

LÜPSILEHMADE KLIINILIST MASTIITI PÕHJUSTAVATE MIKROOBIDE ANTIBIOOTIKUMIRESISTENTSUS

B. Aasmäe, P. Kalmus, T. Tiirats

ABSTRACT. *Antimicrobial resistance of pathogens causing clinical mastitis in dairy cows. During the period from May until December 2001 altogether 862 milk samples from cows with clinical mastitis were collected from 130 different farms in Estonia. The Veterinary and Food Laboratory in Tartu performed the bacteriological investigation of samples. In vitro antimicrobial susceptibility was tested using disc diffusion method. Antibiotics used most frequently in veterinary and human medicine in Estonia were selected for susceptibility testing.*

Mastitis pathogens were found in 543 (63%) milk samples, 180 (20.9%) samples were without growth, 34 (3.9%) samples contained mixed culture. Altogether there were isolated 11 different microbial agents. Most frequently were isolated Staphylococcus aureus (169 of 543) and Streptococcus agalactiae (81 from 543). General antibiotic resistance of clinical mastitis pathogens was high to sulfamethoxazole/trimethoprim, penicillin and ampicillin. Most frequently isolated pathogen Staph. aureus showed the highest resistance against penicillin (75,1% of isolated strains) and ampicillin (66,8% of isolated strains).

Keywords: *clinical mastitis, antimicrobial resistance, dairy cows.*

Sissejuhatus

Antibiootikumid on veterinaarmeditsiinis bakteriaalsete infektsioonide tõhusate ravivahenditena laialdaselt kasutusel. Antibiootikumide manustamisega kaasneb aga paratamatult resistentse bakteripopulatsiooni väljaselekteerumine. Erinevate teadusuuringutega on tõestatud, et resistentus võib üle kanduda ühelt bakteripõlvkonnalt teisele, samuti ühelt bakteriliigilt teisele (Sunde *et al.*, 1998; Waage, 1995).

Valdkonna tähtsust arvestades on tarvis ka Eestis ulatuslikult uurida loomadelt isoleeritud mikroobide antibiootikumiresistentsust. Põhjamaadel ja mitmetes teistes Euroopa riikides on loomadelt isoleeritud mikroobide antibiootikumiresistentsuse probleemidega tegeldud juba mitmeid aastaid. Paljudes riikides on käimas antibiootikumiresistentsuse pideva monitooringu programmid, vastavalt resistentusuuringu tulemustele on välja töötatud antibiootikumide kasutamise kord ja juhendid loomaarstidele. Ülevaade mastiidipatogeenide antibiootikumiresistentsusest ja resistentuse tendentside pidev jälgimine võimaldab välja töötada antibiootikumide kasutamise põhiprintsiibid mastiitide ravimisel ning vastavad karjatervise programmid, mis lõpptulemusena parandavad piima ja piimatoodete kvaliteeti.

Käesoleva uurimistöö eesmärk oli välja selgitada lüpsilehmadel kliinilist mastiiti põhjustavate mikroobide resistentus antibiootikumide suhtes.

Võtmesõnad: kliiniline mastiit, mikroobide antibiootikumiresistentsus, lüpsilehm.

Materjal ja meetodika

Lehmade kliinilist mastiiti põhjustavate mikroobide resistentuse uurimiseks koguti 2001. aastal ajavahemikul maist kuni detsembrini 862 piimaproovi 130 eri lüpsifarmist. Lüpsifarme teenindavad loomaarstid võtsid põletiku kliiniliste tunnustega udaraveerandist piimaproovi. Proovi võtmiseks puhastati nisatipp 70% alkoholilahuses niisutatud vatitampooniga. Piimaproov (5 ml) võeti steriilsesse 10 ml plastikkatsutisse. Veterinaar- ja Toidulaboratooriumisse Tartusse saatmiseks kogutud proovid jahutati temperatuurini +4 °C või külmutati temperatuurini –20 °C.

