

UNIwersYTET PRZYRODnicZY W LUBLINIE
WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ
DYSCYPLINA WETERYNARIA

Lek. wet. Przemysław Błaszczyk

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

***Charakterystyka i epidemiologia szczepów Streptococcus uberis
wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia***

***Characteristics and epidemiology of Streptococcus uberis strains isolated
from the milk of cows with mastitis***

Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Marioli Bochniarz, prof. uczelni

Zakład Mikrobiologii

Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Oświadczenie Promotora pracy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis Promotora pracy

Oświadczenie Autora pracy

Świadomy odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną na karcie pamięci wersją elektroniczną.

Data

Podpis Autora pracy

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE	9
1. WSTĘP.....	13
1.1. Etiologia i patogenezę zapalenia wymienia u krów	14
1.2. Charakterystyka drobnoustrojów z rodzaju <i>Streptococcus spp.</i>	14
1.3. <i>Streptococcus spp.</i> jako czynniki etiologiczne mastitis u krów	16
1.4 Czynniki wirulencji <i>Streptococcus uberis</i>	18
1.5. Przebieg procesu zakażenia wymienia wywołanego przez drobnoustroje chorobotwórcze	19
1.6. Udział cytokin w procesie zapalenia wymienia u krów	21
1.7. Reakcja ostrej fazy w przebiegu zakażenia wymienia u krów	24
1.8. Oporność drobnoustrojów na antybiotyki stosowane w leczeniu mastitis u krów	26
2. CEL I HIPOTEZA BADAWCZA	32
3. MATERIAŁY I METODY	33
3.1 Kwalifikacja zwierząt do badania i pobieranie materiału badawczego.....	33
3.1.1 Charakterystyka stad.....	33
3.1.2 Ocena makroskopowa mleka oraz wykonanie Terenowego Odczynu Komórkowego (TOK)	38
3.1.3 Pobieranie próbek do badań laboratoryjnych.....	38
3.1.4 Badania kliniczne krów z dodatnim wynikiem badania TOK.....	39
3.1.5 Grupa kontrolna	39
3.1.6 Transport oraz przygotowanie próbek do badań laboratoryjnych	39
3.2 Badania laboratoryjne próbek mleka	40
3.2.1 Hodowla mikrobiologiczna mleka.....	40
3.2.2 Wykrywanie katalazy.....	40
3.2.3 Wstępna identyfikacja drobnoustrojów	40
3.2.4 Posiew próbek mleka na podłoże chromogenne (chromogenic mastitis - CHROMagar™ Mastitis (Paryż, Francja))	41
3.2.5 Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych drobnoustrojów.....	42
3.3 Oznaczanie parametrów odpowiedzi immunologicznej w surowicy oraz mleku krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez <i>S. uberis</i>	43
3.3.1 Analiza stężenia amyloidu A w surowicy oraz mleku krów chorych na mastitis wywołane przez <i>S. uberis</i>	43
3.3.2 Analiza poziomu IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α w surowicy oraz mleku krów chorych na mastitis wywołane przez <i>S. uberis</i>	43
3.4. Określenie fenotypowej i genotypowej lekowrażliwości szczepów <i>S.uberis</i>	43

3.4.1 Określenie profilu fenotypowej lekowrażliwości szczepów <i>S. uberis</i>	43
3.4.2 Badania molekularne. Ustalenie genotypowych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność szczepów <i>Streptococcus uberis</i> na antybiotyki	45
3.4.2.1 Izolacja genomowego DNA bakterii oraz określenie obecności genów odpowiedzialnych za oporność szczepów <i>S. uberis</i> na antybiotyki	45
3.5 Analiza statystyczna	47
4. WYNIKI BADAŃ	48
4.1 Ocena epizootyczna występowania <i>S. uberis</i> w stadach krów mlecznych znajdujących się w województwie kujawsko-pomorskim	48
4.2 Określenie zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów <i>Streptococcus uberis</i> a sytuacją zoohigieniczną w hodowli	48
4.2.1 Analiza zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów <i>S. uberis</i> a stosowaniem antybiotyków DC (dry cow) w okresie zasuszenia w danym stadzie	48
4.2.2 Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów <i>S. uberis</i> a stosowaniem szczepień krów przeciw drobnoustrojom powodującym mastitis w danym stadzie.....	49
4.2.3 Analiza zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów <i>S. uberis</i> a stosowaniem przed- i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion krów w danym stadzie	50
4.2.4 Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów <i>S. uberis</i> a stopniem czystości krów w danym stadzie	51
4.2.5 Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów <i>S. uberis</i> a liczbą komórek somatycznych w mleku zbiorczym	52
4.3 Ocena natężenia odpowiedzi immunologicznej u krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez <i>Streptococcus uberis</i> w oparciu o określenie poziomu białka ostrej fazy: serum amyloid A oraz cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β oraz TNF- α w mleku oraz surowicy krów	53
4.3.1 Ocena stężenia amyloidu A w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez <i>S. uberis</i> i zdrowych krów	53
4.3.2 Ocena stężenia IL-1 β w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez <i>Streptococcus uberis</i> i krów zdrowych	54
4.3.3 Ocena stężenia IL-6 w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez <i>Streptococcus uberis</i> i krów zdrowych	54
4.4 Ocena stężenia IL-8 w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez <i>Streptococcus uberis</i> i krów zdrowych	55
4.4.5 Ocena stężenia IL-12 β w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez <i>Streptococcus uberis</i> i krów zdrowych	56
4.4.6 Ocena stężenia TNF α w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez <i>Streptococcus uberis</i> i krów zdrowych	57
4.5 Ocena lekowrażliwości szczepów <i>S. uberis</i> wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia	58
4.6 Genetyczne uwarunkowanie oporności szczepów <i>S. uberis</i> wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis na wybrane antybiotyki	60

5. DYSKUSJA	62
6. Wnioski	79
7. Piśmiennictwo	81

WYKAZ SKRÓTÓW

AAC (ang. *Acetyltransferases*) – acetylotransferazy

ANT (ang. *Nucleotidyltransferases*) - nukleotydylotransferazy

APH (ang. *Phosphotransferases*) – fosfotransferazy

ARGs (ang. *Antimicrobial Resistance Genes*) – geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe

ATP (ang. *Adenosine Triphosphate*) - adenozynotrifosforan

BDCT (ang. *Blanket Dry Cow Therapy*) – całkowita terapia antybiotykowa w okresie zasuszenia krowy

bMECs (ang. *Bovine Mammary Epithelial Cell Line*) – komórki nabłonka gruczołowego wymienia krowy

BOF (ang. *APP – Acute Phase Protein*) - białko ostrej fazy

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) - Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych

DC (ang. *Dry Cow*) - antybiotykowa terapia w okresie zasuszenia krowy

ECM (ang. *Extracellular Matrix*) – zewnątrzkomórkowa macierz

EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) - Europejski Komitet ds. Badania Wrażliwości na Środki Przeciwdrobnoustrojowe

GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

ICAM-1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*) - cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1

IFN- γ (ang. *Interferon γ*) – interferon γ

IL-1 α , 1 β , 6, 8, 12 β – interleukina-1 α , 1 β , 6, 8, 12 β

ITIH4 (ang. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4*) - ciężki łańcuch 4 inhibitora inter-alfa-trypsyny

LKS (ang. *SCC, Somatic Cell Count*) – liczba komórek somatycznych

LPS (ang. *Lipopolysaccharide*) - lipopolisacharyd bakteryjny

MAA (ang. *Milk Amyloid A*) – amyloid A w mleku

Mac1(*Macrophage-1 antigen*) - antygen makrofaga-1 = receptor dopełniacza-3

MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*) – spektrometria masowa, desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą

MEC (ang. *Mammary Epithelial Cells*) - komórki nabłonka gruczołu mlekowego

NADP (ang. *Nicotinamide Adenine dinucleotide*)- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NK (ang. *Natural Killer*) – komórki „naturalni zabójcy”

PAMP (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*) - wzorce molekularne związane z patogenami

PBP (ang. *Penicillin Binding Proteins*) - białka wiążące penicylinę

PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy

PMN (ang. *Polymorphonuclear Neutrophils*) - polimorfonuklearne neutrofile

PMR (ang. *Partly Mixed Ration*) – częściowo mieszana dawka żywieniowa

ROF (ang. *APR, Acute Phase Reaction*) - reakcja ostrej fazy

ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*) – reaktywne formy tlenu

SAA (ang. *Serum Amyloid A*) – surowiczy amyloid A

SDCT (ang. *Selective Dry Cow Therapy*) – selektywna terapia antybiotykowa w okresie zasuszenia krowy

SUAM (ang. *S.uberis Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezyjna *S. uberis*

TGF- α (ang. *Transforming Growth Factor alpha*) - transformujący czynnik wzrostu alfa

TLR2, TLR4 (ang. *Toll-like Receptors*) - receptory Toll-podobne

TMR (ang. *Total Mixed Ration*) - całkowicie mieszana dawka żywieniowa

TNF- α (ang. *Tumor Necrosis Factor α*) - czynnik martwicy nowotworów α

STRESZCZENIE

Zapalenie gruczołu mlekowego (*mastitis*) jest jedną z najczęściej występujących chorób krów mlecznych, której przebieg oraz nasilenie objawów klinicznych determinowanych jest przez wiele czynników związanych z rodzajem i chorobotwórczością drobnoustroju, odpowiedzią immunologiczną organizmu krowy na zakażenie, ale także działaniem czynników środowiskowych. W przeważającej ilości przypadków zakażenie wymienia wywołują bakterie, wśród których dominującą rolę obecnie odgrywa *Streptococcus uberis*.

Celem badań było opracowanie charakterystyki *S. uberis* jako czynnika etiologicznego *mastitis* u krów poprzez: ocenę epizootyczną występowania *S. uberis* w stadach krów mlecznych znajdujących się w województwie kujawsko-pomorskim, określenie zależności odsetka wyizolowanych szczepów *S. uberis*, a sytuacją zoohigieniczną w hodowli, ocenę natężenia odpowiedzi immunologicznej u krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis* w oparciu o określenie poziomu surowiczego amyloidu A i cytokin prozapalnych w mleku oraz surowicy krów, ustalenie fenotypowych profili lekowrażliwości *S. uberis* na antybiotyki najczęściej stosowane w leczeniu *mastitis* u krów oraz analizę molekularnych determinantów lekooporności szczepów *S. uberis* wywołujących zapalenie wymienia u krów. Materiał do badań stanowiły 194 próbki mleka oraz krwi pobrane od krów rasy holsztyńsko-fryzyskiej (HF) w 28 gospodarstwach zlokalizowanych w województwie kujawsko-pomorskim o łącznej obsadzie 1241 krów.

Wyniki badań własnych wskazują, iż *S. uberis* należy do istotnych czynników etiologicznych zapalenia wymienia u krów mlecznych. Szczepy *S. uberis* stanowiły 17,0% wszystkich szczepów bakterii wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia. Ponadto wykazano potencjał zakaźny tego środowiskowego patogenu. Zdolność *S. uberis* do aktywacji układu immunologicznego wymienia została potwierdzona poprzez znaczący wzrost poziomu wszystkich badanych, ściśle ze sobą powiązanych czynnościowo cytokin oraz amyloidu A w mleku krów chorych na *mastitis* w porównaniu do mleka krów zdrowych. W badaniach własnych stwierdzono 9-krotny wzrost stężenia MAA, 3,5-krotny dla IL-1 β ; 3,7-krotny dla IL-6; 2-krotny dla IL-8; 3,8-krotny dla IL-12 β oraz 4,2-krotny dla TNF- α w mleku krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis* w porównaniu do mleka krów zdrowych.

Ocena lekowrażliwości szczepów *S. uberis* pozwoliła wyodrębnić 21 różnych profili. Najczęściej powtarzającym się wzorem była jednoczesna oporność na tetracyklinę, erytromycynę i linkomycynę. Wielolekooporność została stwierdzona u 33,3% szczepów *S. uberis*. 20,0% szczepów *S. uberis* było wrażliwych lub średniowrażliwych na wszystkie antybiotyki. Największą aktywność *in vitro* wykazały cefoperazon, cefquinom, cefaleksyna, penicylina oraz ceftiofur (odpowiednio: 100%, 100%, 93,3%, 90,0%, 86,7% wrażliwych/średniowrażliwych szczepów *S. uberis*).

Badania molekularne potwierdziły obecność 36 genów determinujących oporność na różne grupy antybiotyków. Występowanie co najmniej jednego genu oporności stwierdzono u 66,7% szczepów *S.uberis*. Największy odsetek stanowiły geny *tet* odpowiedzialne za oporność na tetracykliny: 12 genów *tetL*, 10 genów *tetM* oraz 3 geny *tetO*. W dalszej kolejności stwierdzono obecność genów kodujących oporność na: makrolidy - 4 geny *ermB*, linkozamidy – 4 geny *linB*, antybiotyki β -laktamowe – 2 geny *blaZ* oraz aminoglikozydy – 1 gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.

Potrzeba ograniczenia terapii opartej na stosowaniu antybiotyków wiąże się z koniecznością podejmowania działań profilaktycznych. Badania własne wykazały, że

jednym z najbardziej efektywnych sposobów eliminacji zakażeń *S. uberis* jest utrzymanie czystości krów, ale także całego środowiska, w którym te zwierzęta przebywają. Im wyższy poziom higieny skóry wymienia tym mniejsza ekspozycja na zakażenie drobnoustrojami środowiskowymi. W badaniach własnych w stadach o wysokim stopniu czystości krów (I i II) częstotliwość izolacji szczepów *S. uberis* z mleka krów chorych na *mastitis* była zdecydowanie niższa w porównaniu do stad z III i IV stopniem czystości.

