

## STRESZCZENIE

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* i bakterie z rodzaju *Enterococcus* należą do patogenów środowiskowych zapalenia gruczołu mlekowego (*mastitis*), najczęstszej i najdroższej choroby krów mlecznych. W dobrze zarządzanych stadach bydła mlecznego, w których ograniczono występowanie patogenów zakaźnych *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*, paciorkowce środowiskowe *S. uberis* stanowią obok bakterii z grupy coli przyczynę większości przypadków zapaleń klinicznych. Zapalenia te stanowią obecnie poważny problem, powodując straty ekonomiczne w produkcji mleka i wywierając negatywny wpływ na dobrostan zwierząt. Stosowanie dezynfekcji przeddojowej powoduje spadek liczby zakażeń wywołanych przez paciorkowce o około 50%, jednak profilaktyka prowadzona przeciwko tym patogenom często okazuje się nieskuteczna. Ponadto pomimo wysokiej wrażliwości paciorkowców *in vitro* na penicylinę, skuteczność terapii antybiotykowej w przypadku zapaleń wymienia z udziałem *S. uberis* jest często niezadawalająca, co wynika z faktu, że bakterie te stanowią często przyczynę przewlekłych stanów zapalnych wymienia, które w niewielkim stopniu reagują na antybiotykoterapię.

Warto podkreślić, że w Polsce nie prowadzono dotychczas badań nad charakterystyką fenotypową i genotypową terenowych izolatów *Streptococcus* spp. i *Enterococcus* spp. wywołujących stany zapalne gruczołu mlekowego u krów. Poznanie właściwości krajowych izolatów paciorkowców i enterokoków mogłoby przyczynić się do poprawienia metod profilaktyki i terapii zapaleń wywołanych przez te bakterie. W związku z tym celowe było określenie wybranych właściwości fenotypowych paciorkowców środowiskowych i enterokoków mających znaczenie w ich identyfikacji gatunkowej (rodzaj hemolizy na podłożu z krwią, zdolność do wytwarzania białka CAMP), jak również określenie wrażliwości izolatów na antybiotyki stosowane w terapii *mastitis* i preparaty przeznaczone do dezynfekcji strzyków. Celem pracy była również ocena właściwości genotypowych izolatów, takich jak obecność genów wirulencji oraz mechanizmów oporności na wybrane grupy antybiotyków (makrolidy, tetracykliny i glikopeptydy). Materiał do badań stanowiło 65 izolatów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, 107 izolatów *S. uberis* i 80 izolatów *Enterococcus* spp. wyizolowanych z klinicznych i podklinicznych przypadków zapalenia gruczołu mlekowego u krów w latach 2009-2012 w Polsce. Badanie bakteriologiczne mleka ćwiartkowego lub wydzieliny zapalnej przeprowadzono za pomocą rutynowych metod diagnostycznych. Wyosobnione z badanych próbek Gram-dodatnie, katalazoujemne izolaty identyfikowano w oparciu o ocenę typu wytwarzanej hemolizy na podłożu z krwią, ocenę wzrostu na podłożu wybiórczo-różnicującym (podłoże Edwardsa) i wybiórczym (agar z kanamycyną, eskuliną i azydkiem), wynik CAMP-testu, testu biochemicznego, testu serologicznego oraz amplifikację genów 16S-23S rRNA (*Streptococcus* spp., *S. dysgalactiae*), *hsp40* (*S. uberis*), *tuf* (*Enterococcus* spp.) i *ddl* (*E. faecalis*, *E. faecium*) za pomocą techniki PCR. Wrażliwość badanych izolatów na antybiotyki określono metodą dyfuzyjno-krażkową. W przypadku enterokoków noszących geny oporności na wankomycynę oznaczono wartości MIC wankomycyny metodą mikrorozcieńczeń w bulionie. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro* środków stosowanych do dezynfekcji strzyków przeprowadzono metodą dyfuzyjno-studzienkową. Występowanie genów wirulencji i oporności na antybiotyki w badanych izolatach określano za pomocą techniki PCR.

Przeprowadzone badania wykazały, że bakterie *S. uberis* wytwarzały hemolizę typu  $\gamma$  na podłożu agarowym z krwią. Wszystkie izolaty *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* pochodzące z kolekcji własnej charakteryzowały się hemolizą typu  $\alpha$ , podczas gdy wśród enterokoków stwierdzano występowanie obu typów hemolizy. Paciorkowce środowiskowe były wrażliwe na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe (amoksycylina, cefaleksyna, cefoperazon, cefapiryna, kloksacylina, penicylina) i bacytracynę, natomiast odporne na neomycynę i tetracyklinę. Wysoką aktywność wobec enterokoków wykazywała penicylina, amoksycylina, ampicylina i bacytracyna, podczas gdy niższą aktywność obserwowano w przypadku kloksacyliny, linkomycyny, cefaleksyny i erytromycyny. Z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów z kliniczną postacią *mastitis* wyosobniono jeden izolat *E. gallinarum* i dwa izolaty *E. casseliflavus*, które wykazywały obecność genów *vanC* i charakteryzowały się wartością MIC dla wankomycyny wynoszącą 4  $\mu\text{g/ml}$ . Występowanie wielooporności stwierdzono w przypadku 23,1% izolatów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, 33,3%