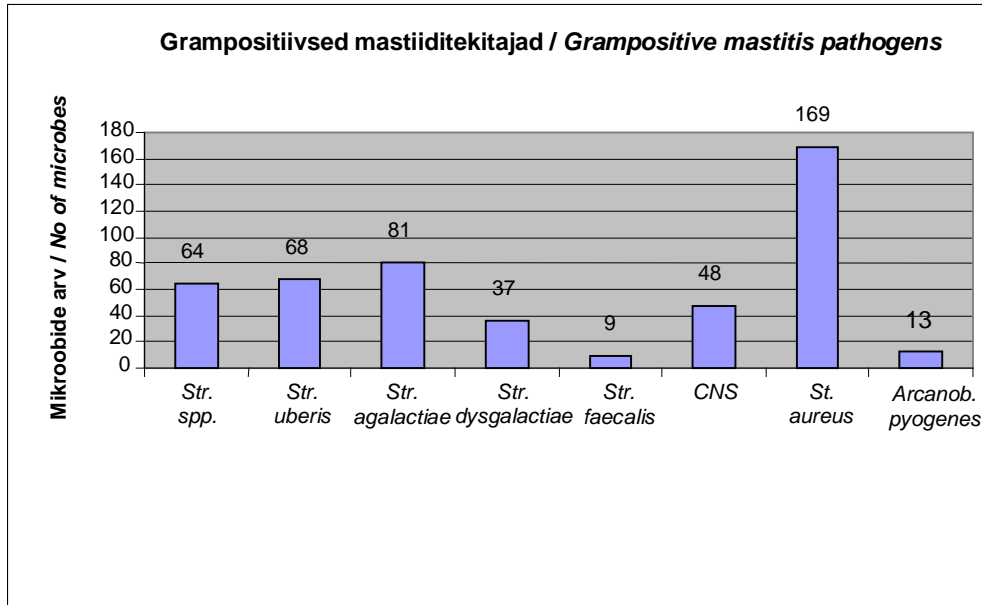
Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis tehti piimaproovide bakterioloogiline uuring ning antibiootikumitundlikkuse määramine. Antibiootikumitundlikkus määrati diskdifusiooni meetodiga (NCCLS 1990 M2-A4). Grampositiivsetel bakteritel uuriti resistentust 11 antibiootikumi suhtes: ampitsilliin, amoksitsilliin/klavulaanhape, tsefaleksiin, klindamütsiin, erütromütsiin, gentamütsiin, oksatsilliin, penitsilliin, tetratsükliin, sulfametoksasool/trimetopriim ja vankomütsiin. Gramnegatiivsetel bakteritel uuriti resistentust 10 antibiootikumi suhtes: ampitsilliin, tsefamandool, tsefoperasoon, gentamütsiin, neomütsiin, streptomütsiin, sulfametoksasool/trimetopriim. Sellise antibiootikumide valiku tingis asjaolu, et mitmeid neid toimeaineid sisaldavaid ravimeid on Eestis viimastel aastatel kasutatud nii humaan- kui ka veterinaarmeditsiinis.

Tulemused

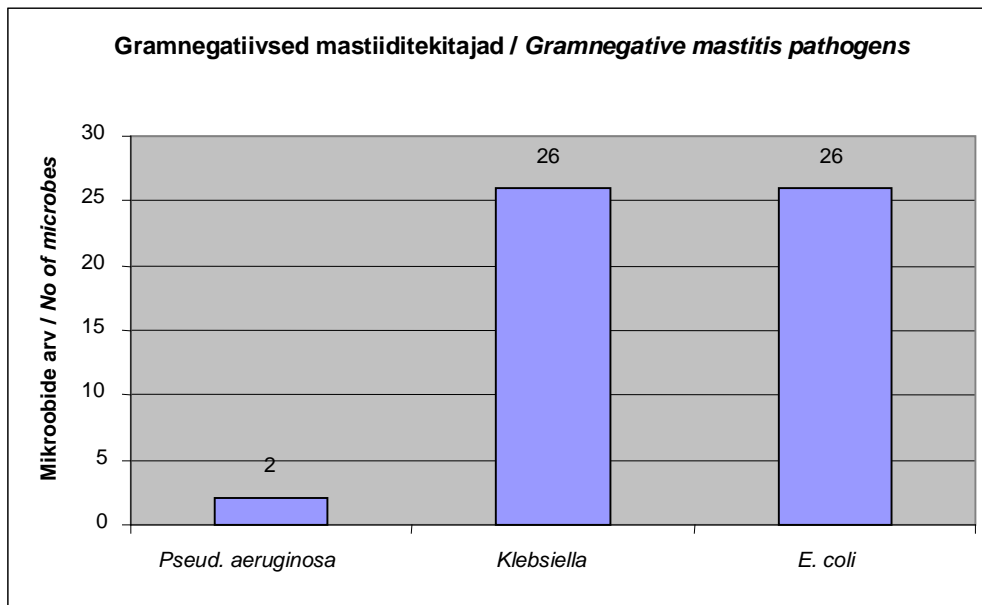
Kogutud 862 piimaproovist oli bakterioloogilise leiuga 648 (75,1%) ja bakterioloogilise leiuta 180 (20,9%). Bakterikultuuride edasisel uurimisel isoleeriti mastiiditekitajaid 543 (63%) juhtudest ja 105 proovis (12,1%) esines segamikrofloorat.

