

OCCURRENCE OF SOME PATHOGENITY FACTORS IN COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM MASTITIS MILK IN DAIRY COWS

Milan Vasil', Juraj Elečko, František Zigo, Zuzana Farkašová

ABSTRACT

Experiment we carried out on the herd of 115 Slovak Pied dairy cows. Were realized three collections of individual milk samples for isolation and identification of coagulase-negative staphylococci (CNS). We collected 341 milk samples. Coagulase-negative staphylococci were isolated in 18.8 % (64). Highest number of CNS we isolated from acute, subclinical, subacute and latent forms of mastitis, respectively. *S. warneri* (2.88 %), *S. chromogenes* (17.19 %), *S. cohnii* (15.63 %) and *S. xylosus* (14.06 %) was isolated in highest percentage. Was detected presence of 7 virulence factors, include production of staphylococcal enterotoxins, and resistance for antibiotics. *S. chromogenes*, *S. warneri* and *S. xylosus* were detected as most virulent species carrying most virulence factors, and were resistant for most species of tested antibiotics (*S. xylosus* resistant for N, NV, L, P, E; *S. chromogenes*, *S. sciuri* for 4 species of antibiotics). These pathogens were isolated from acute forms of mastitis. This work resulted, that CNS with some virulence factors and multiple resistance, are very important in pathogenesis of mastitis in dairy cows.

Keywords: mastitis, dairy cows, coagulase negative staphylococci, virulence factors

ÚVOD

Koaguláza negatívne stafylokoky (KNS) sú považované za minoritné patogény pri mastitídach dojníc, avšak pribúdajú práce autorov, ktorí zdôrazňujú ich význam pri vzniku zápalov mliečnej žľazy (Pyörälä & Taponen, 2009; Čapla et al., 2008; Zajác et al., 2004; Zajác et al., 2008). K rozšíreniu ich výskytu v chovoch dojníc dochádza po redukcii výskytu hlavných patogénov, pričom sa uplatňujú tie KNS, ktoré sa vyznačujú zvýšenou rezistenciou voči bežne používaným antibiotikám a dezinfekčným látkam (Moniri et al., 2007). V porovnaní so *S. aureus* majú KNS spravidla nižšie zastúpenie faktorov virulencie, avšak ich podstatným faktorom patogenity je produkcia biofilmu (Otto, 2005). Melchior et al., (2006) udávajú, že nie len *S. epidermidis*, ale aj iné druhy dokážu vzdorovať uplatňovaným postupom dezinfekcie a sanitácie. Okrem toho vo svojej štúdií Nascimento et al. (2005) potvrdili u *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* a *S. aerletae*, ktoré izolovali z mastitíd kráv aj schopnosť produkovať niektoré z bakteriocínov. Haveri et al. (2008) považujú schopnosť tvoriť stafylokokové enterotoxíny za dôležitý faktor virulencie, ktorý je zodpovedný za vznik klinických mastitíd. Podľa ďalších prác k významným faktorom virulencie patrí produkcia hemolýzínov, leukocidínu, termonukleázy, hyaluronidázy a lipázy (Kuroda et al., 2007). Avšak, žiaden z faktorov alebo ich kombinácia neboli doteraz v patogenéze mastitíd jednoznačne označené ako rozhodujúce (Ebrahimi et al., 2009).

Cieľom práce bolo sledovať výskyt druhov koaguláza negatívnych stafylokokov pri jednotlivých formách mastitíd dojníc a prítomnosť ich vybraných faktorov patogenity podmienujúcich intenzitu zápalu.

