

Streszczenie:

Zapalenie wymienia u bydła mlecznego jest najczęściej diagnozowaną chorobą krów występującą na całym świecie. Ważnym czynnikiem etiologicznym tego schorzenia są bakterie z rodzaju *Streptococcus*, a poznanie mechanizmów ich zjadliwości i antybiotykooporności jest niezwykle ważne dla opracowania skutecznych programów prewencyjnych. Badania takie nie były prowadzone do tej pory na terenie północno-wschodniej Polski, dlatego też celem niniejszej pracy była analiza szczepów *Streptococcus spp.* wyizolowanych z klinicznych przypadków *mastitis* bydła mlecznego ze wspomnianego terenu, pod kątem ich inwazyjności oraz oporności wobec najczęściej stosowanych substancji czynnych, na poziomie fenotypowym i genotypowym. Badania przeprowadzono na 135 szczepach *Streptococcus* (*Streptococcus uberis* n=53, *Streptococcus dysgalactiae* n=41, *Streptococcus agalactiae* n=27, inne streptokoki n=14). Badanie antybiotykooporności wobec ośmiu substancji czynnych, stosowanych leczniczo na analizowanym przez nas terenie, a także wybranej bakteriocynty (nizyny) na poziomie fenotypowym wykonano z użyciem metody MIC. Do oceny obecności wybranych genów oporności i wirulencji oraz do serotypowania szczepów *S. agalactiae* zastosowano metodę PCR, natomiast zdolność tworzenia biofilmu przez badane izolaty określano fenotypowo na płycie 96-dołkowej. Najwyższy stopień oporności *Streptococcus spp.* stwierdzono w stosunku do gentamycyny, kanamycyny i tetracykliny, zaś największą wrażliwość wobec penicyliny, enrofloksacyny i marbofloksacyny. Wysoką skutecznością wykazała się również testowana bakteriocynta. Spośród 14 analizowanych genów oporności u badanych szczepów potwierdzono obecność 13 (nie stwierdzono jedynie obecności genu *mef(A)*). U większości szczepów występował przynajmniej jeden gen oporności, przy czym najczęściej stwierdzano geny warunkujące oporność wobec tetracyklin (*tet(M)*, *tet(K)*, *tet(L)*). Na uwagę zasługuje fakt, że nie zawsze obserwowano zależność pomiędzy obecnością genu warunkującego oporność wobec danej substancji czynnej, a opornością na poziomie fenotypowym. Większość analizowanych szczepów wykazywała zdolność do tworzenia biofilmu (ponad 70 %). Natomiast genów wirulencji poszukiwano u trzech najliczniej występujących na objętych badaniami terenie gatunków streptokoków, tj. *S. agalactiae*, *S. uberis* i *S. dysgalactiae*. W przypadku *S. agalactiae* potwierdzono obecność tylko czterech genów: *rib* (33%), *cylE* (78 %), *bca* (37 %), *cfb* (100%). Geny *pavA*, *scpB*, *bac* i *lmb* nie wystąpiły u żadnego spośród badanych szczepów. Dominującymi serotypami gatunku były Ia (n=8), II (n=8) oraz szczepy nie zakwalifikowane do żadnej grupy (n=6). U *S. uberis* na osiem wybranych genów (*sua*, *pauA*,

gapC, *cfu*, *lbp*, *hasA*, *hasB*, *hasC*) nie stwierdzono występowania tylko jednego genu (*lbp*). Natomiast w przypadku *S. dysgalactiae* analizowano tylko dwa geny *eno* i *napr*, a ich obecność potwierdzono, odpowiednio, u 76% i 86% szczepów. Uzyskane wyniki badań wykazały, iż szczepy *Streptococcus spp.* wyizolowane od bydła mlecznego z klinicznych przypadków zapalenia wymienia na terenie północno-wschodniej Polski posiadają szereg czynników inwazyjności i antybiotykooporności. Ze względu na to, iż mogą one znacząco wpływać na przebieg kliniczny choroby, powinny zostać uwzględnione przy opracowywaniu ukierunkowanych programów prewencyjnych w przypadku bakterii z rodzaju *Streptococcus spp.*

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, *Streptococcus*, *mastitis*, biofilm, wirulencja

Abstract

Mastitis of dairy cattle is a disease which occurs all over the world. An important etiological factor of this disease are bacteria from *Streptococcus* genus. Exploring the mechanisms of virulence and antibiotic resistance in these bacteria is extremely important step for the development of effective prevention programs. To the authors' knowledge, no studies monitoring this have been carried out in north-eastern region of Poland. Therefore, the objective of our study was to analyze on phenotypic and genotypic levels, the antibiotic resistance pattern of *Streptococcus spp* isolated from clinical cases of bovine mastitis. In this study 135 strains of *Streptococcus* was used (*Streptococcus uberis* n=53, *Streptococcus dysgalactiae* n=41, *Streptococcus agalactiae* n=27 and other *Streptococcus* n=14). The investigation of the antimicrobial susceptibility to chosen active substances, as well as a selected bacteriocin (nisin), was performed using the MIC method. The ability to produce biofilm by the analyzed isolates was determined phenotypically (the method of microtiter plates), while the genotypic methods (PCR) were applied to confirm the presence of virulence, antibiotic resistance genes and to perform serotyping. The highest resistance of *Streptococcus spp.* was observed toward gentamicin, kanamycin, and tetracycline, while the highest susceptibility occurred toward penicillin, enrofloxacin, and marbofloxacin. Also, the bacteriocin submitted to our studies showed high efficacy. Of the 14 analyzed resistance genes, the presence of 13 was confirmed in the tested strains (only the presence of the *mef(A)* gene was not confirmed). Most strains had at least one antibiotic resistance gene, mainly associated with resistance to tetracyclines (*tet(M)*, *tet(K)*, *tet(L)*). Interestingly a relationship between the presence of a given resistance gene and the antimicrobial susceptibility on the phenotypic level has been not always observed. Most of the isolates we analyzed demonstrated an ability to produce biofilm (over 70%). The virulence genes were searched in three streptococci most frequently present in our experiment, that is in *S. agalactiae*, *S. uberis* and *S. dysgalactiae*. In *S. agalactiae*, the presence of just four genes, *rib* (33%), *cylE* (78%), *bca* (37%), *cfb* (100%), was confirmed. The genes *scpB*, *pavA*, *lmb* and *bac* were not observed in any of the tested strains. The dominant serotypes were Ia (n=8), II (n=8) and strains not classified to any of the groups (n=6). In *S. uberis*, out of the eight selected virulence genes (*hasA*, *pauA*, *sua*, *gapC*, *cfu*, *hasC*, *lbp*, *hasB*), only one gene, *lbp*, was not found to be present. Only two genes were chosen for *S. dysgalactiae* (*eno* and *napr*). Their presence was confirmed in 76% (*eno*) and 86% (*napr*) of the tested strains. Obtained results showed that there are some worrying developments in the studied region, on both the genotypic and phenotypic level, in bacteria of the genus *Streptococcus spp.* isolated from clinical cases of *mastitis* in dairy cows. For this reason they should be taken into account

during developing targeted prevention programs against this bacteria.

Keywords: antibiotic resistance, *Streptococcus*, *mastitis*, biofilm, virulence