius</i>	6	9	13	28*	5,4
<i>Staphylococcus hyicus</i>	73	44	19	136	26,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	91	35	50	176	34,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	65	54	57	176	34,1
Iš viso:	235	142	129	516,00	100,00

* p<0,05

1 pav. *Staphylococcus* spp. jautrumas *in vitro* aminoglikozidams, tetraciklinui, makrolidui
STR – streptomocinas, KAN – kanamicinas, NEO – neomicinas, TET – tetraciklinas, ERY – eritromocinas



2 pav. Tiriamų *Staphylococcus spp.* jautrumas *in vitro* linkozamidams ir fluorochinolonams
LIN – linkomicinas, CLI – klindamicinas, ENR – enrofloksacinai, NOR – norfloksacinai

KTS ir KNS antimikrobiniai jautrumo rezultatai pateikti 1–3 pav. *S. aureus* padermės buvo atsparios streptomycinui (78,3 proc.), klindamicinui (22,3 proc.), neomicinui (13,3 proc.), tetraciklinui (13,0 proc.) ir eritromicinui (12,8 proc.). Kitų KTS – *S. intermedius* ir *S. hyicus* – duomenys įvairavo: 78,6 proc. *S. intermedius* identifikuočių padermių buvo atsparios streptomycinui, 3,6 proc. – tetraciklinui, 14,3 proc. – enrofloksacinui, 21,4 proc. – norfloksacinui. Išskirtų *S. hyicus* 50 proc. padermių buvo atsparios streptomycinui, 18,0 proc. – tetraciklinui, 17,2 proc. – enrofloksacinui ir 16,7 proc. – norfloksacinui.

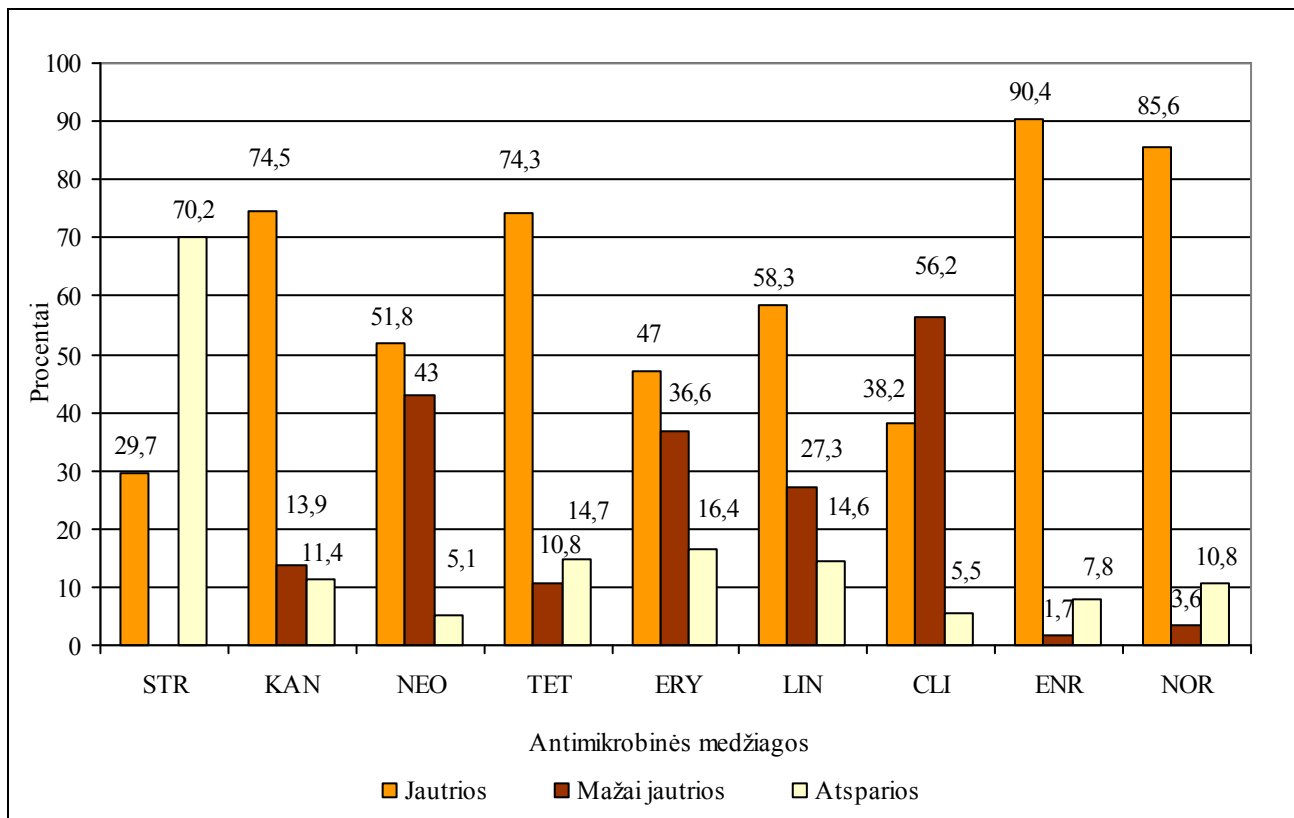
KNS atstovo *S. epidermidis* 74,1 proc. padermių buvo atsparios streptomycinui, 24,2 proc. – tetraciklinui, 18,6 proc. – linkomicinui ir 11,8 proc. – eritromicinui.