Wyniki badań własnych wykazały natomiast, że efekt stosowania pre- i postdippingu w przypadku patogenów środowiskowych takich jak *S. uberis* może nie być zadawalający. Odsetek krów, od których wyizolowano szczepy *S. uberis* był większy w stadach, w których stosowano preparaty postdippingowe lub łącznie pre- i postdippingowe w porównaniu do całkowitego braku przed i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion. To zjawisko prawdopodobnie może być spowodowane możliwością przenoszenia patogenów środowiskowych stale obecnych na skórze strzyków i w kanale strzykowym, szczególnie w przypadku zanurzania strzyków wymion kolejnych krów w tym samym pojemniku zawierającym środek dezynfekcyjny.

Czynności prewencyjne skoncentrowane powinny być nie tylko na procedurach odpowiedniej higieny pozyskiwania mleka ale także wprowadzaniu terapii DC i stosowaniu szczepień skierowanych przeciw bakteriom powodującym *mastitis*. Aplikowanie wybranym krowom antybiotyków długodziałających w okresie zasuszenia, czyli fizjologicznego wyłączenia krowy z produkcji mleka, pozwala ograniczyć stosowanie leków przeciwdrobnoustrojowych w czasie laktacji oraz pozostaje bez wpływu na dobrostan zwierząt i ekonomię gospodarstwa. Ze stad, w których wprowadzono terapię SDCT wyizolowano blisko 6-krotnie mniej szczepów *S. uberis* w przeliczeniu na jedną krowę w porównaniu do stad nie stosujących tej formy terapii *mastitis*. Badania własne potwierdziły także skuteczność stosowania szczepionek skierowanych przeciw *S. uberis*. Odsetek szczepów *S. uberis* w przeliczeniu na 1 krowę był zdecydowanie niższy w stadach szczepionych w porównaniu do stad nieszczepionych (1/49,4 vs 1/33,3). Należy przy tym podkreślić szczególnie znaczący pozytywny efekt stosowania szczepionki celowanej przeciw *S. uberis* (Ubac).

Słowa kluczowe: krowy, zapalenie wymienia, *Streptococcus uberis*, epidemiologia, immunologia, lekooporność

SUMMARY

Mastitis is one of the most common diseases in dairy cows, the course and severity of clinical symptoms of which is determined by many factors related to the type and pathogenicity of the microorganism, the cow's immune response to infection, but also environmental factors. In the majority of cases, udder infections are caused by bacteria, among which *Streptococcus uberis* currently plays a dominant role.

The aim of the study was to develop the characteristics of *S.uberis* as an etiological factor of *mastitis* in cows by: assessing the epizootic occurrence of *S. uberis* in dairy herds located in the Kujawsko-Pomorskie Province, determining the relationship between the percentage of isolated *S. uberis* strains and the zoohygienic situation in breeding, assessing the intensity of the immune response in cows with *mastitis* caused by *S. uberis* based on the determination of serum amyloid A and pro-inflammatory cytokine levels in milk and serum of cows, establishing phenotypic drug sensitivity profiles of *S. uberis* to antibiotics most commonly used in the treatment of *mastitis* in cows, and analysis of molecular determinants of drug resistance in *S. uberis* strains causing *mastitis* in cows. The research material consisted of 194 milk and blood samples collected from Holstein-Friesian (HF) cows on 28 farms located in the Kujawsko-Pomorskie Province with a total herd size of 1,241 cows.

The results of our own research indicate that *S. uberis* is one of the major causative agents of *mastitis* in dairy cows. *S. uberis* strains accounted for 17.0% of all bacterial strains isolated from the milk of cows with *mastitis*. In addition, the infectious potential of this environmental pathogen has been demonstrated. The ability of *S. uberis* to activate the immune system of the udder has been confirmed by a significant increase in the levels of all tested, functionally closely related cytokines and amyloid A in the milk of cows with *mastitis* compared to the milk of healthy cows. In our own studies, we found a 9-fold increase in MAA concentration, a 3.5-fold increase in IL-1 β , a 3.7-fold increase in IL-6, a 2-fold increase in IL-8, a 3.8-fold increase in IL-12 β , and a 4.2-fold increase in TNF- α in the milk of cows with *S. uberis*-induced *mastitis* compared to healthy cows.

The assessment of drug sensitivity of *S. uberis* strains allowed for the identification of 21 different profiles. The most common pattern was simultaneous resistance to tetracycline, erythromycin and lincomycin. Multidrug resistance was found in 33.3% of *S. uberis* strains. 20.0% of *S. uberis* strains were sensitive or moderately sensitive to all antibiotics. Cefoperazone, cefquinome, cephalexin, penicillin and ceftiofur showed the highest *in vitro* activity (100%, 100%, 93.3%, 90.0% and 86.7% of susceptible/moderately susceptible *S. uberis* strains, respectively).

Molecular studies confirmed the presence of 36 genes determining resistance to various groups of antibiotics. The presence of at least one resistance gene was found in 66.7% of *S. uberis* strains. The highest percentage was accounted for by tet genes responsible for resistance to tetracyclines: 12 *tetL* genes, 10 *tetM* genes and 3 *tetO* genes. Furthermore, the presence of genes encoding resistance to macrolides (4 *ermB* genes), lincosamides (4 *linB* genes), β -lactam antibiotics (2 *blaZ* genes) and aminoglycosides (1 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene) was confirmed.

The need to limit antibiotic-based therapy necessitates preventive measures. Our own research has shown that one of the most effective ways to eliminate *S. uberis* infections is to maintain the cleanliness of cows, but also of the entire environment in which these animals live. The higher the level of udder skin hygiene, the lower the exposure to environmental microbial infection. In our own research, in herds with a high level of cow cleanliness (I and II), the frequency of isolation of *S. uberis* strains from the

milk of cows with mastitis was significantly lower compared to herds with a cleanliness level of III and IV.

However, our own research results have shown that the effect of pre- and post-dipping in the case of environmental pathogens such as *S. uberis* may not be satisfactory. The percentage of cows from which *S. uberis* strains were isolated was higher in herds where post-dipping preparations or a combination of pre- and post-dipping preparations were used compared to herds where there was no pre- or post-milking teat disinfection. This phenomenon is likely to be caused by the possibility of transmission of environmental pathogens constantly present on the skin of the teats and in the teat canal, especially when the teats of successive cows are dipped in the same container containing the disinfectant.

Preventive measures should focus not only on proper milk collection hygiene procedures, but also on the introduction of DC therapy and the use of vaccinations against bacteria that cause *mastitis*. The application of long-acting antibiotics to selected cows during the dry period, i.e. the physiological exclusion of cows from milk production, reduces the use of antimicrobial drugs during lactation and has no impact on animal welfare or farm economics. In herds where SDCT therapy was introduced, nearly 6 times fewer *S. uberis* strains were isolated per cow compared to herds not using this form of mastitis therapy. Our own research has also confirmed the effectiveness of vaccines targeting *S. uberis*. The percentage of *S. uberis* strains per cow was significantly lower in vaccinated herds compared to unvaccinated herds (1/49.4 vs 1/33.3). The particularly significant positive effect of the use of a vaccine targeting *S. uberis* (Ubac) should be emphasised.

Key words: cows, mastitis, *Streptococcus uberis*, epidemiology, immunology, drug resistance

1. WSTĘP

Produkcja mleka przynosi wiele korzyści dostarczając produkty zawierające cenne składniki, w tym pełnowartościowe białko, co jest niezmiernie istotne ze względu na rosnące zapotrzebowanie stale zwiększającej się populacji ludzi (zgodnie z prognozami ONZ w 2025 roku wzrośnie do 9,6 mld). Poza niepodważalnymi korzyściami pozyskiwanie mleka od krów przynosi także zagrożenia dla człowieka m.in. stwarza możliwość transmisji chorobotwórczych drobnoustrojów (Davoodi i wsp., 2016; Galal Abdel Hameed i wsp., 2006; Shaheen i wsp., 2016).

Zapalenie gruczołu mlekowego (*mastitis*) jest jedną z najczęściej występujących chorób krów mlecznych (Cobirka i wsp., 2020; Martin i wsp., 2018; Morales-Ubaldo i wsp., 2023; Tomazi i wsp., 2019; Tommasoni i wsp., 2023). Właściciele zwierząt ponoszą ogromne straty finansowe z powodu spadku wydajności mlecznej, wysokich kosztów diagnostyki i terapii zakażenia wymienia, a w niektórych przypadkach także konieczności eliminacji chorych krów ze stada (Cobirka i wsp., 2020; Halasa i wsp., 2007; Harjanti i Sambodho, 2020; Hogeveen i wsp., 2011; Kibebew, 2017; Tommasoni i wsp., 2023). Zła jakość mleka pozyskiwanego od chorych krów sprawia, że staje się nieprzydatne zarówno do bezpośredniego spożycia przez ludzi jak i do przetwórstwa, ponieważ zaburza procesy technologiczne (Morales-Ubaldo i wsp., 2023; Puerto i wsp., 2021; Seegers i wsp., 2003). Drugim niezmiernie ważnym aspektem jest dobrostan krów (Leslie i Petersson-Wolfe, 2012). Zarówno właściciele zwierząt jak i lekarze weterynarii uznają ciężką postać zapalenia wymienia za jedną z najboleśniejszych chorób (Medrano-Galarza i wsp., 2012; Siivonen i wsp., 2011). Międzynarodowe Stowarzyszenie ds. Badania Bólu określa ból jako "nieprzyjemne doświadczenie zmysłowe i emocjonalne związane z rzeczywistym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanki" (<https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>). Należy podkreślić, iż szlaki nerwowe odczuwania bólu u ludzi i zwierząt wykazują znaczne podobieństwo. Jednakże ze względu na brak możliwości zakomunikowania przez zwierzę dyskomfortu, oszacowanie poziomu natężenia cierpienia jest możliwe jedynie na podstawie oceny zmian behawioralnych, takich jak apatia, brak apetytu, zmiana postawy ciała, płytki i szybki oddech, przyspieszone tętno, spadek produkcji mleka oraz określenia poziomu markerów reakcji na stres (np. kortyzolu we krwi) (Medrano-Galarza i wsp., 2012; Siivonen i wsp., 2011). Codzienna obserwacja zwierząt przez doświadczonych hodowców potwierdza, że zapalenie wymienia jest chorobą wywołującą ból o bardzo silnym natężeniu. Próba

zachowania dobrostanu krów wiąże się zatem z koniecznością przeciwdziałania zakażeniu wymienia w celu zminimalizowania liczby przypadków mastitis w stadzie (Leslie i Petersson-Wolfe, 2012).

1.1. Etiologia i patogenezę zapalenia wymienia u krów

Mastitis jest chorobą złożoną, której przebieg oraz nasilenie objawów klinicznych determinowanych jest przez wiele czynników związanych z rodzajem i chorobotwórczością drobnoustroju, odpowiedzią immunologiczną organizmu krowy na zakażenie, ale także działaniem czynników środowiskowych (Zigo i wsp., 2021; Tommasoni i wsp., 2023). Może przebiegać w formie klinicznej lub podklinicznej (Cobirka i wsp., 2020). Kliniczna postać *mastitis* w zależności od występujących objawów przybiera charakter łagodny (obserwuje się jedynie zmiany makroskopowe w mleku), umiarkowany (stwierdzane są dodatkowo objawy w obrębie wymienia w postaci zaczerwienienia, obrzęku i bolesności) lub ciężki (dołączają objawy ogólnoustrojowe) (Gruet i wsp., 2001; Tommasoni i wsp., 2023). Ważnym narzędziem diagnostycznym zapalenia wymienia jest liczba komórek somatycznych (LKS). Wartość 200 000 komórek somatycznych w 1 ml mleka przyjęto za próg dzielący chorego i zdrowego gruczoł mlekowy u krowy (Schukken i wsp., 2003). Podkliniczną formę zapalenia ze względu na brak zmian makroskopowych w mleku oraz widocznych objawów klinicznych rozpoznaje się na podstawie LKS o wartości przekraczającej 200 000/ml mleka oraz izolacji drobnoustrojów w badaniu bakteriologicznym mleka (Cheng i Han, 2020; Gruet i wsp., 2001; Huijps i wsp., 2008; Malinowski i wsp., 2011; Ruegg, 2012; Tommasoni i wsp., 2023).

Czynnikami etiologicznymi *mastitis* mogą być bakterie, wirusy, grzyby a nawet algi, łącznie ponad 150 gatunków drobnoustrojów (Abdi i wsp., 2021; De Visscher i wsp., 2016; Lassa i wsp., 2013; Shaheen i wsp., 2016; Tommasoni i wsp., 2023). Należy jednak zaznaczyć, że w przeważającej ilości przypadków zakażenie wymienia wywołują bakterie (ponad 90%) wśród których dominującą rolę obecnie odgrywają paciorkowce (Kabelitz i wsp. 2021; Keefe, 2012; Krömker i wsp., 2014).

1.2. Charakterystyka drobnoustrojów z rodzaju *Streptococcus* spp.

Streptococcus spp. to wykazująca ogromne zróżnicowanie grupa Gram-dodatnich, katalazo-ujemnych bakterii, których komórki w preparacie mikroskopowym

mają kulisty kształt (0,5-1 μm średnicy) i zwykle tworzą pary lub łańcuchy (Fortin i wsp., 2003; Odierno i wsp., 2006; Patterson, 1996). Należą do mikroorganizmów fakultatywnie beztlenowych charakteryzujących się dużymi wymaganiami wzrostowymi. Do hodowli *Streptococcus* spp. wykorzystywane są wzbogacone podłoża zawierające m.in. wyciąg sercowo-mózgowy z dodatkiem krwi lub surowicy. Wzrost tych bakterii na podłożu stałym widoczny jest po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C w postaci bardzo drobnych szaro-niebieskich przejrzystych okrągłych kolonii, zaś na podłożu płynnym w postaci zmętnienia (Szewczyk i wsp., 2020).