Jooniselt 1 selgub, et kokku isoleeriti 11 erinevat mastiidipatogeeni. Kõige sagedamini esines piimaproovides *Staphylococcus aureus*'t (n=169) ja *Streptococcus agalactiae*'d (n=81).

Jooniselt 2 on näha isoleeritud G-mastiidipatogeeneid. Võrdselt (n=26) isoleeriti nii *Klebsiella spp.* kui ka *E. coli* baktereid.



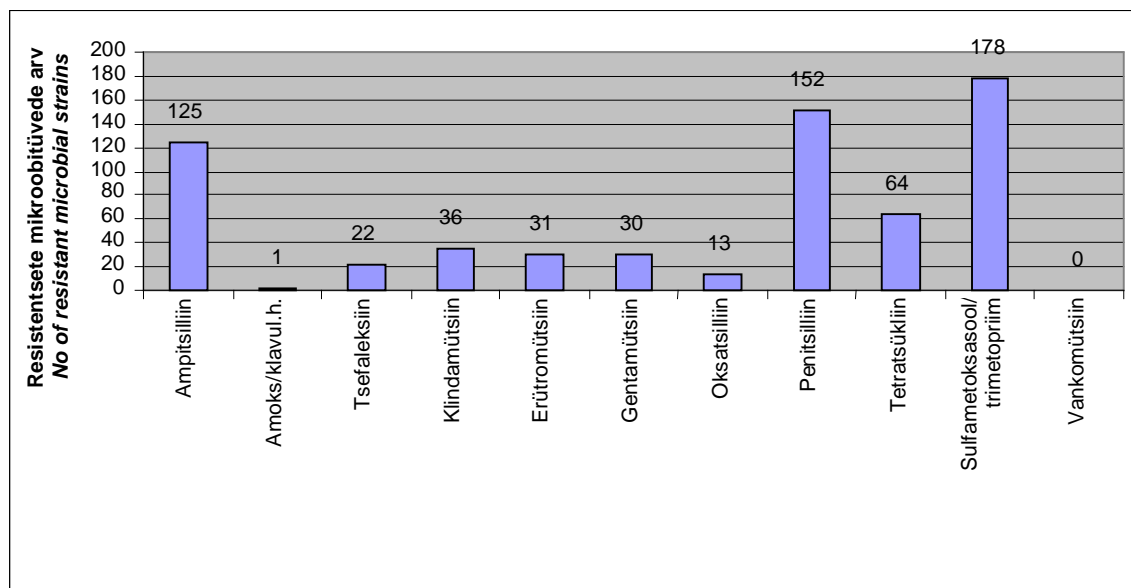
Joonis 1. Uuritud piimaproovidest (n=543) isoleeritud grampositiivsed mastiiditekitajad
Figure 1. Grampositive mastitis pathogens isolated from milk samples (n=543)



Joonis 2. Uuritud piimaproovidest (n=543) isoleeritud gramnegatiivsed mastiiditekitajad
Figure 2. Gramnegative mastitis pathogens isolated from milk samples (n=543)

Jooniselt 3 selgub mastiiditekitajate arv, mis olid resistentsed erinevate antibiootikumide suhtes. Kõige rohkem bakteriliike oli resistentsed sulfometoksasool/trimetopriimi (n=178), penitsilliini (n=152) ja ampitsilliini (n=125) suhtes. Vankomütsiini suhtes resistentseid mikroobitüvesid ei leitud.

Tabel 1 iseloomustab erinevate mastiidipatogeeneid resistentsust uurimiselaste antibiootikumide suhtes.