Apžvelgiant visų stafilokokų identifikuočių padermių

atsparumą aminoglikozidams, tetraciklinui ir makrolidui eritromicinui, galima konstatuoti, kad 70,25 proc. jų buvo įgiję atsparumą streptomycinui ($p < 0,05$), 11,4 proc. – kanamicinui, 14,7 proc. – tetraciklinui, 16,4 proc. – eritromicinui. 43 proc. stafilokokų buvo mažai jautrūs neomicinui, o 36,6 proc. – eritromicinui (3 pav.).

Iš mastitinio pieno išskirtų 14,6 proc. stafilokokų buvo atsparūs linkomicinui. Tik 58,3 ir 38,2 proc. išskirtų padermių buvo jautrūs tirtiems linkozamidams.

Fluorochinolonams buvo jautrūs *S. aureus* ir *S. epidermidis*, o *S. hyicus* buvo ženkliai atsparesnis fluorochinolonams (17,2–16,7 proc.). Pastarasis sukėlėjas buvo atsparus tetraciklinui (18,0 proc. padermių), eritromicinui (23 proc. padermių) ir linkomicinui (16,2 proc. padermių).



3 pav. Tiriamų *Staphylococcus* spp. jautrumas *in vitro* aminoglikozidams, tetraciklinui, makrolidui, linkozamidams ir fluorochinolonams (vidurkis)

STR – streptomicinas, KAN – kanamicinas, NEO – neomicinas, TET – tetraciklinas, ERY – eritromicinas, LIN – linkomicinas, CLI – klindamicinas, ENR – enrofloksacinas, NOR – norfloksacinas

Rezultatų aptarimas. Šio tyrimo duomenimis nustatyta, jog iš sergančių mastitu karvių pieno dažniausiai išskiriamos stafilokokų genties bakterijos – net 58,6 proc. Vyravo KTS (65,9 proc.), nors kai kurios šių atstovų rūšys (*S. intermedius*) sudarė tik labai nedidelę dalį. Šiuo metu Lietuvoje svarbiu mastito sukėlėju išlieka *S. aureus* (tyrimo metu – 34,1 proc.), ir tai patvirtina ankstesnių tyrimų duomenis. I. Klimienės ir kitų mokslininkų (2005) tyrimo duomenimis, didžiausias tešmens susirgimo mastitu etiologinis faktorius (59,7 proc.) buvo būtent *S. aureus*. Šis mastito sukėlėjas yra pagrindinis ir stabiliai nustatomas mastitu sergančių karvių piene, nes dar 1997 metais, atliktais J. Šiugždaitės tyrimais, vyravo *S. aureus* (42,6 proc. subklinikinio mastito atvejų). Ir kiti tyrėjai iš sergančių mastitu karvių Lietuvos pieno ūkiuose tarp kitų sukėlėjų dažniau nustatė *S. aureus* (Japertas, 2000; Rudejevienė, 2007).