Systematyka rodzaju *Streptococcus* spp. była wielokrotnie modyfikowana. Obecnie funkcjonują różne formy kategoryzacji tej grupy drobnoustrojów. Jedną z nich uwzględnia obecność na powierzchni wielocukru określonego mianem antygenu Lancefield (Lancefield, 1933) zbudowanego z ramnozy, N-acetyloglukozaminy i galaktozy (Obszańska i wsp., 2014). Najważniejszą rolę w wywoływaniu chorób ludzi i zwierząt odgrywają paciorkowce należące wg klasyfikacji Lancefielda do grupy A (GAS, głównie *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*)), grupy B (GBS, głównie *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*)) oraz grup C i G (GCS/GGS). Grupy GCS/GGS obejmują gatunki rozpoznawane głównie jako patogeny u zwierząt, ale w coraz większym stopniu stają się niebezpieczne dla ludzi (Facklam, 2002). Klasyfikacja taksonomiczna grup C i G jest skomplikowana i niejednoznaczna ze względu na znaczną różnorodność fenotypową i genotypową paciorkowców. Analiza porównawcza 16sRNA umożliwiła podział GCS/GGS na dwie grupy filogenetyczne: „pyogenic” i „anginosus” („milleri”) (Köhler, 2007). Do patogenów grupy ropotwórczej (pyogenic) należą: 1) ***Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) subsp. *dysgalactiae*** - wywołuje *mastitis* u krów; 2) ***S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*** - najczęściej izolowany gatunek GCS od ludzi, wywołujący zapalenie węzłów chłonnych, gardła, płuc, kłębuszkowe zapalenie nerek, zapalenie stawów oraz zespół paciorkowcowego wstrząsu toksycznego (STSS - *Streptococcal Toxic Shock Syndrome*) i posocznicę; 3) ***Streptococcus equi* (*S. equi*) subsp. *equi*** - kolonizuje błony śluzowe górnych dróg oddechowych koni i wywołuje żółzy; 4) ***S. equi* subsp. *zooepidemicus*** - oportunistyczny komensal błon śluzowych u zwierząt, chorobotwórczy także wobec człowieka; 5) ***Streptococcus canis* (*S. canis*)** - izolowany od psów, lisów, kotów i zwierząt gospodarskich, ale także szczurów i myszy, czynnik etiologiczny zakażeń układu moczowego, gruczołu mlekowego, skóry; u ludzi zakażenia *S. canis* są rzadko spotykane, ale mają ciężki przebieg i mogą prowadzić do posocznicy; 6) ***Streptococcus uberis* (*S. uberis*)** - wywołuje *mastitis* u krów;

7) ***Streptococcus phocae*** (*S. phocae*) - wywołuje zakażenia u ryb i morskich ssaków (Obszańska i wsp., 2014). Paciorkowce GCS/GGS stanowią część naturalnej mikrobioty skóry, górnych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego, czy układu moczowo-płciowego zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Natomiast w sprzyjających dla siebie warunkach m.in. przy obniżonej odporności organizmu gospodarza są zdolne do wywoływania chorób (Obszańska i wsp., 2014). Drugim niezwykle ważnym kryterium klasyfikacji *Streptococcus* spp. jest zdolność tych patogenów do wywoływania hemolizy: β (całkowitej), α (częściowej) lub γ (brak widocznej hemolizy) (Obszańska i wsp., 2014).

1.3. *Streptococcus* spp. jako czynniki etiologiczne mastitis u krów

Z danych dostępnych w literaturze oraz badań własnych wynika, że spośród bakterii z rodzaju *Streptococcus* spp. najczęściej izolowanymi gatunkami z mleka krów chorych na *mastitis* są: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* oraz *S. uberis* (Kabelitz i wsp., 2021; Keefe, 2012; Krömker i wsp., 2014; Ruegg, 2012). *S. agalactiae* oraz *S. dysgalactiae* należą do grupy zakaźnych patogenów wymienia ze względu na ich wybitne zdolności adaptacji w jego wnętrzu, natomiast w środowisku przeżywają tylko krótki okres czasu (Kabelitz i wsp., 2021; Torres i wsp., 2023). Transmisja zakażenia odbywa się najczęściej poprzez kubki udojowe. *Mastitis* powodowane przez *S. agalactiae* oraz *S. dysgalactiae* może występować u dużego odsetka krów szczególnie w stadach prowadzonych bez odpowiednich procedur dotyczących higieny pozyskiwania mleka (Carvalho-Castro i wsp., 2017; Ruegg, 2012). W grupie tych patogenów zdecydowanie bardziej niebezpieczny dla wymienia krowy jest *S. agalactiae*, który wnika w nabłonek pęcherzyków mlekowych powodując ich obrzęk, a następnie stopniowe zamykanie przewodów odprowadzających mleko do zatoki mlekowej. Ze względu na utrudnioną dostępność tych miejsc dla antybiotyków dochodzi do zwłóknienia i nieodwracalnej atrofii tkanki gruczołowej zaatakowanej ćwiartki wymienia, a zakażenie przechodzi w formę przewlekłą (Bianchi i wsp., 2019; Carlton i McGavin, 1995; Keefe, 2012; Wataradee i wsp., 2024). *Mastitis* wywołanemu przez *S. agalactiae* często towarzyszą zmiany w obrębie gruczołu mlekowego (obrzęk, bolesność i zaczerwienienie), ale także objawy ogólnoustrojowe (gorączka, brak apetytu, apatia). Z kolei przypadki *mastitis* wywołane przez *S. dysgalactiae* przebiegają raczej w łagodnej formie. Drobnoustroj ten opisywany był jako jeden z najczęściej występujących czynników etiologicznych *mastitis* w Szwecji, Norwegii, Kanadzie i Holandii (Olde Riekerink i wsp., 2008; Østerås i wsp., 2006; Persson i wsp., 2011; Whist i wsp., 2007). Natomiast w innych rejonach świata,

takich jak Anglia i Walia, Niemcy i Urugwaj, patogen ten stanowił niewielki odsetek czynników etiologicznych *mastitis* u krów (Bradley i wsp., 2007; Tenhagen i wsp., 2009).

Postęp w zwalczaniu *mastitis* byłaby uzyskany w konsekwencji wdrożenia najpierw 5-punktowego, a następnie 10-punktowego planu zapobiegania *mastitis* (<https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2016/08/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM-International.pdf>) doprowadził do spadku odsetka zapaleń wymion wywoływanych przez patogeny zakaźne zaś wzrostu liczby chorób wywoływanych przez bakterie środowiskowe (Hillerton i Booth, 2018; Leigh, 1999). W związku z tym znaczenie *S. uberis* jako czynnika etiologicznego *mastitis* u krów obecnie znacznie wzrosło (Abd El-aziz i wsp., 2021; Bochniarz i wsp., 2020; Kabelitz i wsp., 2021; Leigh, 1999; Ruegg, 2012; Tomazi i wsp., 2019; Tommasoni i wsp., 2023). *S. uberis* jest powszechnie występującym w środowisku patogenem, który powoduje zapalenie wymienia głównie w dobrze zarządzanych stadach z wysokim poziomem przestrzegania procedur higieny pozyskiwania mleka zarówno w oborach wolnostanowiskowych jak i uwiązowych (Krömker i wsp., 2014). Drobnoustrój ten podobnie jak inne patogeny środowiskowe łatwo rozprzestrzenia się i kolonizuje środowisko i zwierzęta (Krömker i wsp., 2014; Rato i wsp., 2008). Badania potwierdziły jego obecność w jamie ustnej, migdałkach, drogach oddechowych, żwaczu, kanale strzykowym wymion krów, odbycie, kale i na skórze. W sprzyjających warunkach *S. uberis* wnika przez kanał strzykowy do zatoki mlekowej, wywołuje zakażenie a transmisja tych bakterii z wymienia zakażonego do zdrowego może odbywać się także poprzez sprzęt udojowy (Rato i wsp., 2008). Należy podkreślić, iż *S. uberis* jest oportunistycznym patogenem przystosowanym do trudnych i zmiennych warunków środowiskowych (Ward et al., 2009). Doświadczenia *in vitro* wykazały, że może przeżywać nawet w warunkach chłodniczych (Haenni et al., 2010; Sherwin i wsp., 2022). Rezerwuarem tego patogenu mogą być różne źródła: obornik, ściółka, gleba, woda, pasza przeznaczona dla zwierząt a wysoka liczba bakterii w środowisku podnosi wskaźnik zakażenia (Zadoks, 2007). Szczepy *S. uberis* zostały wykryte w 51,6% próbek skóry krów mlecznych i w 85,8% próbek środowiskowych (Krömker i wsp., 2014). Z kolei Zadoks i wsp. (2007) stwierdzili jego obecność w 63,0% próbek środowiskowych (tj. gleba i ściółka), w 23,0% próbek kału i 4,0% próbek mleka. Istnieje ponadto hipoteza, że potencjalnym rezerwuarem *S. uberis* mogą być również muchy (Krömker i wsp., 2014).

Istnieje potencjalne ryzyko, że stabilność tego patogenu w różnych warunkach środowiskowych oraz ekspresja czynników wirulencji może w przyszłości przyczynić się

do rozszerzenia zakresu jego patogenności dla innych gatunków zwierząt oraz ludzi, analogicznie jak w przypadku *S. agalactiae* (Zadoks i wsp., 2011). Obecnie *S. uberis* odpowiedzialny jest za wysoki odsetek *mastitis* u krów mlecznych, natomiast tylko w niewielkim stopniu związany jest z zakażeniami ludzi (Zadoks i wsp., 2007). Niemniej jednak w porównaniu z innymi gatunkami zachowuje się najbardziej nieprzewidywalnie. Według Hillertona i Berry'ego (2003) paciorkowce środowiskowe są odpowiedzialne za ok. 30,0% przypadków klinicznego *mastitis*, przy czym decydującą rolę odgrywa *S. uberis*, który powoduje znaczny odsetek zakażeń wymienia u krów zarówno w laktacji jak i w okresie zasuszenia.

1.4 Czynniki wirulencji *Streptococcus uberis*

Czynniki odpowiadające za chorobotwórczość *S. uberis* nie do końca zostały poznane i mogą być zmienne w zależności od szczepu. Należy podkreślić, iż pierwszym etapem zakażenia jest kontakt bakterii z komórkami gospodarza. Adhezja jest procesem dwuetapowym, w którym w początkowej fazie zaangażowane są czynniki nieswoiste, związane z właściwościami fizykochemicznymi bakterii (potencjał elektrostatyczny i właściwości hydrofobowe) (Szczypa 2012). Kluczową rolę w procesie przylegania odgrywają jednak przede wszystkim interakcje specyficzne, w których pośredniczą obecne na powierzchni bakterii białka (adhezyny) warunkujące wysoką swoistość mechanizmów. Adhezyny wiążą się specyficznie z receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek organizmu gospodarza bezpośrednio albo za pośrednictwem glikoprotein (fibronektyna, laminina, witronektyna) wchodzących w skład macierzy międzykomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) (Dego i wsp., 2018; Fessia i wsp., 2019; Harris i wsp., 2003; Khan i wsp., 2003; Mora i wsp., 2005). Wysoka częstość występowania *S. uberis* w niektórych stadach bydła mlecznego może wynikać z jego zdolności przylegania do komórek gospodarza dzięki posiadaniu cząsteczki adhezyjnej SUAM (*S.uberis Adhesion Molecule*) (Krömker i wsp., 2014). Bardzo ważną rolę odgrywają także enzymy wytwarzane przez *S. uberis* (Hensler i wsp., 2008). Aktywność streptokinazy pozwala paciorkowcom na rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza. Przekształca ona bowiem plazminogen w plazminę, aktywny enzym proteolityczny, który rozkłada m.in. włókna fibrynowe oraz inne białka macierzy pozakomórkowej (Obszańska i wsp., 2014). Z kolei syntetyzowana przez *S. uberis* hialuronidaza jest zdolna do zapobiegania proliferacji komórek nabłonka gruczołowego wymienia (Matthews i wsp., 1994). Kolejnym bardzo ważnym elementem wirulencji

CGS/GGS jest peptydaza C5a. Enzym ten odgrywa istotną rolę jako czynnik umożliwiający zatrzymanie kaskady reakcji prowadzących do rozwoju stanu zapalnego. Peptydaza C5a jest proteazą serynową, zakotwiczoną w ścianie komórkowej bakterii (Obszańska i wsp., 2014). O potencjale adaptacyjnym w organizmie gospodarza świadczy także zdolność *S. uberis* do wiązania laktoferyny w celu pozyskania żelaza niezbędnego do jego wzrostu (Iqomah i wsp., 2022) oraz możliwość wytwarzania otoczki hialuronowej, która zabezpiecza komórki bakteryjne przed fagocytozą poprzez obniżenie zdolności wiązania czynnika opsonizującego C3 dopełniacza (Blank i wsp., 2008). Matthews i wsp. (1994) wykazali obecność otoczki u 44,0% szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów. Bardzo ważnym czynnikiem wirulencji jest także zdolność drobnoustrojów do wytwarzania hemolizyny (Nizet, 2002). Niestety istnieją duże rozbieżności w zakwalifikowaniu *S. uberis* na podstawie tego kryterium. Obszańska i wsp. (2014) klasyfikuje szczepy *S. uberis* do grupy β -hemolizujących gatunków paciorkowców podczas gdy dostępnych jest wiele wyników badań w których wykazano, że szczepy *S. uberis* wyizolowane z mleka krów chorych na *mastitis* wywołują hemolizę typu α lub γ (Krömker i wsp., 2014).