MATERIÁL A METÓDY

Počas roka boli uskutočnené 3 komplexné vyšetrenia (klinické vyšetrenie vemená, vyšetrenia mlieka NK–testom a bakteriologické vyšetrenie) v stáde 115 dojníc (plemena slovenský strakatý dobytok). Z 341 individuálnych vzoriek mlieka bolo 65,6 % (229) pozitívnych. Celkom 64 (18,8 %) baktérií *Staphylococcus spp.* spôsobovalo rôzne formy mastitíd dojníc. Baktérie *Staphylococcus spp.* sme identifikovali (setom STAPHYtest 24, Pliva-Lachema, Brno, ČR), vyšetřili na prítomnosť vybraných faktorov virulencie (tvorbu hemolýzínov α , β , δ , DNA-zy, želatinázy a biofilmu) a génov kódujúcich stafylokokové enterotoxíny (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) metódou PCR. DNA bola separovaná QiAMP tissue kit-om (QIAGEN, Hilden, Germany). Pre PCR metódu boli použité referenčné kmene produkujúce typ SEA až SEE (Bergdoll; CNCTC, Brno) a komerčné oligonukleotidové primery. Kmene s potvrdeným génom sme testovali na produkciu SE *in vitro* (súpravou Ridascreen® Set A,B,C,D,E, R-Biopharm AG, Darmstadt, Nemecko). Všetky baktérie *Staphylococcus spp.* boli *in vitro* otestované na citlivosť voči 14 antibiotikám na Mueller-Hinton agare diskovou metódou (NCCLS, 2002). Koncentrácie antibiotík v diskoch: Ampicilin (10 μ g); Amoxycilin (25 μ g); Cloxacilin (5 μ g); Cefaperazone (30 μ g) Erythromycin (10 μ g); Linkomycin (15 μ g); Neomycin (10 μ g); Novobiocin (5 μ g); Penicillin (10 U); Streptomycin (10 μ g); Ampicilin/Sulbactam (10 μ g); Oxacilin (5 μ g); ; Cephalotin (30 μ g) Tetracyklin (10 μ g) (Oxoid, Anglicko). Baktérie boli následne posudzované ako rezistentné, citlivé alebo s medzihraničnou citlivosťou podľa referenčných zón uvádzaných výrobcou diskov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci troch vyšetrení stáda 115 dojníc, celkový bakteriologický nález vyšetrení 341 individuálnych vzoriek mlieka predstavoval 65,6 % (229). Koaguláza negatívne stafylokoky (KNS) mali podstatné zastúpenie 18,8 % (64). Celkové výsledky experimentu sú uvedené v tabuľke. Bolo izolovaných 12 druhov KNS, pričom ako najpočetnejšie druhy boli zaznamenané: *S. warneri* (21.88 %), *S. chromogenes* (17.19 %), *S. cohnii* (15.63 %) a *S. xylosum* (14.06 %).

Podiel jednotlivých KNS na formách mastitíd bol značne rozdielny. Najviac sa vyskytovali prípady akútnej mastitídy (29), ktorá bola spôsobená hlavne *S. cohnii* (7), *S. warneri* a *S. xylosum* (5). Subakútna bola zistená v 13 prípadoch a spôsobená v prevažnej miere *S. chromogenes* (5) a *S. warneri* (4). Pri subklinickej forme mastitídy (14) boli prevažne izolované *S. xylosum* (4) a *S. warneri* (3). Na latentných mastitídach (8) sa podieľali *S. warneri* a *S. haemolyticus* (2). Pre porovnanie našich výsledkov **Pyörälä & Taponen (2009)** uvádzajú *S. simulans* a

Table 1 Podiel koaguláza negatívnych stafylokokov (n = 64) na jednotlivých formách mastitíd dojníc a výskyt sledovaných faktorov virulencie