Joonis 3. Uuritud proovidest isoleeritud kliinilise mastiidi tekitajate üldine resistentsus
Figure 3. General resistance of mastitis pathogens isolated from milk samples

Tabel 1. Uuritud proovidest isoleeritud kliinilise mastiidi tekitajate resistentsus mikroobiliikide kaupa
Table 1. Resistance of different mastitis pathogens isolated from milk samples

Mastiiditekitajad Mastitis pathogens	<i>Staph. aureus</i>	CNS	<i>Str. uberis</i>	<i>Str. dysgal.</i>	<i>Str. agal.</i>	<i>Str. spp.</i>	<i>Str. faec.</i>	<i>A-pyog.</i>
Isoleeritud mikroobitüvede arv Number of isolated strains	169	48	68	37	81	64	9	13
Resistentsete tüvede arv Number of resistant strains								
Ampitsilliin <i>Ampicillin</i>	113	18	0	0	0	0	0	0
Amoksitsilliin/klavulaanhape <i>Amoxicillin / clavul. acid</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
Tsefaleksiin <i>Cefalexin</i>	1	1	2	1	1	8	8	0
Klindamütsiin <i>Clindamycin</i>	7	1	4	1	0	14	9	0
Erütromütsiin <i>Erythromycin</i>	16	3	7	0	0	2	3	0
Gentamütsiin <i>Gentamycin</i>	1	0	1	0	24	2	2	1
Oksatsilliin <i>Oxacillin</i>	3	1	2	2	0	8		0
Penitsilliin <i>Penicillin</i>	127	22	1	0	0	2	0	0
Tetratsükliin <i>Tetracyclin</i>	6	5	15	2	21	14	0	1
Sulfametoksasool/trimetopriim <i>Sulfamethoxazole/trimethoprim</i>	3	0	55	2	61	47	0	10

Kõikide isoleeritud kliinilise mastiidi tekitajate resistentsust üldiselt vaadeldes nähtub, et suurim resistentsus on sulfametoksasooli-trimetopriimi kombinatsiooni suhtes, samuti penitsilliini ja ampitsilliini suhtes. Suhteliselt suur resistentsus on täheldatav ka tetratsükliini suhtes. Eri mikroobiliikide resistentsust vaadeldes nähtub, et eriti suur on *Staph. aureus*'e resistentsus penitsilliini ja ampitsilliini suhtes. 127 tüve e 75,1% isoleeritud *Staph. aureus*'e mikroobidest olid resistentsed penitsilliini suhtes, 113 tüve e 66,8% ampitsilliini suhtes. *Staph. aureus*'el on resistentsus ka erütromütsiini suhtes (9,4% isoleeritud mikroobidest olid resistentsed).

Arutelu

Uurimistulemustest nähtub, et Eestis võib lüpsilehmade kliinilise mastiidi tekitajatena leida suhteliselt palju erinevaid mikroobe, enamik nendest on aga samad, mida on mastiiditekitajatena leitud ka Põhjamaadel ja teistes riikides (Myllys, 1995).

Uurimine näitab, et kliinilise mastiidi tekitajatest on Eestis esikohal *Staph. aureus*, mis 60–70% juhtudel on resistentne penitsilliini ja ampitsilliini suhtes. Selle põhjal saab järeldada, et tegemist on β -laktamaasi produtseriiva tüvega.

Peaaegu kõikidest mikroobiliikidest oli teatud hulk resistentne sulfametoksasooli-trimetopriimi kombinatsioonini ning tetratsükliini suhtes. Sulfametoksasooli-trimetopriimi resistentsuse puhul võib tegemist olla ka mõnede valepositiivsete tulemustega, mis võib olla tingitud antud toimeainete kombinatsiooni inhibitsiooni-tsooni ebaselgest piirjoonest diskdifusiooni meetodil.

Igal juhul näitab suhteliselt suur resistentsus sulfametoksasooli-trimetopriimi ja tetratsükliini suhtes, et *Staph. aureus*'el on kujunemas resistentsus laia toimespektriga antibiootikumidele. Tähelepanuväärne on ka asjaolu, et koagulaasnegatiivsetest stafülokokkidest on teatud osa resistentne penitsilliini ja ampitsilliini suhtes. Sarnast tulemust on kirjeldatud ka Põhjamaadel (Myllys, 1995; Bager *et al.*, 2001; Bengtsson *et al.*, 2001; Kruse, Simonsen, 2001).

Gramnegatiivseid kliinilise mastiidi tekitajaid isoleeriti uurimise käigus suhteliselt vähe, antibiootikumiresistentsust täheldati ainult üksikutel tüvedel, seetõttu ei ole võimalik teha üldist kokkuvõtet gramnegatiivsete mastiiditekitajate resistentsusest.