1.5. Przebieg procesu zakażenia wymienia wywołanego przez drobnoustroje chorobotwórcze

S. uberis może wywoływać podkliniczną formę *mastitis*, ale także zapalenie kliniczne przebiegające z silnie wyrażonymi objawami (Abd El-aziz i wsp., 2021; Bochniarz i wsp., 2020; Cobirka i wsp., 2020; Malinowski i Gajewski, 2009; Tommasoni i wsp., 2023). Pojawienie się drobnoustrojów w wymieniu mobilizuje układ odpornościowy i wyzwala mediatory reakcji zapalnej, których zadaniem jest rozpoznanie patogenu, próba jego zniszczenia i usunięcia wraz z mlekiem w trakcie doju, a także przywrócenie prawidłowej funkcji tkanek objętych procesem zapalnym (Alnakip i wsp., 2014). Zdecydowanie najważniejszą rolę we wczesnym stadium zakażenia gruczołu mlekowego odgrywają leukocyty, zarówno ich populacja wytwarzana lokalnie w wymieniu jak i napływająca wraz z krwią do ogniska zapalnego, zwiększając tym samym liczbę komórek somatycznych (Kehrli i Shuster, 1994; Paape i wsp., 2000; Shuster i wsp., 1993). Mleko w zdrowym wymieniu zawiera < 200 000 komórek somatycznych w 1 mL mleka, wśród których największy odsetek stanowią komórki nabłonkowe (15–75%) oraz makrofagi (35-80%) zaś w dalszej kolejności neutrofile (3-25%) oraz limfocyty (0-25%) (Bradley i Green, 2005; Schukken i wsp., 2003). W przebiegu zakażenia wymienia

następuje wzrost LKS w mleku przede wszystkim z powodu napływu leukocytów z krwi obwodowej. Zdolność tych komórek do migracji z naczyń krwionośnych i ich aktywność w miejscu zakażenia decydują o nasileniu odpowiedzi immunologicznej organizmu krowy a tym samym o przebiegu procesu zapalnego i czasie jego trwania. Dominującą rolę w mleku krów chorych na *mastitis* pełnią neutrofile, wraz z którymi do miejsca zakażenia napływa zwiększona liczba makrofagów, a w dalszej kolejności także limfocytów (Alnakip i wsp., 2014; Rainard i Riollet, 2006). Przemieszczanie się komórek z krwi do wymienia uzależnione jest od wielu czynników m.in. obecności w tkankach mediatorów zapalenia: cytokin, wśród których najważniejszym czynnikiem chemotaktycznym jest IL-8 oraz składników dopełniacza (głównie składowa C5a) (Baggiolini i Clark-Lewis, 1992; Shuster i wsp., 2017; Watanabe i wsp., 2008). Napływające oraz miejscowo produkowane neutrofile i makrofagi stanowią pierwszą najważniejszą linię obrony gruczołu mlekowego przed patogenami, dlatego też w miejscu zakażenia pojawia się ogromna ich ilość, mogą wówczas stanowić nawet 100% ogólnej liczby komórek somatycznych. Neutrofile przenikają przez nabłonek gruczołu mlekowego w procesie diapedezy nie powodując mechanicznego uszkodzenia jego komórek, jedynie w przypadku bardzo intensywnej migracji może dochodzić do jego degradacji (Akers i Nickerson, 2011). Zadaniem komórek układu odpornościowego jest fagocytoza bakterii oraz pozostałości po ulegających uszkodzeniu komórkach, również bakteryjnych (Rainard i Riollet, 2006). Jeśli komórki te skutecznie wyeliminują czynniki zakaźne napływ neutrofilów ustaje, a LKS w mleku powraca do wartości fizjologicznych. Jeśli drobnoustroje przeżyją pierwszą fazę obrony komórkowej wówczas proces zapalny rozwija się, a neutrofile przemieszczają się w stronę światła pęcherzyków gruczołu mlekowego. Prowadzi to do uszkodzenia komórek wydzielniczych i zmniejszenia produkcji mleka (Bianchi i wsp., 2019; Akers i Nickerson, 2011; Paape i wsp., 2000).

Patogeny obecne w wymieniu wykorzystują doskonałe warunki do intensywnego namnażania dzięki składnikom odżywczym pobieranym z mleka oraz odpowiedniej dla ich wzrostu temperaturze. Toksyny i enzymy bakteryjne oraz składniki ich ściany komórkowej stymulują w sposób bezpośredni produkcję licznych mediatorów zapalenia przez komórki odpornościowe, a tym samym przyczyniają się do zintensyfikowania reakcji zapalnej. Najważniejszą rolę w grupie mediatorów zapalenia odgrywiają cytokiny, ale także prostaglandyny, leukotrieny, serotonina, histamina oraz składniki dopełniacza. Te bioaktywne związki wykazują różne profile działania, w pierwszej fazie zakażenia

głównie lokalnie w zakażonych tkankach wymienia (Ali i wsp., 2023; Alluwaimi i Cullor, 2002; Alnakip i wsp., 2014; Bannerman, 2009; Kehrl i Harp, 2001; Rainard i wsp., 2022).

1.6. Udział cytokin w procesie zapalenia wymienia u krów

Cytokiny to rozpuszczalne w wodzie peptydy regulacyjne wytwarzane podczas procesu zapalnego, które w zdecydowanej większości pełnią więcej niż jedną funkcję, w związku z tym często konieczne jest ich wzajemne współdziałanie w celu uzyskania oczekiwanego korzystnego efektu (Alluwaimi i Cullor, 2002; Rainard i Riollet, 2006; Vitenberga-Verza i wsp., 2022). Niektóre z nich, takie jak: czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*), interferon γ (IFN- γ , ang. *Interferon γ*), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8) i interleukina-12 (IL-12) w zdrowym wymieniu występują fizjologicznie i w przypadku zakażenia natychmiast zostają włączone do szlaku odpowiedzi immunologicznej, w którym pełnią określoną funkcję (Rainard i Riollet, 2006). Cytokiny stanowią najważniejszy filar reakcji immunologicznej począwszy od początkowej fazy zakażenia, aż do stadium zdrowienia, zarówno miejscowo w wymieniu jak i ogólnoustrojowo. Zapewniają one odpowiednią komunikację pomiędzy składnikami odporności komórkowej, łącząc w ten sposób elementy wrodzonej i nabytej odporności wymienia (Alluwaimi i Cullor, 2002; Alnakip i wsp., 2014; Vitenberga-Verza i wsp., 2022).

Cytokiny i chemokiny odgrywają zasadniczą rolę już w procesie inicjowania odpowiedzi prozapalnej, która bezwarunkowo połączona jest ze zmianami ilościowymi i jakościowymi różnych składników układu immunologicznego (Rainard i Riollet, 2006; Rambeaud i wsp., 2003). Cytokiny prozapalne: IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α są głównymi stymulatorami reakcji zapalnej najpierw na poziomie lokalnym w wymieniu (Harada i wsp. 1994; Alnakip i wsp., 2014). Wywołują wzmożoną migrację neutrofili z krążenia obwodowego do wymienia poprzez indukcję ekspresji cząsteczek adhezji śródbłonna naczyniowego (głównie dla selektyn E i P), dzięki zdolności współdziałania z transformującym czynnikiem wzrostu alfa (TGF- α , ang. *transforming growth factor α*), czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF – ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) i kilkoma czynnikami chemotaktycznymi m.in. składową dopełniacza C3a i C5a, leukotrienem B₄, prostaglandyną F₂ α , rodnikami tlenowymi i białkami ostrej fazy (Harada i wsp., 1994; Rainard i Riollet, 2006; Rainard i wsp., 2022). W konsekwencji następuje zwiększona ekspresja cząsteczki adhezji neutrofili Mac1 (*Macrophage-1 antigen*, znanej również

jako CD11b/CD18), co umożliwia neutrofilom ścisłe wiązanie się ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych przy współudziale stale obecnej w niskich stężeniach w błonach komórek tego śródbłonka oraz w błonach leukocytów, cząsteczki adhezji międzykomórkowej ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*, znanej także jako CD54) (Rainard i wsp., 2022). ICAM-1 indukowany jest przez IL-1 i TNF- α i w przebiegu zakażenia występuje zwiększona jego ekspresja w śródbłonku naczyń krwionośnych, makrofagach i limfocytach. Po aktywacji leukocyty wiążą się z komórkami śródbłonka poprzez ICAM-1, a następnie migrują do tkanek. Ta interakcja adhezyjna pozwala neutrofilom na migrację do tkanek wymienia zgodnie z gradientem stężeń chemoatraktantów. Jednym z najsilniej działających czynników chemotaktycznych o długotrwałym działaniu jest IL-8 (Harada i wsp., 1994; Kobayashi i wsp., 2008). Kilka różnych typów komórek, w tym: monocyty, limfocyty T, komórki nabłonkowe, komórki śródbłonka, fibroblasty, makrofagi, komórki dendrytyczne i neutrofile wytwarzają IL-8, ale jej aktywatorami mogą być także reaktywne formy tlenu: nadtlenki i rodniki hydroksylowe (Baggiolini i Clark-Lewis, 1992; Rainard i Riollot, 2006; Watanabe i wsp., 2008). IL-8 wykazuje trzy główne kierunki działania. Należy do grupy silnych chemoatraktantów odpowiedzialnych za migrację neutrofili do wymienia i umożliwia ich adhezję do komórek śródbłonka, co jest niezbędnym etapem przechodzenia neutrofili z naczyń krwionośnych do zakażonych tkanek oraz stymuluje zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych Mac1. Drugi obszar działania tej cytokiny to wmacnianie aktywności mikrobiobójczej PMN (ang. *polymorphonuclear neutrophils* - polimorfonuklearne neutrofile) i stymulacja fagocytozy opsonizowanych komórek. Makrofagi są aktywowane do produkcji i uwalniania cytokin, zwiększają opsonizację patogenów a następnie wspomagają fagocytozę bakterii opsonizowanych IgG (Soehnlein i wsp., 2008). Aktywacja oksydazy NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) pomaga generować reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) wykorzystywane do zwalczania patogenów w miejscu infekcji (Novac i Andrei, 2020). Inną funkcją IL-8 jest regulacja przeżywalności komórek gospodarza, zazwyczaj poprzez zapobieganie apoptozie i wydłużanie żywotności neutrofili dzięki czemu dłużej spełniają swoje obronne funkcje (Soehnlein i wsp., 2008). Należy zatem podkreślić, iż migracja komórek odpornościowych z krwioobiegu do wymienia jest złożonym procesem wymagającym współpracy wielu różnych czynników w tym cytokin, chemoatraktantów, selektyn i integrzyn. Wykazano także, że funkcję stymulatora migracji leukocytów do

wymienia poprzez zwiększanie ekspresji IL-8 spełnia również interleukina-17 (IL-17) (Bougarn i wsp., 2011; Rainard i Riollot, 2006).

Leukocyty w wymieniu pełnią bardzo ważną funkcję obronną przeciw patogenom. Badania wykazały, że populacja białych krwinek przechodzących z krwi do wymienia posiada zwiększoną liczbę receptorów powierzchniowych dla immunoglobulin (Ig) i składników dopełniacza oraz wykazuje większą zdolność fagocytarną niż ich odpowiedniki we krwi (Paape i wsp. 2000). Stymulacja aktywności mikrobójczej leukocytów zlokalizowanych wewnątrz zakażonych tkanek jest regulowana przez określone cytokiny prozapalne: IL-1 β , IL-8, TNF- α i G-CSF, natomiast różnicowanie limfocytów B jest aktywowane głównie przez IL-2 i IL-6 (Bannerman i wsp., 2009; Rainard i Riollot, 2006). Ponadto IL-6 uważa się za najsilniejszego stymulatora produkcji białek ostrej fazy (BOF, ang. APP – *acute phase protein*) zarówno w wątrobie jak i wymieniu, który dzięki temu inicjuje reakcję ostrej fazy (ROF, ang. APR – *acute phase reaction*) (Alnaki i wsp., 2014; Bochniarz i wsp., 2017; Hagiwara i wsp., 2001; Saco i Bassols, 2022). Synergistyczne działanie w generowaniu reakcji zapalnych wykazuje także IL-17, poprzez zwiększenie produkcji IL-6 i IL-8 oraz ekspresji cytokin zapalnych TNF- α i IL-1 β (Bougarn i wsp., 2011). Podobne działanie wykazuje TGF- α poprzez zwiększanie produkcji prostaglandyn i wzmacnianie efektów działania IL-1 β i TNF- α (Alnaki i wsp., 2014; Chockalingam i wsp., 2005; Rainard i Riollot, 2006). Ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej odgrywa także IL-12, która stymuluje produkcję IFN- γ , promuje proliferację i aktywację limfocytów T oraz wzmacnia cytotoksyczne działanie komórek NK (ang. *Natural Killer*). Cytokina ta wytwarzana jest przez makrofagi, limfocyty B, monocyty i neutrofile. Działa jako czynnik wzrostu dla aktywowanych komórek NK i wzmacnia ich cytotoksyczne działanie. Podobnie jak IFN- γ , zwiększa ekspresję innych cytokin, takich jak TNF- α , IL-8 i IL-10 (Alnaki i wsp., 2014; Rainard i wsp. 2022).