Izolácia KNS z mastitíd			Vybrané faktory virulencie					
druhy	status ¹	lyzíny ²	DN ³	žel. ⁴	biof ⁵	SE ⁶	seg ⁷	rezistencia ku antibiotikám ⁸
<i>S. capitis</i> (3)	AK	δ	-	-	-	-	-	OXA, NV, P
	SBAK	δ	-	-	-	-	-	NV, P
	SBKL		-	-	-	-	-	AML, NV, P
<i>S. cohnii</i> (10)	AK 7	3 δ	-	-	2	-	-	2 OXA, 6 P, 5 NV,
	SBAK	δ	-	-	1	-	-	NV, P, TE
	SBKL		-	-	-	-	-	AML, P, S
<i>S. epidermidis</i> (3)	LAT	δ	-	-	1	-	-	E, NV, P
	AK	δ	-	-	-	-	-	S
	SBKL		-	-	1	-	-	S
<i>S. haemolyticus</i> (3)	SBKL	δ	-	-	1	-	-	S
	AK	δ	-	-	1	-	-	AMP, P, S
	LAT	β+δ	-	-	1	-	-	P, S,
<i>S. hyicus</i>	LAT	-	-	-	1	-	-	N, P, S
	LAT	-	1	1	-	-	-	N, P, S,
	LAT	-	-	-	1	-	-	N, P, S,
<i>S. chromogenes</i> (11)	AK 4	-	2	3	3	-	sec	NV, 2 N, 2S, 2 P
	SBAK 5	δ	5	1	4	SEB	seb	2 S,
	SBKL 2	δ	1	1	2	-	seb	E, N, P, S
<i>S. lentus</i>	AK		-	-	1	-	-	NV, P, S
<i>S. piscifermentas</i> (3)	AK		1	-	1	-	-	AML, P
	SBAK	β+δ	-	-	1	-	-	L,
	SBKL	δ	-	-	1	-	-	L,
<i>S. sciuri</i> (2)	AK	δ	-	-	1	-	-	N, NV, P, S
	LAT		-	-	1	-	-	OXA, NV, P
<i>S. vitulinus</i> (4)	AK 2	-	-	-	1	-	-	2 NV, P, S
	SBAK	-	-	-	1	-	-	NV, S,
	LAT	-	-	-	1	-	-	NV,
<i>S. warneri</i> (14)	AK 5	4 β+δ	-	-	3	SEA	sea	P, 3 S
	SBAK 4	δ; β+δ	-	-	1	-	-	AML, P, 3 S,
	SBKL 3	2 β+δ	1	-	2	SEE	see	P, S
	LAT 2	β+δ	1	-	1	-	-	S,
<i>S. xylosum</i> (9)	AK 5	δ	-	-	5	-	-	N, 5 NV, 2 L, P, E
	SBKL 4	δ; β+δ	-	-	3	SEB; C	seb; c	2 E, 4NV, 4P, S

¹ - mastitída akútna (AK); subakútna (SBAK); subklinická (SBKL); latentná (LAT); ² - lyzíny (α;β;δ);

³ - DNAza; ⁴ - želatináza; ⁵ - biofilm; ⁶ - stafylokokový enterotoxín; ⁷ - gén pre SE;

⁸ - AMP ampicilín, AMO amoxicilín, OXA oxacilín, N neomycín, NV novobiocín, L linkomycín, P penicilín, S streptomycín, E erytromycín, TE tetracyklín

S. chromogenes ako dominantné druhy KNS pri mastitídach dojníc. KNS boli príčinou hlavne subklinických mastitíd spojených so zvýšením počtu somatických buniek v mlieku a rezistencia u nich bola zaznamenaná hlavne voči penicilínu