Kitų šalių mokslininkai ištyrė, kad vyraujantis tarp mastito patogenų išlieka *S. aureus*, ir nurodė, kad ūkiuose paplitusios vyraujančios padermės yra unikalios tik tai bandai (Ericsson Unnerstad et al., 2009; Bradley et al., 2007; Tenhagen et al., 2006; Pitkälä et al., 2004). Nors Prancūzijoje tirti (Botrel et al., 2010) slaptuoju mastitu sergančių karvių pieno bandiniai dažniausiai identifikuoti buvo koaguliaziskai teigiami stafilokokai (30,2 proc.), koaguliaziskai neigiami stafilokokai (13,7 proc.) ir *S. dysgalactiae* (9,3 proc.).

Nepaisant to, kad mūsų tyrimo metu *S. aureus* buvo dažniausia mastito priežastis, duomenys rodo, jog gana dažnai mastito etiologinis faktorius yra ir kitos stafilokokų rūšys. Šie duomenys yra nauji, nes ankstesni Lietuvos mokslininkų tyrimų duomenys nerodo tokios kitų stafilokokų rūšių gausos. Taigi, probleminio, sunkiai gydomo mastito priežastimi tapo ir kiti, anksčiau tik pavieniais atvejais nustatomi stafilokokai – *S. hyicus* (26,4 proc.), *S. intermedius* (5,4 proc.) bei KNS atstovas *S. epidermidis* (34,1 proc.). Toks, nors ir ne itin ženklus, rūšių kintamumas ligos etiologijoje patvirtina būtinybę periodiškai atlikti diagnostinius tyrimus, nes žinoma rūšinė mikroorganizmų sudėtis ir jų atsparumas antimikrobiniais vaistams padeda lengviau išgydyti mastitu sergančias karves, tinkamiau parinkti vaistus.

Mes tyrimo metu analizavome tris KTS padermes. Tai nauji duomenys, kurie rodo karvių mastitą sukeliančio KTS paplitimą ir patogeniškumą, mastito sukėlėjų padermių paplitimo tendencijas. Mokslinės literatūros duomenys apie kitų KTS (be *S. aureus*) sukeliančių mastitą patogeniškumą ir epidemiologiją nėra labai gausūs. Ir kitose pienininkystę vystančiose šalyse iš karvių mastitinio pieno dažniausiai išskiriami tie patys KTS atstovai, ir rezultatai gaunami panašūs, t. y. 82,1–97,0 proc. *S. aureus*, 17,7–2,0 proc. *S. hyicus* ir 0,2–1 proc. *S. intermedius* (Roberson et al., 2006; Capurro, 2009).

Mūsų analizė rodo, kad *Staphylococcus* spp. paplitimo tyrimas ir rūšies identifikavimas yra būtini, nes ši bakterijų grupė kaip tešmens patogenas labiausiai paplitusi mūsų šalyje. Literatūros analizė rodo, jog kai kuriose pienininkystės šalyse svarbiausiu mastito etiologiniu veiksniu tampa būtent kitos stafilokokų rūšys, o ne *S. aureus*. KTS rūšims identifiukuoti mokslininkai taiko fenotipinius ir genotipinius metodus. Tačiau ekonominės sąnaudos ir tyrimo sudėtingumas lemia, kad daugumoje rutininių diagnostinių laboratorijų mastito patogenai nėra identifiukuojami rūšies lygmeniu (Bannerman, Peacock, 2007; Taponen et al., 2008).