W konsekwencji współdziałania cytokin z innymi komponentami układu immunologicznego w przebiegu zapalenia wymienia dochodzi do generowania objawów miejscowych w obrębie gruczołu mlekowego (zaczerwienienie, obrzęk, podwyższona ciepłota wymienia, bolesność) oraz ogólnoustrojowych (m.in. wzrost temperatury ciała), ale także do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, wzrostu poziomu kortyzolu w surowicy krwi oraz stymulacji produkcji białek ostrej fazy i wyzwolenia reakcji ostrej fazy (Alnaki i wsp., 2014; Rainard i Riollot, 2006; Shuster i wsp., 1997).

1.7. Reakcja ostrej fazy w przebiegu zakażenia wymienia u krów

ROF (reakcja ostrej fazy, ang. APR – *acute phase reaction*) jest jednym z głównych mechanizmów biorących udział w procesach umożliwiających przywrócenie homeostazy w miejscu zakażenia i obejmuje szereg reakcji takich jak gorączka, leukocytoza, zmiany hormonalne i metaboliczne, a także zmiany stężenia białek w surowicy, zwanych białkami ostrej fazy (BOF, ang. APP – *acute phase protein*) (Eckersall i wsp., 2001; Eckersall i Bell, 2010). Miejscem syntezy BOF jest głównie wątroba zaś czynnikami stymulującymi cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 β i IL-6 oraz TNF- α wydzielanymi w odpowiedzi na zakażenie drobnoustrojami (Berg i wsp., 2011; Hagihara i wsp., 2004; Murata i wsp., 2004; Petersen i wsp., 2004; Saco i Bassols, 2022). W zależności od wzrastającego lub malejącego stężenia tych białek w przebiegu zapalenia klasyfikowane są jako BOF pozytywne lub negatywne (Saco i Bassols, 2022). Poszczególne białka ostrej fazy wykazują zdolność do wywoływania silnej, umiarkowanej lub słabej reakcji. Poziom białka ostrej fazy o silnym działaniu w następstwie zakażenia gwałtownie wzrasta zwiększając swój poziom nawet o 100-1000 razy, osiąga szczyt po 24-48 godzinach, a następnie gwałtownie spada w fazie zdrowienia. W odpowiedzi immunologicznej o umiarkowanym stopniu, stężenie BOF w początkowej fazie zakażenia wzrasta około 5-10-krotnie, maksymalny poziom osiąga po 48-72 godzinach, po czym stopniowo obniża się. Poziom białka ostrej fazy o słabej aktywności wzrasta sukcesywnie osiągając poziom graniczny większy o 50-100% stężenia fizjologicznego (Petersen i wsp., 2004). Zidentyfikowano również "negatywne" biomarkery BOF, których stężenie spada podczas odpowiedzi zapalnej, chociaż oprócz albuminy, ich stosowanie w weterynaryjnej diagnostyce klinicznej nie jest powszechne (Petersen i wsp., 2004). Priorytetowym działaniem białek ostrej fazy jest przywracanie homeostazy organizmu poprzez aktywację układu dopełniacza, reakcję nieswoistą związaną z opsonizacją i aglutynacją, ograniczaniem uszkodzenia tkanek powodowanych przez bakterie oraz enzymy lizosomalne z komórek fagocytujących oraz wzmożoną aktywność chemotaktyczną (Eklund i wsp., 2012; Saco i Bassols, 2022). Niezależnie od pełnionej funkcji wszystkie łączy wspólna cecha, czyli zaangażowanie w różnorodne procesy fizjologiczne mające na celu odzyskanie homeostatycznej równowagi organizmu zaburzonej przez zakażenie (Eckersall i wsp., 2001). BOF mogą być wykorzystywane w diagnostyce zakażeń, prognozowaniu i monitorowaniu skuteczności leczenia, a także w badaniach przesiewowych stanu zdrowia zwierząt (Tóthová i wsp., 2004). Biomarkery te

są wysoce czułymi, aczkolwiek nieswoistymi wskaźnikami procesu zapalnego, wykazującymi znaczne różnice pomiędzy gatunkami zwierząt (Ali i wsp., 2023; Berg i wsp., 2011; Berry i wsp., 2005; Bochniarz i wsp., 2024 a i b; Gerardi i wsp., 2009). U bydła najważniejszą rolę jako białka ostrej fazy odgrywają surowiczy amyloid A oraz haptoglobina. Zidentyfikowano także ciężki łańcuch 4 inhibitora inter-alfa-trypsyny (ITIH4, ang. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4*) jako BOF u bydła, który jest analogiem świńskiego Pig-MAP (Soler i wsp., 2019).

Serum amyloid A (SAA) jest jednym z najważniejszych białek ostrej fazy (Berg i wsp., 2011; Berry i wsp., 2005; Bochniarz i wsp., 2020; Gerardi i wsp., 2009; Hussein i wsp., 2018; Kováč G. i wsp., 2011; Kovačević-Filipović i wsp., 2012; Nazifi i wsp., 2008). Początkowo terminem „amyloid” określano występującą w roślinach substancję należącą do grupy węglowodanów („amylon” – skrobia). Kolejne badania wykazały jednak, że amyloid jest białkiem. SAA jest stale obecny we krwi zdrowych ludzi i zwierząt (McDonald i wsp., 2001). W przebiegu procesu zapalnego jego poziom gwałtownie wzrasta, szczególnie w pierwszych 24 godzinach reakcji ostrej fazy, po czym szybko spada (Hagiwara i wsp., 2001; Sack, 2018). Opisywanych jest kilka izotypów SAA u zwierząt: typ 1, 2 i 3 należą do grupy pozytywnych białek ostrej fazy. Transkrypcja mRNA izoformy SAA-1 i SAA-2 zachodzi głównie w hepatocytach. Natomiast transkrypcja genu izoformy 3 amyloidu A (używane skróty w literaturze: MAA, SAA3, AA3, M-SAA3) zawartego w mleku zachodzi w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego (*MEC – mammary epithelial cells*) (McDonald i wsp., 2001). W odróżnieniu od izoformy białka syntetyzowanego w wątrobie, N-koniec sekwencji MAA zawiera cztery identyczne aminokwasy, niezależnie od gatunku zwierząt (koń, krowa, owca), które nie występują w izoformie białka syntezy wątroby (Trela i wsp., 2022). U bydła MAA zawiera 83% tej samej sekwencji aminokwasów co SAA. Wydzielanie amyloidu A do surowicy i amyloidu A do mleka (MAA) jest stymulowane przez cytokiny, takie jak IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i TNF- α (Hagihara i wsp., 2004; Murata i wsp., 2004; Petersen i wsp., 2004; Saco i Bassols, 2022). Morrow i wsp. (1981) w badaniu doświadczalnym przeprowadzonym na myszach wykazali, że poziom mRNA dla SAA w wątrobie wzrósł 500-krotnie po dootrzewnowym podaniu lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS, ang. *Lipopolysaccharide*). SAA wykazuje znaczącą aktywność immunologiczną poprzez indukcję syntezy cytokin, działanie chemotaktyczne na neutrofile i komórki tuczne oraz mobilizację wapnia przez monocyty, a ponadto hamuje gorączkę oraz wybuch oksydacyjny granulocytów obojętnochłonnych i aktywację płytek

krwi (Eklund i wsp., 2012; Petersen i wsp., 2004). Działa wielotorowo dzięki zdolności wiązania i aktywacji receptorów na powierzchni komórki, w tym receptorów Toll-podobnych TLR2 i TLR4 (*ang. Toll-like Receptors*) (Eklund i wsp., 2012).

1.8. Oporność drobnoustrojów na antybiotyki stosowane w leczeniu mastitis u krów

Ryzyko zakażenia spowodowanego przez drobnoustroje chorobotwórcze odporne na powszechnie stosowane antybiotyki stanowi obecnie jedno z najpoważniejszych zagrożeń. Z danych Światowej Organizacji Zdrowia wynika, że zakażenia wywoływane przez „superoporne” bakterie stanowią wielkie wyzwanie dla medycyny (Kovačević i wsp., 2022, Tomanić 2023). Szacuje się, że mogą być przyczyną ponad 30 000 zgonów rocznie w Unii Europejskiej (UE) (Gajdács i wsp. 2021, Tomanić 2023) i 700 000 zgonów rocznie na całym świecie (Krömker i Leimbach, 2017; Mestrovic i wsp., 2019). W samej UE ponoszony jest koszt ok. 1,5 miliarda euro rocznie na opiekę zdrowotną ludzi i zwierząt z powodu leczenia zakażeń bakteryjnych (European Commission. EU Action on Antimicrobial Resistance. Available online: https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_en (accessed on 1 March 2023).

Szybkie rozprzestrzenianie się bakterii wielolekoopornych, w tym szczepów niewrażliwych na żaden z dostępnych preparatów w dużym stopniu jest konsekwencją nadużywania i nieprawidłowego stosowania antybiotyków zarówno w populacji ludzi jak i zwierząt. Należy podkreślić, iż znaczącą rolę w progresji tego procesu stanowi nieuzasadnione aplikowanie leków zwierzętom hodowlanym, także w terapii *mastitis* u krów (Hossain et al., 2017). Niestety oprócz uzasadnionej terapii, część antybiotyków aplikowanych jest także w celach profilaktycznych głównie w intensywnej produkcji zwierzęcej (Landers i wsp., 2012; Tomanić i wsp., 2023). Szacuje się, że ponad 50,0% wszystkich leków przeciwdrobnoustrojowych na świecie wykorzystuje weterynaria (Gajdács i wsp. 2021; Tomanić i wsp., 2023). Van Boeckel i wsp. (2015) prognozują, że do 2030 roku ich zużycie wzrośnie do 67%. Należy zaznaczyć, iż zapalenie wymienia jest najczęściej wskazywaną przyczyną stosowania terapii antybiotykowej w hodowli krów (Boonyayatra, 2012; Ruegg, 2009). Niestety coraz częściej występujące trudne w leczeniu przypadki *mastitis* wymagają podawania do wymienia antybiotyków przez dłuższy okres czasu niż wynika to ze standardowych procedur leczenia i zaleceń producenta leków. Przynosi to wiele negatywnych skutków, z jednej strony związanych z ryzykiem narastania lekooporności, z drugiej strony ze stratą ekonomiczną z powodu

konieczności przestrzegania okresu karencji na mleko oraz kosztów leków i usług lekarsko-weterynaryjnej (Cheng i Han, 2020, Gomes i wsp., 2016). Terapia antybiotykowa *mastitis* stanowi także zagrożenie dla zdrowia publicznego, biorąc pod uwagę fakt, że około 62% wyizolowanych czynników wywołujących *mastitis* jest opornych na co najmniej jeden środek przeciwdrobnoustrojowy (Tommasoni i wsp., 2023). Powód do obaw budzi także obecność pozostałości antybiotyków w mleku, co stanowi ogromny problem w przetwórstwie mleka z uwagi na niewłaściwy przebieg procesu technologicznego produkcji fermentowanych produktów mlecznych (Cheng i Han, 2020; Gomes i wsp., 2016). Kolejny negatywny skutek stosowania antybiotyków dotyczy wydajności mlecznej krowy po przebytych zapaleniu wymienia. Chociaż antybiotyki mogą wyeliminować czynniki etiologiczne, nie chronią bezpośrednio gruczołu mlekowego przed uszkodzeniem tkanki gruczołowej, często nieodwracalnym, stąd gospodarstwa ponoszą kolejne straty z powodu zmniejszonej wydajności mlecznej w kolejnych laktacjach (Bianchi i wsp., 2019; Cheng i Han, 2020; Martin i wsp., 2018; Zhao i Lacasse, 2008). W rezultacie coraz częściej niemożliwe jest skuteczne wyleczenie zakażeń wymienia co w konsekwencji prowadzi do rozwoju lekooporności u drobnoustrojów.

W ostatnim czasie poznano wiele mechanizmów powstawania oporności oraz ich rozprzestrzenianie się wśród bakterii (Coculescu, 2009; Reygaert, 2018; Sharmila i wsp., 2024). Lkooporność jest uwarunkowana informacją zakodowaną w materiale genetycznym drobnoustroju, przy czym może być naturalna i nabyta (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018). Oporność naturalna jest charakterystyczna dla danego gatunku, rodzaju czy grupy drobnoustrojów. Jest ona kodowana chromosomalnie, ale może też wiązać się z brakiem lub niskim powinowactwem receptora do antybiotyku, utrudnionym transportem antybiotyku do komórki lub degradacją przez enzymy (Reygaert i wsp., 2018). Oporność nabyta powstaje u bakterii, które pierwotnie były wrażliwe na dany antybiotyk lub chemioterapeutyk. Oporność nabytą można podzielić na pierwotną i wtórną. Oporność nabyta pierwotna powstaje wskutek spontanicznej mutacji i może pojawiać się bez kontaktu z lekiem (Coculescu i wsp., 2009). Ten typ oporności jest kodowany chromosomalnie i nie może być przekazywany innym gatunkom bakterii. Zmutowane bakterie występują sporadycznie, jednakże przeżywają w miejscu zakażenia po zastosowaniu antybiotyku i w konsekwencji przewyższają ilością populację wrażliwe. Mechanizmy prowadzące do powstania oporności nabytej wtórnej rozwijają się w warunkach kontaktu drobnoustroju z lekiem przeciwbakteryjnym (Markiewicz i

Kwiatkowski, 2018). Mechanizm genetyczny odpowiedzialny za pojawienie się oporności wtórnej ma charakter pozachromosomalny, w którym najważniejszą rolę odgrywają geny zlokalizowane w leżących w cytoplazmie kolistych fragmentach DNA, nazywanych plazmidami (Coculescu, 2009). Jeden plazmid może zawierać geny oporności dla kilku różnych leków przeciwdrobnoustrojowych i może przekazywać je z jednej komórki bakteryjnej na inną, głównie na drodze koniugacji i transdukcji. Podczas procesu koniugacji przekazywanie plazmidów odbywa się przez bezpośredni kontakt dwóch lub więcej komórek bakteryjnych, za pomocą wytwarzanych przez nie nici białkowych. W procesie koniugacji mogą brać udział bakterie różnych gatunków i rodzajów, często bardzo odległych filogenetycznie, dlatego też stada zwierząt, które stanowią siedlisko ogromnej ilości drobnoustrojów stwarzają idealne warunki dla horyzontalnego przenoszenia genów. Szczególnie niekorzystne jest przekazywanie w ten sposób oporności wzajemnie pomiędzy grupą bakterii saprofitycznych i chorobotwórczych. Plazmidy mogą być przekazywane z komórki dawcy na komórkę biorcy także poprzez wirusy bakteryjne czyli bakteriofagi w procesie transdukcji. Geny oporności mogą znajdować się również na transpozonach. Są to tzw. „skaczące geny”, czyli niewielkie sekwencje DNA, które są zdolne do integracji z materiałem genetycznym zarówno chromosomów jak i plazmidów (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018; Sharmila i wsp., 2024).