Resistentsete *Staph. aureus*'e tüvede nii suur osakaal kliinilise mastiidi tekitajana muudab mastiidiravi ülimalt problemaatiliseks. Ravi efektiivsuse seisukohast oleks kõige õigem taolise mastiiditekitajaga nakatunud lehmad karjast praakida (Waage, 1995), antud olukorras ei ole aga mõeldav, et 1/3 Eesti lüpsilehmadest praagitakse. Samas on praktiliselt võimatu selle tekitaja põhjustatud mastiiti välja ravida (Pyörälä, 1998). Efektiivselt toimib amoksitsilliin koos klavulaanhappega. Samas on see toimeainete kombinatsioon liiga laia spektriga ning selle pidev kasutamine viib nende toimeainete suhtes resistentsuse tekkimiseni (Allikmets, Nurmand, 1995). Ainsaks lahenduseks antud olukorras on *Staph. aureus*'e põhjustatud ravile mitte alluvat mastiiti põdevad lehmad siiski esimesel võimalusel karjast praakida, nende karjas olemise ajal aga püüda maksimaalselt vältida nakkuse ülekandumist teistele lehmadele (laudahügieen, lüpsijärjekord jm) (Kalmus, 2001; Österas, Sandvik, 1991).

Teiste isoleeritud kliinilise mastiidi tekitajate resistentsus ei ole praegu märkimisväärselt suur. Tuleb aga ära märkida, et kõikide isoleeritud mastiiditekitajate, v.a *Str. faecium*, hulgas leidis tetratsükliini suhtes resistentsid tüvesid. See annab alust arvata, et lähitulevikus suureneb resistentsus laia toimespektriga antibiootikumide suhtes, mis viitab mastiiditekitajate heale vastupanuvõimele ning antibiootikumiresistentsuse üldisele suurenemisele.

Mastiiditekitajate üldise suure resistentsuse põhjuseks on tõenäoliselt antibiootikumide ebaotstarbekas kasutamine mastiitide ravimisel. Kuni aastani 2000 ei eksisteerinud Eestis ühtegi veterinaarravimite valdkonda reguleerivat õigusakti. Selle ajani oli veterinaarravimeid, sealhulgas antibiootikume, võimalik loomaomanikel osta ilma veterinaararsti ettekirjutuseta. Väga suure tõenäosusega on mastiiditekitajate suure resistentsuse üheks põhjuseks mastiitide oskamatu ja asjatundmatu ravi loomaomanike endi poolt. Suure resistentsuse teiseks põhjuseks võib olla asjaolu, et Eestis on mastiitide ravimisel pikka aega kasutusel olnud mitut antibiootikumi sisaldavad komplekspreparaadid (Aasmäe, 1997). Mastiiti ei põhjusta üldjuhul mitu haigusetekitajat korraga (Sandholm *et al.*, 1996). Seega ei ole põhjendatud mitme antibiootikumi kooskasutamine mastiitide raviks. Äärmisel juhul võib korraga manustada kaht antibiootikumi, mille mikroobide vastane toime on sünergistlik, näiteks üks penitsilliin ja üks aminoglükosiid (Pyörälä, 1998).

Mastiiditekitajate antibiootikumiresistentsuse edasise suurenemise ärahoidmisel on võtmeküsimuseks antibiootikumide mõistliku kasutamise põhimõtetest lähtuv ja ainult asjatundja poolt määratud ravi. Samuti tuleb enne antibiootikumiravi alustamist võtta haigest udaraveerandist piimaroov ning laboratoorselt määrata haiguse- tekitaja. Paljudel juhtudel ei ole antibiootikumide manustamine mastiitide raviks üldse näidustatud. Ka käesolev uurimistöö näitas, et üle 20% kliinilise mastiidi korral võetud piimaproovidest ei sisalda üldse mastiiditekitajat. Antibiootikumide manustamine on taolistel juhtudel vastunäidustatud.

Põhjamaade kogemust eeskujuks võttes on ka käesoleva uurimistöö läbiviijate tulevikueesmärk töötada välja ja käivitada loomadelt isoleeritavate mikroobide antibiootikumiresistentsuse monitooringu pidev programm Eestis. Võttes aluseks käesoleva katseuuringu tulemused, on plaanis uurida loomade ja inimeste ühiste haiguse- tekitajate antibiootikumiresistentsust.

Kokkuvõte ja järeldused

Eesti lüpsikarjades on sagedamini esinevad mastiiditekitajad *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ja *Streptococcus uberis*. Kõige sagedamini isoleeritud patogeen *Staphylococcus aureus* on enamikul juhtudest resistentne penitsilliini ja ampitsilliini suhtes. Enamik isoleeritud bakteritüvedest on suuremal või

vähemal määral resistentsed ka tetratsükliini ja erütromütsiini suhtes. See viitab tõsiasi, et lähitulevikus on kliiniliste mastiitide ravimiseks suhteliselt raske leida efektiivselt toimivat mastiidiravimit. Antud olukorras on hädavajalik töötada välja ja rakendada pidev mikroobide antibiootikumiresistentsuse monitooringu programm, mis aitaks kaasa lüpsikarja tervise parandamisele ning samuti piima kvaliteedi paranemisele.