Karvių mastito etiologiją tiriantys mokslininkai nurodo, kad dažniau karvėms pasireiškia subkliniškas mastitas, kurio priežastis yra KNS. Taip pat nurodoma, kad KNS yra ir švelnios kliniškinio mastito raiškos priežastis. Tyrėjų paskelbti duomenys įvairuoja. Suomijoje KNS buvo izoliuoti iš 50 proc., Norvegijoje – iš 14 proc., Vokietijoje – iš 35 proc., JAV – iš 24 proc. mastitinio pieno mėginių (Makovec, Ruegg, 2003; Pitkälä et al., 2004; Tenhagen et al., 2006; Pyörälä, Taponen, 2009). Pateikti skaičiai skiriasi net tik skirtingose šalyse, bet įvairuoja ir skirtinguose ūkiuose. Dar 1997 m. J. Šiugždaitė nustatė, kad 4,7 proc. subkliniškinio mastito priežastis yra KNS. Vėlesniais tyrimais parodoma, kad KNS vaidmuo mastito etiologijoje kinta gana drastiškai, nuo 2,86 proc. S. Japerto 2000 m. duomenimis iki 58,15 proc. J. Rudejevienės 2007 m. tyrimais. Tačiau mūsų šalyje atliktų tyrimų metu KNS nebuvo identifiukuoti iki rūšies. Matyt, buvo laikomasi nuomonės, kad šie stafilokokai nėra virulentiški. Be to, tyrimo rezultatai labai priklauso ir nuo identifikavimo metodų, nes KNS identifiukuoti yra sudėtinga dėl šios bakterijų grupės įvairiarūšiškumo. Mokslininkai rekomenduoja KNS rūšių genotipizavimą (Bannerman, Peacock, 2007; Sampimon et al., 2009). Šiuo metodu Suomijoje iš karvių mastito nustatyti ne tik *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. hemolyticus*, *S. xylosum*, bet ir kitos KNS rūšys (Thorberg et al., 2006). Tas dar kartą patvirtina mokslinių tyrimų būtinybę: tiriant etiologinius ligų veiksnius neapsiriboti rutininės diagnostikos metodais.

Mūsų trejų metų analizė rodo, kad KNS – *S. epidermidis* yra svarbus Lietuvos karvių mastito etiologijoje (20,4 proc. tarp visų nustatytų patogenų). Šis patogenas vyrauja (34,1 proc.) tarp kitų analizuojamų stafilokokų. Per trejus tyrimo metus mažėjo nustatomų *S. aureus*, o *S. epidermidis* kiekis išliko stabilus. Mūsų nuomone, tam įtakos turėjo vaistai sergančioms mastitu karvėms gydyti. Vaistai paruošti iš tokių vaistinių medžiagų, kurios gerai veikia *S. aureus* ir, matyt, silpnai – kitus patogenus, todėl vienos rūšies mastito sukėlėjų kaip *S. aureus* sumažėjo, o kitų rūšių – padaugėjo.

Mūsų tyrimais, Lietuvos karvių ūkiuose yra daug patogeno *S. epidermidis* (34,1 proc.). Kad šis sukėlėjas dažnas ir kitose šalyse, ištyrė S. Taponen su grupe mokslininkų 2008 metais, nes 60 proc. mastito priežastis – *S. epidermidis*. A. Capurro (2009) teigia, kad vienos bandose *S. epidermidis* persistuoja trumpai, o kitose nustatomas kaip vyraujantis patogenas. Ilgai persistudami bandoje KNS tampa patogeniškesni ir

sukelia mastitą su ryškiais klinikiniais požymiais.

Mūsų gauti stafilokokų atsparumo antibiotikams duomenys rodo sumažėjusį jautrumą aminoglikozidams (1, 3 pav.). Ypač ryškus atsparumas streptomycinui ($p < 0,05$). Daugiau kaip 78 proc. *S. aureus* ir *S. intermedius* padermių buvo atsparios šiam antibiotikui. Kanamicinui jautrių šių padermių daugiau, t. y. 74,6 proc., tuo tarpu neomicinui – 51,8 proc. E. Malinowski 2009 m. duomenimis, tik 17,2 proc. *S. aureus* padermių buvo jautrios streptomycinui, o šio lenkų tyrėjo 2008 m. tyrimais, 22,7 proc. *S. aureus* ir 13,2 proc. *Staphylococcus* spp. padermių buvo atsparios neomicinui.

Mastito sukėlėjų skirtingą jautrumą antimikrobinėms vaistinėms medžiagoms galima paaiškinti tuo, kad kai kurie vaistai, kurių sudėtyje yra streptomicino, seniai naudojami, ir jų Lietuvoje registruota keletas formų. Be to, streptomocinas yra aminoglikozidas. Šios grupės vaistai pasižymi kryžiniu atsparumu, nes atsparumo genai perduodami per plazmides ir sąlygoja kryžinį atsparumą. Vaistai, kurių sudėtyje yra kanamicino, prieš keletą metų naudoti plačiau, šiuo metu naudojami retai. Lietuvoje registruotos tik dvi intramaminės suspensijos. Kitų ir kitiems tikslams kanamicino formų nėra registruota (<http://vetlt1.vet.lt/vr/>). Veikiausiai dėl to ir išsivystė mažiau atsparių stafilokokų.