Wśród głównych mechanizmów oporności na antybiotyki można wyróżnić: enzymatyczną degradację lub modyfikację antybiotyku; zmiany w strukturze błon komórkowych, których wynikiem jest zablokowanie lub zmniejszenie syntezy białek porynowych tworzących kanały przez które wnika antybiotyk do miejsca docelowego działania w komórce; zwiększoną syntezę białek transportowych tworzących układ pompy efluksowej usuwającej w sposób czynny lek z komórki - pomimo obecności leku w wystarczającym stężeniu w środowisku zakażenia komórka pozostaje niewrażliwa na jego działanie; zmianę miejsca docelowego działania; syntezę białka osłaniającego fizycznie dostęp do miejsca docelowego, a także pominięcie ogniwa szlaku metabolicznego blokowanego przez chemioterapeutyk (Coculescu, 2009; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018; Reygaert, 2018; Sharmila i wsp., 2024).

W terapii *mastitis* najczęściej stosowane są antybiotyki β -laktamowe, linkozamidy, makrolidy, tetracykliny oraz aminoglikozydy (Abdi i wsp., 2021; Boireau i wsp., 2018; Bolte i wsp., 2020; Cheng i Han, 2020; Haenni i wsp., 2011; Zouharova i wsp., 2023). Penicyliny stanowią najstarszą grupę antybiotyków β -laktamowych. Ich

najważniejsze zalety to niska toksyczność, bardzo dobry efekt bakteriobójczy oraz dobra penetracja do tkanek, szczególnie w przebiegu zapalenia (Markiewicz i Kwiatkowski, 2018). Wadą zaś jest szybka eliminacja z organizmu oraz znaczna wrażliwość na β -laktamazy, które stanowią główny mechanizm obronny bakterii przed działaniem antybiotyków β -laktamowych. Enzymy te hydrolizują wiązanie amidowe w pierścieniu β -laktamowym, co powoduje inaktywację antybiotyku (Haenni i wsp., 2010). Należy jednak podkreślić, iż drobnoustroje należące do rodzaju *Streptococcus* spp. rzadko wytwarzają β -laktamazy, w związku z czym antybiotyki zawierające pierścień β -laktamowy wykazują z reguły pozytywny efekt terapeutyczny w leczeniu *mastitis* wywołanym przez te patogeny i zalecane są jako leki pierwszego wyboru (Zouharova i wsp., 2023). Niestety obecność w środowisku innych bakterii Gram-dodatnich, które posiadają zdolność wytwarzania β -laktamaz i wydzielania ich na zewnątrz komórki stanowią ochronę dla *Streptococcus* spp. Enzymy te działając w środowisku zewnętrznym, inaktywują cząsteczki antybiotyku, do którego mają powinowactwo. W rezultacie chronią nie tylko komórki bakteryjne, z których pochodzą, ale także inne znajdujące się w środowisku bakterie, w tym również takie, które nie posiadają zdolności wytwarzania własnych enzymów. β -laktamazy są kodowane przez geny *bla* znajdujące się w chromosomie bakteryjnym lub w plazmidach (Abd El-aziz i wsp., 2021). Należy podkreślić, iż komórka bakteryjna może wykazywać jednocześnie kilka mechanizmów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018, Zouharova i wsp., 2023). Proces nabywania i modyfikowania oporności przez bakterie ma charakter ciągły i szczególnie intensywnie zachodzi w populacjach drobnoustrojów w stadach, zwłaszcza w przypadku nieuzasadnionego nadużywania antybiotyków. Kontakt z antybiotykami może wywoływać oporność indukowaną na różne grupy antybiotyków, co w konsekwencji może prowadzić do powstawania tzw. wieloopornych szczepów, zarówno wśród bakterii patogennych, jak i będących składnikami mikrobioty fizjologicznej (Coculescu, 2009; Zouharova i wsp., 2023).

Makrolidy wykazują szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego oraz odznaczają się dobrą penetracją tkankową i wydłużonym czasem biologicznego półtrwania (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018). U paciorkowców występują dwa mechanizmy oporności na makrolidy: modyfikacja miejsca docelowego działania leku oraz mechanizm wypompowywania leku z komórki (Haenni i wsp., 2011; Haenni i wsp., 2018; Tian i wsp., 2019). Modyfikacja miejsca docelowego działania leku

uwarunkowana jest obecnością genów *erm* (głównie *ermA* i *ermB*) kodujących metylazy rybosomalne (Haenni i wsp., 2011; Kaczorek i wsp., 2017). Oporność na makrolidy uwarunkowana metylacją miejsca wiązania antybiotyku na rybosomie prowadzi do krzyżowej oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy (oporność w mechanizmie MLSB) (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018). Jednakże w zależności od typu genu *erm* i poziomu jego ekspresji, oporności fenotypowej na erytromycynę może towarzyszyć zachowanie wrażliwości na linkozamidy (klindamycynę i linkomycynę). Drugi mechanizm oporności związany jest z obecnością pomp błonowych aktywnie wypompowujących lek z komórki. U paciorkowców opisano tzw. M-fenotyp związany z obecnością pompy błonowej, warunkującej oporność na erytromycynę i pozostałe makrolidy 14 i 15-członowe (kodowany przez gen *mefA*) (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018). W przypadku linkozamidów mechanizm działania przeciwbakteryjnego polega na blokowaniu biosyntezy białka przez zahamowanie procesu elongacji łańcucha peptydowego (Haenni i wsp., 2010).

Tetracykliny należą do najstarszych antybiotyków, często stosowanych w terapii zakażeń z uwagi na bardzo szerokie spektrum działania. W efekcie zanotowano znaczny odsetek szczepów lekoopornych wśród Gram-dodatnich ziarenkowców (Abd El-aziz i wsp., 2021; Zouharova i wsp., 2023). Oporność na tetracykliny najczęściej ma związek z obecnością genów oporności *tet* zlokalizowanych na ruchomych elementach genetycznych – plazmidach lub transpozonach (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018). Główny mechanizm oporności na tetracykliny występujący u bakterii Gram-dodatnich polega na aktywnym usuwaniu antybiotyku z komórki (*ang. efflux pump* – pompa efluksowa) kodowany m.in. przez gen *tet L*. Drugi mechanizm oporności na tetracykliny polega na modyfikacji miejsca docelowego działania na rybosomie. Oporność rozwija się w wyniku punktowej mutacji w rRNA a za jej powstanie odpowiedzialne są geny należące także do rodziny *tet* (m.in. *tet M* oraz *tet O*) (Abd El-aziz i wsp., 2021; Zhang i wsp., 2021). Mechanizm ten polega na syntezie białek ochronnych rybosomu, które promują uwalnianie tetracykliny z miejsca wiązania A (akceptorowego) na rybosomie, czego efektem jest dysocjacja antybiotyku związanego z miejscem docelowego działania. Jeden szczep bakterii Gram-dodatnich może być nośnikiem kilku genów *tet* należących do różnych klas (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018).

W przeciwieństwie do innych antybiotyków blokujących syntezę białka takich jak makrolidy czy tetracykliny, które są lekami bakteriostatycznymi, aminoglikozydy

działają bakteriobójczo. Wiążą się w sposób trwały z podjednostką 30S rybosomu, co prowadzi do zaburzenia odczytu informacji genetycznej i zahamowania syntezy białek bakteryjnych (Dzierżanowska, 2018; Markiewicz i Kwiatkowski, 2018). Oporność na antybiotyki aminoglikozydowe może być uwarunkowana występowaniem następujących mechanizmów: enzymatyczną inaktywacją antybiotyku, zmniejszeniem przepuszczalności błony i stężenia antybiotyku w komórce, usuwaniem antybiotyku z komórki przez jego aktywne wypompowywanie oraz/lub modyfikacją miejsca docelowego działania (podjednostki 30S rybosomu). Wszystkie te mechanizmy mogą występować osobno lub razem (Kowalska-Krochmal i wsp., 2010). Bakterie, u których występuje wysoki stopień oporności na aminoglikozydy, zazwyczaj dysponują kilkoma systemami jednocześnie (Kowalska-Krochmal i wsp., 2010). Najważniejsze znaczenie w rozwoju oporności bakterii na aminoglikozydy i jednocześnie najlepiej poznany jest pierwszy z wymienionych mechanizmów. W wyniku działania enzymów modyfikujących antybiotyki ulega inaktywacji, a jego działanie przeciwbakteryjne zostaje zniesione. Enzymy modyfikujące możemy zaliczyć do trzech klas: acetylotransferazy (AAC, katalizują przy udziale acylokoenzymu A acetylację grup aminowych najczęściej w pozycji 2', 3 oraz 6'); nukleotydylotransferazy (ANT; katalizują przy udziale adenosynotrifosforanu (ATP, *ang. adenosine triphosphate*) adenylację grup hydroksylowych najczęściej w pozycji 4', 2" i 3"); fosfotransferazy (APH, katalizują przy udziale ATP fosforylację grup hydroksylowych najczęściej w pozycji 2", 3') (Kowalska-Krochmal i wsp., 2010; Zhang i wsp., 2021; Zouharova i wsp., 2023).

Zgodnie z koncepcją „One Health - Jedno zdrowie” wszystkie dziedziny, w których wykorzystywane są antybiotyki czyli medycyna ludzi, weterynaria oraz rolnictwo powinny wspólnie dążyć do ograniczenia ich stosowania oraz w sposób świadomy i odpowiedzialny wyznaczać obszary, gdzie ich użycie jest niezbędne. Jednym z najistotniejszych punktów tego programu jest ocena lekowrażliwości patogenu odpowiedzialnego za zakażenie i zastosowanie celowanej terapii. Drugim niezmiernie ważnym aspektem jest kontrola stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt, w tym również w leczeniu *mastitis* u krów (Tomanic i wsp., 2023).

2. CEL I HIPOTEZA BADAWCZA

Celem badań będzie opracowanie charakterystyki *Streptococcus uberis* jako czynnika etiologicznego mastitis u krów poprzez:

- 1) ocenę epizootyczną występowania *Streptococcus uberis* w stadach krów mlecznych znajdujących się w województwie kujawsko-pomorskim
- 2) określenie zależności odsetka wyizolowanych szczepów *Streptococcus uberis*, a sytuacją zoohigieniczną w hodowli
- 3) ocenę natężenia odpowiedzi immunologicznej u krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *Streptococcus uberis* w oparciu o określenie poziomu białka ostrej fazy: surowiczego amyloidu A oraz cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β i TNF- α w mleku oraz surowicy krów
- 4) ustalenie fenotypowych profili lekowrażliwości *Streptococcus uberis* na antybiotyki najczęściej stosowane w leczeniu mastitis u krów: penicylinę, cefaleksynę, cefoperazon, cefquinom, ceftiofur, tetracyklinę, erytromycynę oraz linkomycynę.
- 5) analizę molekularnych determinantów lekooporności szczepów *Streptococcus uberis* wywołujących zapalenie wymienia u krów

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Kwalifikacja zwierząt do badania i pobieranie materiału badawczego

3.1.1 Charakterystyka stad

Materiał do badań stanowiły 194 próbki mleka oraz krwi pobrane od krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (HF). Badania w kierunku *mastitis* zostały przeprowadzone łącznie w 28 gospodarstwach zlokalizowanych w województwie kujawsko-pomorskim. Liczebność stad wynosiła 22 – 88 (średnio 44,3) krów mlecznych. Dominował uwiązowy system utrzymywania krów (27 stad), tylko jedno stado było wolnostanowiskowe. W 27 stadach (96,4%) jako materiał ściółkowy wykorzystywano słomę, tylko w 1 stadzie (3,6%) stosowano piasek. W 22 stadach krowy żywione były w systemie TMR (ang. *Total Mixed Ration* - pełnoporcjowa, całkowicie wymieszana dawka żywieniowa), zaś w sześciu stadach stosowano PMR (ang. *Partly Mixed Ration* – częściowo wymieszana dawka żywieniowa). Udój krów przeprowadzano dwa razy dziennie w 3 różnych systemach: wysokiej linii (25 stad), 3 kanwy (2 stada) oraz rybiej ości (1 stado). Średnia wydajność mleczna krów wynosiła 8700 kg rocznie. Liczba komórek somatycznych w mleku zbiorczym wahała się od 80 000 do 750 000/ mL mleka (średnio 346 000/mL mleka).