Tänuavaldused

Käesolev uurimistöö on valminud tänu Põllumajandusministeeriumi ja ETF granti nr 4120 toetusele. Artikli autorid tänavad Tartu Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi kaasabi eest töö teostamisel.

Kasutatud kirjandus

- Aasmäe, B. 1997. Antibakteriaalsed ravimid Eesti veterinaarpraktikas. – Magistriväitekiri. Eesti Põllumajandus-ülikool, Tartu. – 70 lk.
- Allikmets, L., Nurmand, L. 1995. Farmakoloogia. – Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu. – 667 lk.
- Bager, F., Emborg, H-D., Heuer, O-E. 2001. DANMAP, Danish Veterinary Institute. – 69 pp.
- Bengtsson, B., Greko, C., Wallen, C. 2001. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. National Veterinary Institute. – 50 pp.
- Kalmus, P. 2001. Udaratervise programmi rakendamine lüpsikarjas. – Magistriväitekiri. Eesti Põllumajandus-ülikool, Tartu. – 53 lk.
- Kruse, H., Simonsen, G. 2001. NORM, NORM-VET, Norwegian Zoonosis Centre. – 73 pp.
- Myllys, V. 1995. Staphylococcal mastitis in heifers and dairy cows. – Academic dissertation, Helsinki. – 52 pp.
- Pyörälä, S. 1998. Evaluation of the result of mastitis therapy. – Nordic seminar regarding future aspects of mastitis prevention. Aarhus, Denmark, p. 1–5.
- Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. 1996. Lehma udar ja udarahaigused. – Eesti Loomaarstide Ühingu Kirjastus, Tartu. – 295 lk.
- Sunde, M., Fossum, K., Solberg, A., Sorum, H. 1998. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. – Microb. Drug Resist. Winter, 4(4), p. 289–299.
- Waage, S. 1995. Lehmade mastiitide järelevalve ja vältimine Norra kogemustel. – Veterinaarmeditsiin, ELÜ kirjastus, Tartu, lk 28–42.
- Österas, O., Sandvik, L. 1991. Assessment of strategy in selective dry cow therapy for mastitis control. – Vet. Med. B. 38, p. 513–522.

Antimicrobial resistance of pathogens causing clinical mastitis in dairy cows

B. Aasmäe, P. Kalmus, T. Tiirats

Summary

Therapeutic antibiotics have been used in the treatment and control of bovine mastitis over many years. This use can lead to the selection of resistant forms of micro-organisms. The aim of this study was to investigate the antibacterial resistance of the pathogens causing clinical mastitis in the dairy cows in Estonia.

During the period from May until December 2001 altogether 862 milk samples from cows with clinical mastitis were collected from 130 different farms in Estonia. Samples were either frozen at -20°C or cooled to $+4^{\circ}\text{C}$ before transportation to the Laboratory. The Veterinary and Food Laboratory in Tartu performed the bacteriological investigation of samples. *In vitro* antimicrobial susceptibility was tested using disc diffusion method. Antibiotics used most frequently in veterinary and human medicine in Estonia were selected for susceptibility testing.

Mastitis pathogens were found in 543 (63%) milk samples, 180 (20.9%) samples were without growth, 34 (3.9%) samples contained mixed culture. Altogether there were isolated 11 different microbial agents. Most frequently were isolated *Staphylococcus aureus* (169 of 543) and *Streptococcus agalactiae* (81 from 543). *Streptococcus uberis* hold the third place (Figures 1–3).

Genereal antibiotic resistance of clinical mastitis pathogens was high to sulfamethoxazole/trimethoprim, penicillin and ampicillin. Most frequently isolated pathogen *Staph. aureus* showed the highest resistance against penicillin and ampicillin. Almost all isolated bacterial species showed developing resistance also against tetracyclin and erythromycin (Table 1).

Considering this, it might become difficult in the near future to find the most effective antibacterial drug for the treatment of clinical mastitis.

The reason of such a high resistance of mastitis pathogens found in this study is probably the result of uncontrolled distribution and use of antibiotics during recent years. Therefore it is important to work out continuing antibiotic resistance monitoring program which could be a part of herd health and milk quality improvement.