R. J. Erskine su bendradarbiais (2002), J. A. Makovec ir P. L. Ruegg (2003), M. Roesch (2006) publikacijose sutinkame gan neženklų *S. aureus*, išskirto iš karvių, sergančių mastitu, pieno, atsparumą tetraciklinui. Tyrėjai padarė išvadą, kad bakterijų atsparumo antibiotikams didėjimas – neženklus arba jo visai nėra. Tačiau kaimyninėje Lenkijoje atsparių tetraciklinui *S. aureus* (41,7–55,2 proc.) ir *Staphylococcus* spp. (29,9 proc.) padermių kiekis išaugo (Malinowski et al., 2009). Ir Kinijoje Li Jian-ping su kitais tyrėjais (2009) nustatė išaugusį atsparių (60 proc.) *S. aureus* padermių kiekį tetraciklinui. Mūsų tyrimais, 14,7 proc. padermių buvo atsparios, o *S. hyicus* (18,0 proc.), *S. epidermidis* (24,26 proc.) atsparių padermių sutinkama dažniau.

Makrolidui eritromicinui, mūsų tyrimais, apie pusę padermių buvo jautrios (43,1–48,5 proc.), o 16,4 proc. – atsparios. 2007 m. J. Rudejevienės atliktų tyrimų duomenimis, eritromicinui buvo jautrios 76 proc. KNS padermių. Lietuvoje gauti atsparumo duomenys artimesni Kinijoje ir JAV atliktų tyrimų duomenims, kur *S. aureus* ir *S. epidermidis* atsparumo makrolidams dažnis svyravo tarp 48–35 proc. (Jian-ping Li et al., 2009; Sawant et al., 2009). Tuo tarpu A. Lüthje ir S. Schwarz (2006) nurodo, kad atsparumas makrolidams Vokietijoje buvo tik 6 proc.

Mūsų tyrimais, linkomicinui ir klindomicinui jautrios buvo 65,2–44,4 proc. *S. aureus* padermių, o atsparios – 13–22,2 proc. Analogiško tyrimo E. Malinowski ir grupės mokslininkų (2009) duomenimis, atsparios yra 39,4 proc. *S. aureus* padermių. Tuo tarpu linkomicinui Vokietijoje A. Lüthje ir S. Schwarz (2006) nustatė tik 7 proc. *Staphylococcus* spp. atsparių padermių.

Mūsų tyrimų duomenimis, KTS atsparumo dažnis aminoglikozidams (34,3 proc.) ir eritromicinui (17,9 proc.) buvo didesnis nei KNS (27,7 proc., 11,8 proc.). Tetraciklinui ir linkozamidams KNS buvo atsparesni nei

KTS padermės, tačiau fluorochinolonams ženkliai atsparumo dažnis išaugęs KTS, ypač *S. hyicus* ir *S. intermedius*. Nustatėme 20,9 proc. KTS ir 17,8 proc. *S. epidermidis* (KNS) padermių, atsparių visiems tirtiems antibiotikams. Mūsų gauti stafilokokų aptariamų padermių antimikrobinio atsparumo duomenys artimi E. Malinowski (2009) duomenims kaimyninėje Lenkijoje. Galima manyti, jog abiejų šalių pienininkystės sektoriuje yra panašus antibiotikų naudojimo būdas ir pieno ūkių vadyba.