Tab. 1a. Dane dotyczące warunków zoohigienicznych w poszczególnych stadach krów mlecznych

NR stada	Liczba krów	Rodzaj ściółki	Sprzęt udojowy	Ilość dojów/dz	Żywnienie	Zasuszenie SDCT	Szczepienia	Predipping	Postdipping	Czystość krów	LKS zbiornik	Liczba szczepów uberis/ Liczba prób ze stada
I	48	S	WL	2	TMR	nie	nie	tak	tak	3	600	7/19
II	50	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	tak	2	190	1/4
III	64	S	WL	2	TMR	tak	Ubac	nie	tak	2	400	0/7
IV	24	S	3 kany	2	PMR	tak	Startvac	nie	tak	1	250	1/3
V	28	S	WL	2	TMR	tak	Mastibiovac	tak	tak	4	350	1/6
VI	46	S	WL	2	TMR	tak	Ubac	tak	tak	2	80	0/8
VII	46	S	WL	2	TMR	tak	Ubac	nie	nie	1	380	0/5
VIII	26	S	WL	2	PMR	tak	Ubac	nie	tak	1	220	1/4
IX	56	S	WL	2	TMR	tak	Ubac+Startvac	nie	nie	4	320	2/7
X	44	S	WL	2	TMR	tak	Ubac+Startvac	nie	tak	3	600	0/5
XI	44	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	nie	4	440	0/5
XII	36	S	WL	2	PMR	nie	nie	nie	tak	3	380	2/4
XIII	40	S	WL	2	TMR	tak	Ubac	nie	tak	1	260	0/8
XIV	44	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	tak	2	360	0/7
XV	40	S	WL	2	TMR	tak	Startvac	tak	tak	3	750	0/7

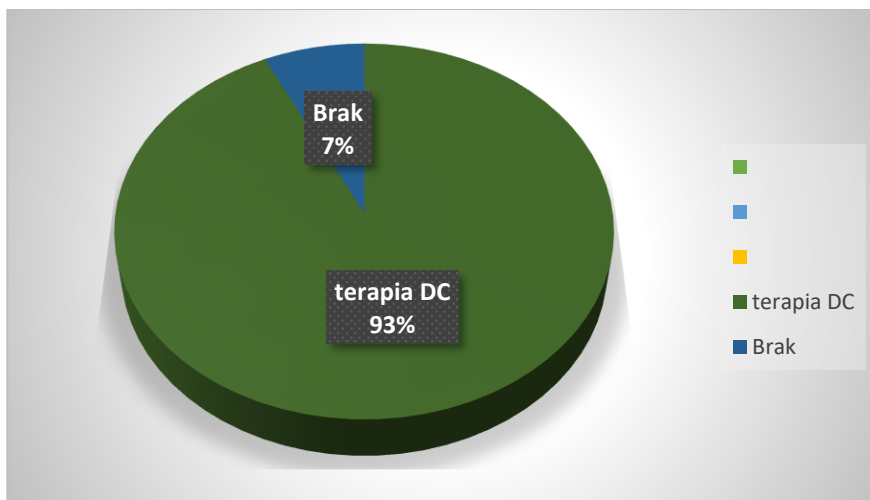
Objaśnienia: SDCT – selektywna terapia antybiotykowa w okresie zasuszenia krowy; Predipping – stosowanie przedudowej dezynfekcji strzyków wymion; Postdipping – stosowanie poudowej dezynfekcji strzyków wymion; LKS – liczba komórek somatycznych; TMR – całkowicie wymieszana dawka żywieniowa; PMR – częściowo wymieszana dawka żywieniowa; TOK- terenowy odczyn komórkowy; WL -system udojowy „wysoka linia”

Tab. 1b. Dane dotyczące warunków zoohigienicznych w poszczególnych stadach krów mlecznych

Nr stada	Liczba krów	Rodzaj ściąłki	Sprzęt udojowy	Ilość dojów/dz	Żywnienie	Zasuszenie SDCT	Szczepienia	Predipping	Postdipping	Czystość krów	LKS zbiornik	Liczba szczepów S. uberis/ Liczba prób ze stada
XVI	36	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	nie	3	280	0/5
XVII	36	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	tak	1	320	0/6
XVIII	42	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	tak	4	550	2/7
XIX	34	S	WL	2	PMR	tak	Startvac	nie	nie	3	340	1/12
XX	36	S	WL	2	TMR	tak	Startvac	nie	tak	2	190	0/6
XXI	45	S	WL	2	TMR	tak	Startvac	nie	tak	2	320	5/7
XXII	32	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	tak	2	220	0/4
XXIII	78	S	WL	2	TMR	tak	Ubac	nie	nie	3	480	1/7
XXIV	88	P	RO	2	TMR	tak	Startvac	tak	tak	1	180	2/5
XXV	22	S	WL	2	TMR	tak	nie	nie	nie	3	340	1/8
XXVI	86	S	WL	2	TMR	tak	nie	tak	tak	3	360	2/17
XXVII	46	S	WL	2	PMR	tak	Ubac	nie	tak	4	220	1/5
XXVIII	24	S	3 kany	2	PMR	tak	nie	tak	tak	3	300	0/6

Objaśnienia: SDCT – selektywna terapia antybiotykowa w okresie zasuszenia krowy; Predipping – stosowanie przedudowej dezynfekcji strzyków wymion; Postdipping – stosowanie poudowej dezynfekcji strzyków wymion; LKS – liczba komórek somatycznych; TMR – pełnoporcjowa, całkowicie wymieszana dawka żywieniowa; PMR – częściowo wymieszana dawka żywieniowa, TOK- terenowy odczyn komórkowy; WL -system udojowy „wysoka linia”; RO – system udojowy „rybia ość”

Fig.1 Rozkład badanych stad w zależności od stosowania preparatów antybiotykowych o przedłużonym działaniu w czasie zasuszenia krowy (terapia DC)



Objaśnienia: DC – stosowanie antybiotyku o przedłużonym działaniu w czasie zasuszenia krowy

Fig.2 Rozkład badanych stad w zależności od wykonanych szczepień krów przeciw drobnoustrojom wywołującym zapalenie wymienia

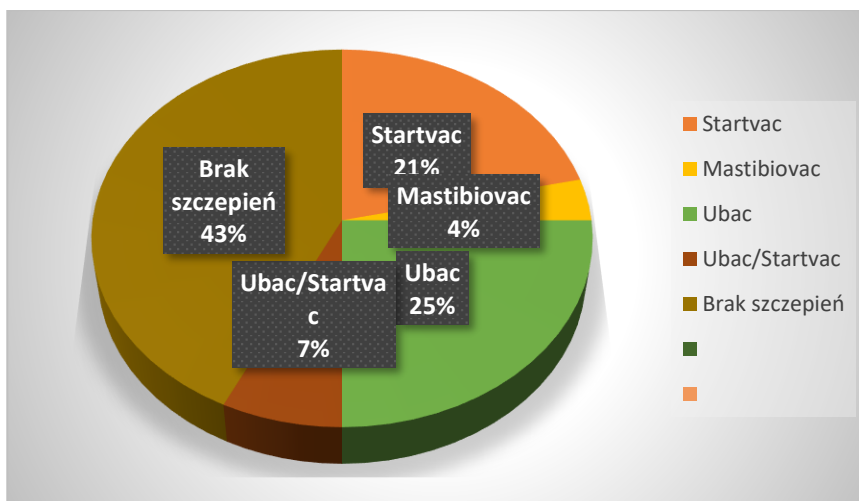
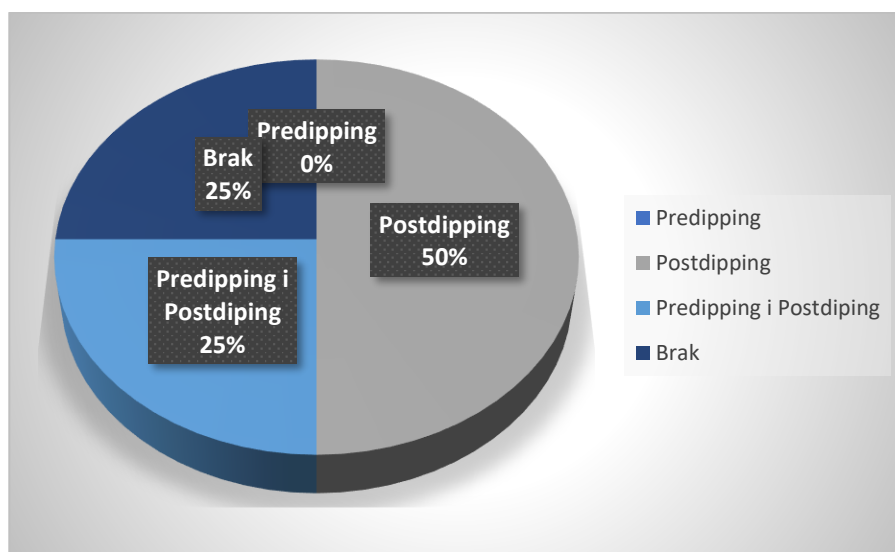


Fig.3 Rozkład badanych stad w zależności od stosowania przed- i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion krów



Objaśnienia: predipping – przedlaktacyjna dezynfekcja strzyków wymion krów; postdipping – poudojowa dezynfekcja strzyków wymion krów

Fig. 4 Rozkład badanych stad w zależności od oceny stopnia czystości krów (I, II, III, IV stopień)

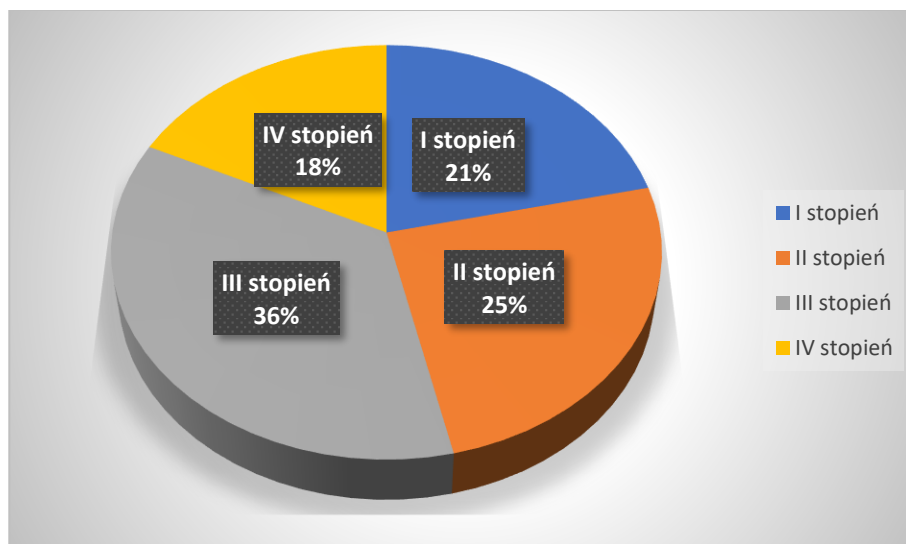
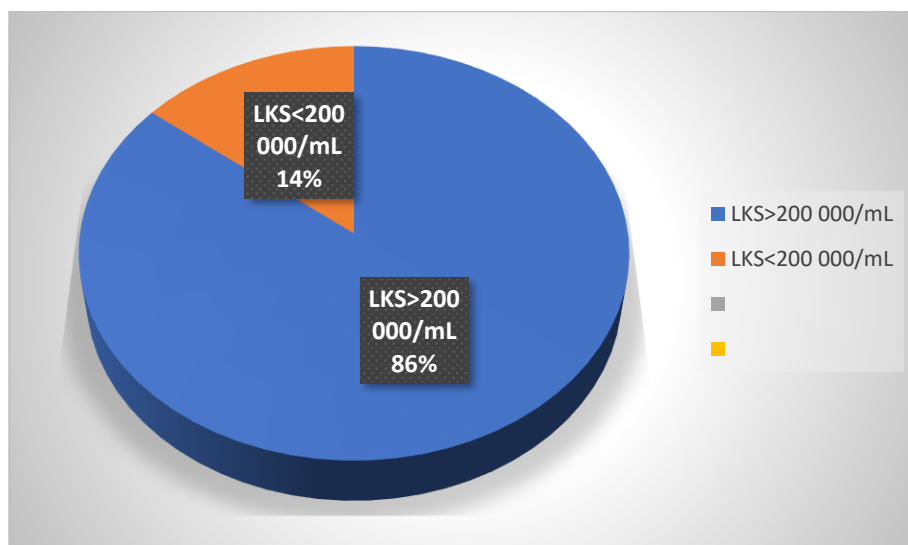


Fig. 5 Rozkład badanych stad w zależności od liczby komórek somatycznych w 1 mL mleka zbiorczego



Objaśnienia: LKS – liczba komórek somatycznych

3.1.2 Ocena makroskopowa mleka oraz wykonanie Terenowego Odczynu Komórkowego (TOK)

Strzyki wymienia zostały dokładnie umyte, wysuszone i zdezynfekowane 70% alkoholem. Pierwsze strugi mleka z każdej ćwiartki wymienia zostały ocenione na płycie typu Schalma koloru białego, ze szczególnym uwzględnieniem barwy, konsystencji i ewentualnych domieszek (krwi, strzępek włókna, kłaczków kazeiny, itp.). W celu wykonania badania TOK użyto odczynnika Mastirapid® (Vetoquinol, Gorzów Wlk., Polska). Wyniki testu zostały ocenione jako ujemne (0), wątpliwe (+/-), słabo dodatnie (+), wyraźnie dodatnie (++), oraz silnie dodatnie (+++) (Quinn i wsp., 2002).

3.1.3 Pobieranie prób do badań laboratoryjnych

Z każdej TOK-dodatniej ćwiartki wymienia zostały pobrane dwie próbki mleka do sterylnych odpowiednio opisanych probówek: 2-4 ml do badania mikrobiologicznego oraz 10 ml w celu oznaczenia poziomu białek ostrej fazy oraz wybranych cytokin. Od krów z dodatnim wynikiem TOK w mleku pobrano także próbkę krwi z żyły szyjnej

zewnętrznej do probówek z aktywatorem krzepnięcia surowicy (Medlab, Polska) w celu analizy poziomu wybranych białek ostrej fazy oraz cytokin.