Čo sa týka jednotlivých faktorov virulencie, spoločná produkcia lyzínov β a δ bola zaznamenaná v 12 prípadoch, samostatný lyzín δ v 23 prípadoch. Produkcia DNAzy a želatinázy bola zistená u *S. hyicus*, *S. chromogenes* a produkcia iba DNAzy v jednom prípade u *S. piscifermentas*, pochádzajúceho z akútnej mastitídy a v 2 prípadoch *S. warneri* zo subklinickej a latentnej mastitídy. Produkcia resp. tvorba biofilmu bola zistená u 52 izolátov, pričom u *S. capitis* a *S. hyicus* nebola tvorba biofilmu detekovaná. Baktérie *S. chromogenes* mali najpočetnejšie zastúpenie faktorov virulencie: produkcia želatinázy bola zistená v 4 prípadoch, produkcia DNAzy v 8 a tvorba biofilmu v 9 prípadoch. Taktiež u *S. warneri* (7) a *S. xylosus* (8) bola zistená tvorba biofilmu vo väčšej miere v porovnaní s ostatnými izolovanými druhmi stafylokokov, rovnako aj produkcia lyzínov β a δ . **Melchior et al. (2006)** pri štúdiu kmeňov *S. aureus* izolovaných z mastitíd dojníc uvádzajú, že rezistencia voči antibiotikám bola viac frekventovaným faktorom virulencie ako tvorba biofilmu. Zvýšená produkcia biofilmu bola zjavná u kmeňov z opakovaných a chronických prípadov mastitíd. **Otto (2004)** označuje produkciu biofilmu za určujúci faktor patogenity *S. epidermidis* pri nemocničných nákazách.

Podiel KNS produkujúcich najviac faktorov virulencie na jednotlivých formách mastitíd nie je jednoznačný, najvirulentnejší kmeň *S. chromogenes* spôsobil najviac prípadov subakútnej, ďalej akútnej a subklinickej mastitídy. *S. warneri* bol izolovaný pri všetkých formách mastitídy, *S. xylosus* pri akútnych a subakútnych mastitídach.

Produkcia stafylokokových enterotoxínov (SE) resp. prítomnosť génov pre produkciu SE ako ďalšieho faktora virulencie bola zistená u 3 druhov KNS a to *S. chromogenes*, *S. warneri* a *S. xylosus*, ktoré súčasne produkovali aj ostatné vyššie spomenuté faktory. U *S. chromogenes* bola potvrdená prítomnosť génov pre produkciu SE a to *sec* a *2 seb*, pričom kmene pochádzali z rôznych foriem mastitíd. U kmeňov *S. warneri* bol potvrdený gén *sea* a *see*, resp. u *S. xylosus* *seb* a *sec*, ktoré pochádzali z akútnej a subklinickej mastitídy. Samotná produkcia SE bola zistená v jednom prípade *S. chromogenes* (SEB) zo subakútnej mastitídy; *S. warneri* v 2 prípadoch - SEA pri akútnej a SEE pri subklinickej mastitíde a rovnako v 2 prípadoch u *S. xylosus* - SEB a SEC zo subklinických mastitíd.

U všetkých izolovaných stafylokokov bola testovaná *in vitro* rezistencia voči antibiotikám, pričom len v jednom prípade *S. epidermidis* nebola zistená rezistencia ani voči jednému z testovaných antibiotík. Ďalšie 2 kmene *S. epidermidis* boli rezistentné len voči streptomycínu, rovnako 1 kmeň *S. warneri*. Rezistencia voči jednému antibiotiku bola ďalej zistená u *S. vitulinus* a to voči novobiocínu a u *S. piscifermentas* voči linkomycínu. Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná voči penicilínu (30), novobiocínu (27) a streptomycínu (21). Ako najrezistentnejšie kmene sa javia *S. xylosus*, kde kmene izolované z akútnych mastitíd boli rezistentné voči

5 antibiotikám (N, NV, L, P, E) a kmene zo subklinickej mastitídy voči 4 druhom (E, NV, P, S). Rovnako voči 4 testovaným antibiotikám boli rezistentné druhy *S. chromogenes* (Nv, N, S, P) a *S. sciuri* (N, NV, P, S), všetko kmene pochádzajúce z akútnych mastitíd.

ZÁVER

Koaguláza negatívne stafylokoky boli v našom experimente izolované v pomerne vysokom percente 18,8 %, čo predstavuje 64 kmeňov patriacich do 12 izolovaných druhov KNS. Druhy *S. chromogenes*, *S. warneri* a *S. xylosus* izolované z klinických prípadov mastitíd (akútnych, subakútnych) vykázali najvyšší stupeň patogenity, produkovali viacero faktorov virulencie (lyzíny, DNAza, želatináza, biofilm), vykázali prítomnosť génov pre produkciu SE, ale aj produkciu SE. Baktérie *Staphylococcus spp.* vykazujúce najvyšší stupeň rezistencie boli izolované z akútnych mastitíd. Môžeme konštatovať, že akútne a subakútne mastitídy spôsobujú prevažne baktérie KNS s najvyšším stupňom patogenity (t.j. produkciou viacerých faktorov virulencie) rovnako ako pri *S. aureus*.