Kai kurie tyrėjai teigia, kad mastitas, sukeltas KNS, greitai įveikiamas antimikrobiniais preparatais (Deluyker et al., 2005). Mūsų duomenys to nepatvirtina, nes streptomycinui net 70,2 proc. padermių buvo atsparios, 43 proc. tirtų padermių mažai jautrios neomicinui, 36,6 proc. mažai jautrios eritromicinui ir 27,3–56,2 proc. išskirtų bakterijų mažai jautrios linkomicinui bei klindamicinui. Gauti duomenys veikiausiai rodo vis dar besivystantį atsparumą antimikrobinėms medžiagoms, nors Lietuvoje registruotuose intramaminiuose preparatuose šie antibiotikai nėra dažni (<http://vetl1.vet.lt/vr/>). Mažiausiai atsparių stafilokokų yra fluorochinolonams enrofloksacinui ir norfloksacinui. Mūsų nuomone, atsparių mikroorganizmų minėtoms vaistinėms medžiagoms mažiau yra todėl, kad atsparų geną iš vieno mikroorganizmo perduoda kitam chromosomos. Kai atsparūs genai perduodami chromosomų, beveik nesivysto kryžminis atsparumas. Be to, norfloksacinas karvėms, sergančioms mastitu, gydyti skirtuose vaistuose neregistruotas, o enrofloksacilas naudojamas retai ir dažniau, kai ligos sukėlėjai yra pasterelės bei mikoplazmos.

Kadangi antibiotikų naudojimas yra aktuali problema produkcijos gyvuliams, per maistą – ir žmonėms, antibakterinius vaistus privalu skirti jau bakteriologiškai nustačius ligos sukėlėją ir padarius antibiotikogramą. Praktikoje mikrobiologinis pasėlis nėra itin populiarus, ypač dėl jo trukmės. Lietuvoje nėra atlikta tyrimų, kurie rodytų, kiek sergančių ir gydytų antibiotikais gyvūnų buvo padaryta antibiotikograma. Subklinikinį ar švelnų klinikinį mastitą, sukeltą KNS, Skandinavijos šalyse dažnai palieka negydomą, teigiama, kad KNS pasišalina spontaniškai (Deluyker et al., 2005). Mūsų darbe aptariamieji karvių mastitą sukėlę stafilokokai, kurie buvo problemiški, t. y. sukėlė dažnai pasikartojantį, su dideliu SLS ir sunkiai gydomą mastitą. Tyrimui pristatyti virulentiški *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* ir *S. epidermidis*, kurie buvo atsparūs arba mažai jautrūs aminoglikozidams, tetraciklinui ir makrolidui.

Mūsų tyrimas rodo, kad stafilokokai yra dažniausi kokinės infekcijos atstovai karvių mastito etiologijoje. Rūšinė stafilokokų sudėtis per trejus analizės metus buvo gana stabili, tačiau didėjo *S. epidermidis* vaidmuo. Be to, šio sukėlėjo atsparumo dažnis antibiotikams yra gan didelis. Skirtingų rūšių stafilokokai buvo atsparūs skirtingoms antimikrobinėms medžiagoms, bet mažiau atsparių KNS (17,8 proc.) padermių, o daugiau KTS (20,9 proc.).

Išvados

1. Nustatyta, jog Lietuvos karvių mastito sukėlėjai dažniausiai yra *Staphylococcus* genties bakterijos – net 58,6 proc. visų diagnozuotų mastitų. Dažniausiai mastitiniame piene nustatomos stafilokokų rūšys yra *S. aureus* (34,1 proc.), *S. epidermidis* (34,1 proc.) ir *S. hyicus* (26,4 proc.).

2. KTS padermių antimikrobinis atsparumas buvo didesnis dažniau naudojamoms antimikrobinėms medžiagoms – streptomycinui (50,0–78,6 proc.), klindamicinui (22,3 proc.), neomicinui (5,9–13,3 proc.), tetraciklinui (13,0–18,0 proc.) ir eritromicinui (12,8–23 proc.).

3. KNS atstovo *S. epidermidis* 74,1 proc. padermių buvo atsparios streptomycinui, 24,2 proc. – tetraciklinui, 18,6 proc. – linkomicinui, 11,8 proc. – eritromicinui.

4. Fluorochinolonams buvo jautrūs *S. aureus*, *S. epidermidis*, o 16,9 proc. *S. hyicus* ir 17,8 proc. *S. intermedius* padermių buvo atsparios.