izolatów *E. faecium*, 34,6% izolatów *S. uberis* i 91,3% izolatów *E. faecalis*. W czteroletnim okresie badań zaobserwowano obniżenie wrażliwości paciorkowców środowiskowych na niektóre antybiotyki należące do grupy tetracyklin, makrolidów i  $\beta$ -laktamów. Liczba izolatów opornych fenotypowo na określony antybiotyk nie odpowiadała liczbie izolatów, w których występowały geny oporności. Obecność genu *ermB* stwierdzono w 81,8% izolatów *Streptococcus* spp. i 90,9% izolatów *Enterococcus* spp. fenotypowo opornych na erytromycynę. Ponadto w przypadku 19,2% izolatów charakteryzujących się fenotypową opornością na tetracyklinę nie wykryto obecności żadnego z testowanych genów *tet*.

Wykazano istotne różnice we wrażliwości izolatów w obrębie gatunku *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. uberis* oraz rodzaju *Enterococcus* na preparaty przeznaczone do dezynfekcji strzyków w zależności od rodzaju zastosowanego preparatu i jego stężenia. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec paciorkowców i enterokoków wykazywał nierozcieńczony preparat zawierający diglukonian chlorheksydyny (CI). Środek dezynfekcyjny zawierający kwas mlekowy (B) charakteryzował się istotnie mniejszą aktywnością w stosunku do badanych gatunków paciorkowców w porównaniu z preparatami zastosowanymi w tych samych stężeniach, które zawierały jod aktywny (A) lub diglukonian chlorheksydyny (C).

Wśród izolatów *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* stwierdzono występowanie wszystkich testowanych genów wirulencji (*mig*, *sagA*, *sdn*, *spd1*, *speC*, *speK*, *speL*, *speM*). Wszystkie bakterie należące do gatunku *S. uberis* charakteryzowały się obecnością genów *pauA* i *skc*, podczas gdy jedynie 1,9% izolatów wytwarzało białko CAMP i zawierało gen *cfu*. W przypadku izolatów *E. faecalis* stwierdzono obecność większej liczby genów wirulencji w porównaniu z izolatami *E. faecium*. Jedynym genem wirulencji wykrytym u gatunku *E. faecium* był gen *efaA<sub>fm</sub>* kodujący antygen endocarditis A. Izolaty należące do pozostałych gatunków z rodzaju *Enterococcus* nie wykazywały obecności żadnego z badanych genów wirulencji. Zaprojektowane dwie pary nowych starterów umożliwiają specyficzną amplifikację fragmentu genu *efaA* w izolatach *E. faecalis* lub *E. faecium*.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły hipotezę, że w izolatach bakterii środowiskowych z rodzaju *Streptococcus* i *Enterococcus* wyosobnionych z gruczołu mlekowego krów występują geny wirulencji oraz geny determinujące antybiotykooporność. Inna z hipotez badawczych zakładała wrażliwość *in vitro* badanych izolatów na środki stosowane do dezynfekcji strzyków. Wyniki badań własnych wskazują jednak na obniżoną wrażliwość niektórych izolatów *Streptococcus* spp. na preparaty zawierające jako substancję czynną kwas mlekowy oraz obniżoną wrażliwość enterokoków na środki zawierające jod aktywny lub kwas mlekowy.

## ABSTRACT

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Enterococcus* spp. are environmental bacteria involved in mastitis, which is the most common and the most expensive disease of dairy cattle. In well-managed dairy herds where the incidence of contagious pathogens *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* has been reduced, environmental streptococci *S. uberis* and coliform bacteria are responsible for the majority of clinical mastitis cases. Clinical mastitis poses a serious problem due to economic losses in milk production and negative effects on animal welfare. Predipping has been shown to decrease environmental mastitis infections by 50%, however, prophylaxis against these pathogens is often ineffective. In addition, despite the high *in vitro* susceptibility of streptococci to penicillin, the efficacy of antibiotic therapy in cases of mastitis caused by *S. uberis* is often unsatisfactory, because these bacteria are frequently associated with chronic mastitis that which is unresponsive to antibiotic treatment.