LITERATÚRA

- ČAPLA, J., ZAJÁC, P., VACZLOVÁ, Z., GOLIAN, J. 2008. Mikrobiologická kvalita surového kravského mlieka vo výrobnej oblasti. In: *Bezpečnosť a kontrola potravín, Zborník vedeckých prác II. diel*, SPU Nitra, 2008, p. 227- 231.
- EBRAHIMI, A., AKHAVAN TAHERI, M. 2009. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord, Iran. In *Iranian Journal of Veterinary Research*, vol. 10, 2009, no. 3, p. 270-277.
- HAVERI, M., ROSLÖF, A., PYÖRÄLÄ, S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. In *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, 2007, p. 993-1000.
- KALMUS, P., AASMÄE, B., KÄRSSIN, A., ORRO, T., KASK, K. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. In *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 53, 2011, p. 4-10.
- KIRKAN, S., GOKSOY, E. O., KAYA, O. 2005. Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydin region of Turkey. In *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, vol. 29, 2005, p. 791-796.
- KURODA, M., NAGASAKI, S., ITO, R., OHTA, T. 2007. Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. In *FEMS Microbiology Letters*, vol. 273, 2007, no.1, p. 28-34.
- MELCHIOR, M. B., FINK-GREMMEIS, J., GAASTRA, W. 2006. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. In *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.*, vol. 53, 2006, no. 7, p. 326-32.
- MONIRI, R., DASTEHGOLI, K., AKRAMIAN, A. 2007. Increasing Resistant CNS in Bovine Clinical Mastitis. In *Pakistan J. Biolog. Sci.*, vol. 10, 2007, no. 15, p. 2465-2469.
- NASCIMENTO, J. S., FUGUNDES, P. C., BRITO, A. V., DOS SANTOS, K. R., BASTOS, M. C. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in

bovine mastitis. In *Veterinary Microbiology*, vol. 106, 2005, p. 61-71.

PERSSON, Y., ANN-KRISTIN J. NYMAN, A-K. J., GRÖNLUND-ANDERSSON, U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. In *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 53, 2011, 36-43.

PYÖRÄLÄ, S., TAPONEN, S. 2009: Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. In *Veterinary Microbiology*, vol. 134, 2009, no. 1-2, p. 3-8.

OTTO, M.. 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. In *Frontiers in Bioscience*, 9, January 1, 2004, p. 841-863.

ZAJÁC, P., GOLIAN, J., ČAPLA, J. 2008. Rezídua inhibičných látok v surovom kravskom mlieku v Slovenskej republike v roku 2007. In *Bezpečnosť a kontrola potravín, Zborník vedeckých prác II. diel*, SPU Nitra, 2008, p. 274-277.

ZAJÁC, P., GOLIAN, J., SOKOL, J. 2004. Výsledky vyšetrenia surového kravského mlieka na RIL v slovenskej republike a rok 2001, 2002, 2003. In: *Zborník prednášok a posterov, Hygiena alimentorum XXV*, UVL Košice 2004, p. 228-232.

Acknowledgments:

This work was supported by grant APVV-0679-10 and APVV-0629-07.

Contact address:

Doc. MVDr. Milan Vasil', CSc., Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, tel., fax : + 421 55 2982 630, E-mail: vasil@uvm.sk

MVDr. Juraj Elečko, CSc., Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia

MVDr. František Zigo, Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: zigo@uvm.sk

MVDr. Zuzana Farkašová, PhD., Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: farkasova@uvm.sk