Literatūra

- Bannerman T. L., Peacock S. J. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other catalase-Positive Cocci* In: Murray, P.R., Jo Baron, E., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press. 2007. P. 390–411.
- Bengtsson B., Unnerstad H. E., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Ost M., Waller K. P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol.* 2009. Vol. 136 (1–2). P. 142–149.
- Botrel M. A., Haenni M., Morignat E., Sulpice P., Madec J. Y., Calavas D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010. Vol. 7 (5). P. 479–487.
- Bradley A. J., Leach K. A., Breen J. E., Green L. E., Green M. J. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *The Veterinary Record.* 2007. N. 160 (8). P. 253–257.
- Capurro A. Diagnostic and epidemiological studies of staphylococci in bovine mastitis. Doctoral diss. Department of Clinical Sciences, SLU. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae.* 2009. Vol. 5.
- Deluyker H. A., Van Oye S. N. et al. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J Dairy Sci.* 2005. N. 88. P. 604–614.
- Ericsson Unnerstad H., Lindberg A., Persson Waller K., et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agentspecific risk factors. *Vet microbiol.* 2009. Vol. 137. P. 90–97.
- Erskine R. J., Walker R. D., Bolin C. A., Bartlett P. C., White D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-

- year period. *J. Dairy Sci.* 2002. N. 85. P. 1111–1118.
9. Hawari A. D., Al-Dabbas F. Prevalence and Distribution of Mastitis Pathogens and their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Jordan. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2008. Vol. 3 (1). P. 36–39.
10. Japertas S. Karvių slaptjo mastito etiologija, gydymas ir farmakoprofilaktika // Daktaro disertacija. Kaunas, 2000. P. 93.
11. Klimienė I., Mockeliūnas R., Butrimaitė-Ambrozevičienė Č., Sakalauskiene R. Karvių mastitas. Tyrimai Lietuvoje. *Veterinarija ir zootechnika.* 2005. T. 31 (53). P. 67–76.
12. Li Jian-ping, Zhou Hai-jian, Yuan Lin, He Ting, Hu Song-hua. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China *Jurnal of Zhejiang University Science.* 2009.10 (10). P. 753–760.
13. Lüthje A., Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J antimicrob chemoth.* 2006. N. 57(5). P. 966–969.
14. Makovec J. A. & Ruegg P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci.* 2003. T. 86 (11). P. 3466–3472.
15. Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Smulski S., Kaczmarowski M. Atypical *Staphylococcus aureus* as an aetiological agent of mastitis in cows. *Bull vet inst Pulawy.* 2009. N. 53. P. 383–387.
16. Pitkälä A., Haveri M., Pyorala S., Myllys V., Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 2004. N. 87 (8). P. 2433–2441.
17. Pyörälä S., Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Vet microbiol.* 2009. Vol. 134, Issues 1–2. P. 3–8.
18. Roberson J., Mixon J., Oliver S., Rohrbach B., Holland R. Etiologic agents associated with high SCC dairy herds. 24 th World Buiatrics Congress, Nice, France, CD, OS 2006. P. 19–21.
19. Roesch M. Comparison of Antibiotic Resistance of Udder Pathogens in Dairy Cows Kept on Organic and on Conventional Farms *J. Dairy Sci.*, 2006. N. 89. P. 989–997.
20. Rudejeviene J. Karvių slaptasis mastitas. Kaunas. 2007. P. 11–45.
21. Sampimon O. C., Zadoks R. N., De Vlieghe S., Supré K. et al. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet microbiol.* 2009. N. 136. P. 300–305.
22. Sawant A. A., Gillespie B. E., Oliver S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet microbiol.* 2009. Vol. 134. P. 73–81.
23. Šiugždaitė J. Subclinical mastitis. *Veterinarija ir zootechnika.* 1997. T. 4 (26). P. 16–20.
24. Taponen S., Bjorkroth J., Pyorala S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *J. Dairy Res.* 2008. N. 75 (4). P. 422–429.
25. Tenhagen B. A., Köster G., Wallmann J., Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 2006. N. 89. P. 2542–2551.
26. Thorberg B. M., Kuhn I., Aarestrup F. M., Brändström B., Jonsson P., Danielsson-Tham M. L. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet microbiol.* 2006. N. 115. P. 163–172.
27. Lietuvos Respublikos veterinarijų vaistų registras. – [žiūrėta 2011-05-11] – Internetė: <<http://www.vetlt1.vet.lt/vr/>>
28. Weese J. S., Rousseau J., Traub-Dargatz J. L., Willey B. M., McGeer A., Low D. E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005. N. 226. P. 580–583.

Gauta 2011 02 09

Priimta publikuoti 2012 02 23