It is worth mentioning that no research on the phenotypic and genotypic characteristics of field isolates of *Streptococcus* spp. and *Enterococcus* spp. as mastitis pathogens have been performed in Poland. The knowledge of the properties of national streptococcal and enterococcal isolates can contribute improving the preventive and treatment methods for mastitis caused by these bacteria. Therefore, it was appropriate to determine the phenotypic characteristics, which are useful for species identification of environmental streptococci and enterococci (type of haemolysis on blood agar, CAMP-like factor), as well as to determine the susceptibility of isolates to antibiotics used in mastitis treatment and to teat disinfectants. The aim of the study was also to investigate the genotypic characteristics of the isolates such as the presence of virulence factor genes and resistance mechanisms to selected antibiotics (macrolides, tetracyclines and glycopeptides). A total of 65 *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, 107 *S. uberis* and 80 *Enterococcus* spp. isolates obtained from bovine clinical and subclinical mastitis in 2009-2012 in Poland were included in the present study. Bacteriological examination of quarter milk or inflamed secretion samples was performed using routine diagnostic methods. Gram-positive, catalase-negative isolates were identified based on the type of haemolysis on blood agar, growth on the selective and differential Edwards medium, kanamycin aesculin azide agar (a selective medium for the isolation of enterococci), CAMP test result, biochemical and serological test as well as amplifications of 16S-23S rRNA (*Streptococcus* spp., *S. dysgalactiae*), *hsp40* (*S. uberis*), *tuf* (*Enterococcus* spp.) and *ddl* (*E. faecalis*, *E. faecium*) genes using PCR. The susceptibility of the isolates to antimicrobials was determined by disk diffusion method. In case of enterococci that carried *van* genes, MICs for vancomycin were determined by broth microdilution method. *In vitro* antimicrobial activity of teat disinfectants was assessed by the agar diffusion well method. The presence of virulence and antibiotic resistance genes in the isolates was determined by PCR.

The studies have shown that *S. uberis* produced  $\gamma$ -haemolysis on blood agar. All isolates of *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* within own collection were characterized by  $\alpha$ -haemolysis, whereas enterococci were found to produce both types of hemolysis. Environmental streptococci were susceptible to  $\beta$ -lactam antibiotics (amoxicillin, cephalexin, cefoperazone, cephapirin, cloxacillin, penicillin) and bacitracin while were resistant to neomycin and tetracycline. Penicillin, amoxicillin, ampicillin and bacitracin showed high activities against enterococci, while lower activity was observed in case of cloxacillin, lincomycin, cephalexin and erythromycin. One *E. gallinarum* isolate and two *E. casseliflavus* isolates obtained from clinical mastitis harboured *vanC* genes and had MIC values of 4  $\mu\text{g/ml}$  for vancomycin.

Multidrug resistance was identified in 23.1% of *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, 33.3% of *E. faecium*, 34.6% of *S. uberis* and 91.3% of *E. faecalis* isolates. In the four-year study period, the reduced susceptibility of environmental streptococci to some tetracycline, macrolide and  $\beta$ -lactam antibiotics was observed. The number of isolates phenotypically resistant to particular antibiotic did not correspond to the number of isolates that carried resistance genes. The *ermB* gene was present in 81.8% of *Streptococcus* spp. and 90.9% of *Enterococcus* spp. phenotypically resistant to erythromycin. Furthermore, in the case of 19.2% isolates phenotypically resistant to tetracycline, none of the *tet* genes were detected.

Statistically significant differences in susceptibility to teat disinfectants within *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. uberis* and enterococcal isolates were observed depending on the type of

disinfectant and its concentration. Chlorhexidine digluconate undiluted solution showed the highest antimicrobial activity against streptococci and enterococci. Disinfectant containing lactic acid (B) was significantly less active to both streptococcal species when compared with disinfectants with active iodine (A) or chlorhexidine digluconate (C) used in the same concentrations.

All of the virulence genes tested (*mig*, *sagA*, *sdn*, *spd1*, *speC*, *speK*, *speL*, *speM*) were detected among *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolates. All *S. uberis* carried the *pauA* and *skc* genes, whereas only 1.9% of them were phenotypically CAMP positive and contained the *cfu* gene. *E. faecalis* isolates were found to have more virulence genes than *E. faecium* isolates. The *efaA<sub>fm</sub>* gene encoding endocarditis A was the only virulence gene detected in *E. faecium*. The isolates that belonged to other enterococcal species did not carry any of the virulence genes examined. Two pairs of new primers designed in the study allow for specific amplification of the *efaA* gene fragments in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates.

The results of the study confirmed the hypothesis that environmental bacteria from the genus *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from the bovine mammary gland harbour virulence and antimicrobial resistance genes. Another research hypothesis assumed the *in vitro* susceptibility of the isolates to the teat disinfectants. However, results of own studies indicate the reduced susceptibility of some streptococcal isolates to disinfectants containing lactic acid as an active ingredient and the reduced susceptibility of enterococci to disinfectants with active iodine or lactic acid.