3.1.4 *Badania kliniczne krów z dodatnim wynikiem badania TOK*

Wszystkie krowy, od których pobrano próbki mleka z TOK-dodatnich ćwiartek wymienia, zostały poddane badaniu lekarsko-weterynaryjnemu. Z dalszego postępowania wykluczono krowy, u których zapaleniu wymienia towarzyszyły inne choroby m.in. metaboliczne, krowy wykazujące objawy rui oraz krowy w zasuszeniu.

3.1.5 *Grupa kontrolna*

W celu porównania wyników badań i wykazania statystycznie istotnych różnic w poziomie parametrów immunologicznych pobrano również próbki mleka i krwi od 10 zdrowych krów. Wybrano krowy, które nie wykazywały żadnych klinicznych objawów *mastitis*, ani nieprawidłowości w wymieniu lub mleku. Status zdrowotny grupy kontrolnej został potwierdzony badaniem klinicznym krów, negatywnym wynikiem badania mikrobiologicznego mleka oraz niskim poziomem LKS w mleku (<100 000 komórek/mL).

3.1.6 *Transport oraz przygotowanie prób do badań laboratoryjnych*

Próbki mleka i krwi dostarczano w temperaturze 4°C do Zakładu Mikrobiologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Jedną próbkę mleka wykorzystano do badania bakteriologicznego, a pozostałe mleko przelano do probówek typu Eppendorf i zamrożono w temperaturze -84°C w celu określenia białka ostrej fazy. Próbki surowicy odwirowywano przy 1000xg przez 20 min, a klarowną surowicę przechowywano w probówkach typu Eppendorf w temperaturze -84°C do czasu wykonania analiz biochemicznych.

3.2 *Badania laboratoryjne prób mleka*

3.2.1 *Hodowla mikrobiologiczna mleka*

Próbki mleka badano bakteriologicznie zgodnie z wytycznymi National Mastitis Council (NMC). Każdą próbkę mleka w objętości 0,01 mL wysiewano na podłoże Columbia agar (Oxoid, Basingstoke, UK) zawierające sterylną odwłóknioną krew baranią. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych.

Skład podłoża Columbia agar w 1 litrze wody destylowanej:

Pepton 23g

skrobia 1.0 g

chlorek sodu 5.0 g

agar-agar 10 g

pH 7.3 +/- 0.2 w temperaturze 25°C

Podłoże sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut. Odwłóknioną krew baranią (50 mL) dodano po schłodzeniu pożywki do temperatury 50°C.

3.2.2 *Wykrywanie katalazy*

Katalaza jest metabolicznym enzymem rozkładającym toksyczny dla bakterii nadtlenek wodoru do wody i tlenu. Próbę wykonuje się poprzez połączenie badanych bakterii pobranych z hodowli na pożywce stałej z kroplą 3% wody utlenionej na szkiełku podstawowym. O wyniku dodatnim świadczy uwalnianie pęcherzyków tlenu. *Streptococcus* spp. daje wynik negatywny.

3.2.3 *Wstępna identyfikacja drobnoustrojów*

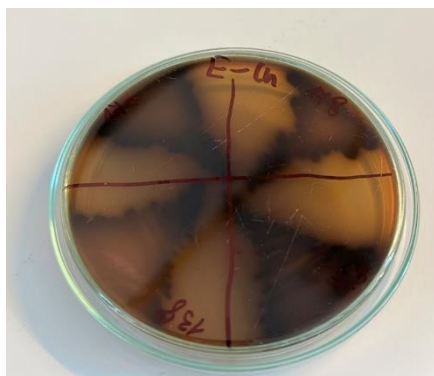
Wyizolowane z próbek mleka drobnoustroje zostały wstępnie zidentyfikowane na podstawie morfologii kolonii, testu katalazy oraz preparatów mikroskopowych barwionych metodą Grama. Drobne, przejrzyste, szare kolonie o gładkiej powierzchni i równym brzegu, które w preparacie mikroskopowym okazały się Gram-dodatnimi

ziarniakami ułożonymi liniowo, nie posiadającymi zdolności wytwarzania katalazy zostały posiane na podłoże Edwardsa w modyfikacji Chodkowskiego. Podczas wzrostu eskulina jest rozkładana do eskuletyny i glukozy. Eskuletyna dyfunduje do pożywki i wiążąc się w kompleks z cytrynianem żelaza powoduje jej zaczernienie.

Podłoże Chodkowskiego-Edwardsa:

eskulina (5% roztwór wodny)	20 mL
fiolet krystaliczny (0.1% roztwór wodny)	2 mL
octan lub siarczan talu (3% roztwór wodny)	10 mL
agar odżywczy	1000 mL
pH 7.5 +/- 0.2 w temperaturze 25°C	

Podłoże sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut. Odwłóknioną krew baranią (50 mL) dodano po schłodzeniu pożywki do temperatury 50°C.



Ryc. 1. Ocena zdolności rozkładu eskuliny na podłożu Chodkowskiego-Edwardsa – zdjęcie własne

S. uberis posiada zdolność rozkładu eskuliny na podłożu Chodkowskiego-Edwardsa efektem czego jest wzrost w postaci ciemno-brązowych/czarnych kolonii i zaczernienie podłoża wokół kolonii.

3.2.4 Posiew próbek mleka na podłoże chromogenne (chromogenic mastitis - CHROMagar™ Mastitis (Paryż, Francja))

Podłoże służy do izolacji i różnicowania patogenów izolowanych z mleka pobranego od krów chorych na zapalenie wymienia.



Ryc. 2. Na podłożu **CHROMagar™ Mastitis** obserwuje się wzrost *S. uberis* w postaci ciemno-niebieskich kolonii z metalicznym połyskiem – zdjęcie własne

3.2.5 Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych drobnoustrojów

Identyfikację gatunkową drobnoustrojów wyizolowanych w czystej kulturze przeprowadzono przy użyciu metod fenotypowych, opartych głównie na ocenie morfologii kolonii bakteryjnych i testach biochemicznych oraz metod molekularnych:

- identyfikacja mikroorganizmów na podstawie ich profilu białkowego z wykorzystaniem spektrometrii masowej MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*)

- reakcja łańcuchowa polimerazy PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tab. 2. Startery oligonukleotydowe i warunki reakcji PCR do amplifikacji specyficznych gatunkowo genów kodujących 16S rRNA *S. uberis*

gen	Sekwencja starterów (5'-3')	Wielkość produktu	Warunki reakcji PCR (Zhang i wsp. 2021)
16S rRNA	CGC ATG ACA ATA GGG TAC A(F) GCC TTT AAC TTC AGA CTT ATC A (R)	445 pz	30× (94°C - 60 s, 58°C - 90 s, 72°C - 90 s)

Oligonukleotydowe startery zostały zsyntetyzowane przez Genomed (Warszawa, Polska).

3.3 Oznaczanie parametrów odpowiedzi immunologicznej w surowicy oraz mleku krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis*

3.3.1 Analiza stężenia amyloidu A w surowicy oraz mleku krów chorych na mastitis wywołane przez *S. uberis*

Oznaczenie poziomu amyloidu A w surowicy (SAA) i mleku (MAA) krów przeprowadzono przy użyciu zestawów enzymatycznych Elisa (USCN Life Science INC., Houston, USA i PhaseTM Milk Amyloid A Assay Kit, Tridelta Development Ltd., Maynooth, Irlandia). Procedurę wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Odczyty absorbancji przeprowadzono na automatycznym czytniku płytek mikrotitracyjnych (ELx800, Biotek Instruments, USA) przy długości fali 450 nm.

3.3.2 Analiza poziomu IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α w surowicy oraz mleku krów chorych na mastitis wywołane przez *S. uberis*

Stężenie cytokin w surowicy krwi oraz mleku oznaczono metodą Elisa przy użyciu zestawów do oznaczania IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β i TNF- α firmy USCN Life Science INC (Houston, USA). Wszystkie procedury zostały przeprowadzone zgodnie z wytycznymi producenta. Odczyty absorbancji przeprowadzono na automatycznym czytniku płytek mikrotitracyjnych (ELx800, Biotek Instruments, USA) przy długości fali 450 nm. Zakres wykrywania IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β i TNF- α dla bydła wynosił odpowiednio (15,6-1000 pg/ml, 15,6-1000 pg/ml, 15,6-1000 pg/ml i 7,8-500 pg/ml). Współczynniki zmienności (CV) dla wszystkich badanych cytokin wynosiły odpowiednio < 12% i < 10%.

3.4. Określenie fenotypowej i genotypowej lekowrażliwości szczepów *S.uberis*

3.4.1 Określenie profilu fenotypowej lekowrażliwości szczepów *S. uberis*

Ocenę lekowrażliwości przeprowadzono dla wszystkich badanych szczepów *S. uberis*. Panel badanych leków obejmował antybiotyki najczęściej stosowane w terapii mastitis u krów: cefaleksynę (30 μ g), cefoperazon (75 μ g), cefquinom (30 μ g),

erytromycynę (15 µg), linkomycynę (15 µg), penicylinę (10 u) i tetracyklinę (30 µg) oraz antybiotyk nie zarejestrowany w UE do leczenia *mastitis*, ale bardzo często wykorzystywany w leczeniu różnych chorób u krów: ceftiofur (30 µg) (Oxoid, Basingstoke, UK). Wrażliwość drobnoustrojów na antybiotyki oceniano metodą krążkowo-dyfuzyjną na agarze Mueller-Hinton z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej oraz 20 mg/l β-NAD zgodnie z wytycznymi EUCAST („Oznaczenie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową opisaną dla *Streptococcus* spp” - 6 Wersja 12.0 (Styczeń 2024) www.eucast.org). Płytki z krążkami pozostawiono w temperaturze pokojowej na 15 minut, a następnie inkubowano w temperaturze 35±1°C w atmosferze 4-6% CO₂ przez 18 ± 2 godziny. Wrażliwość szczepu *S. uberis* oceniano na podstawie pomiaru wielkości strefy zahamowania wzrostu wokół krążka nasączonego określonym antybiotykiem. Ze względu na bardzo ograniczony zakres rekomendacji w aspekcie interpretacji wyników w dziedzinie weterynarii, szczególnie w przypadku antybiotyków stosowanych w leczeniu *mastitis* u krów, oceny wyników w przypadku niektórych antybiotyków dokonano na podstawie dostępnych wytycznych dla ludzi lub gatunków zwierząt innych niż krowy.

W przypadku penicyliny zastosowano wytyczne CLSI M100 (Clinical and Laboratory Standards Institute „Performance standards for antimicrobials susceptibility testing”) 30 rd ed. 2020 rok. Zgodnie z wytycznymi CLSI oraz EUCAST drażliwość na penicylinę jest zgodna z drażliwością na ampicylinę i amoksycylinę („Tabele interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST 2023 pod redakcją prof. dr hab. n. med. Walerii Hryniewicz i dr n. med. Doroty Żabickiej. Dokument zawiera tłumaczenie na język polski zaleceń EUCAST: „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 13.0, valid from 2023-01-01” uzupełnione o informacje zawarte w dokumencie „Stanowisko Zespołu Roboczego ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST w sprawie najczęściej zgłaszanych pytań dotyczących stosowania rekomendacji EUCAST, wersja 6.0, 30 maja 2023”).

W przypadku cefaleksyny i linkomycyny zastosowano rekomendacje zawarte w CFSM (Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, RECOMMANDATIONS VÉTÉRINAIRES 2023).

Dla erytromycyny oraz tetracykliny zastosowano wytyczne CLSI M100 (Clinical and Laboratory Standards Institute „Performance standards for antimicrobials susceptibility testing”) 30 rd ed. 2020 rok.

Dla ceftiofuru oraz cefoperazonu zastosowano wytyczne CLSI document M31-A3 Vol. 28. No 8.2008 „Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals”

Szczep referencyjny *Streptococcus uberis* nr 700407 z kolekcji ATCC został użyty jako szczep kontrolny w badaniu lekowrażliwości szczepów *S. uberis*.

3.4.2 Badania molekularne. Ustalenie genotypowych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność szczepów *Streptococcus uberis* na antybiotyki

3.4.2.1 Izolacja genomowego DNA bakterii oraz określenie obecności genów odpowiedzialnych za oporność szczepów *S. uberis* na antybiotyki

DNA komórek bakteryjnych wyizolowano przy użyciu zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z instrukcją producenta. Dalszy etap badań polegał na sprawdzeniu obecności odpowiednich genów oporności w genomie wyizolowanych szczepów *S. uberis* za pomocą klasycznej metody - łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Sekwencje starterów i warunki reakcji PCR zostały ustalone na podstawie ogólnodostępnej literatury (Zhang i wsp., 2021) (Tab.3). Reakcje przeprowadzono w termocyklerze (TPersonal thermal cyclers - Biometra GmbH, Goettingen, Niemcy).

Tab. 3. Sekwencje starterów dla genów oporności szczepów *Streptococcus uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*

Gen	Grupa antybiotyków	Sekwencja starterów (5-3)	Wielkość produktu (pz) (Zhang i wsp. 2021)
tetO	tetracykliny	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC (F) TCCCACTGTTCCATATCGTCA (R)	519
tetM	tetracykliny	GAACTCGAACAAGAGGAAAGC (F) ATGGAAGCCCAGAAAGGAT (R)	740
tetL	tetracykliny	TGAACGTCTCATTACCTG (F) ACGAAAGCCCACCTAAAA (R)	993
blaZ	antybiotyki β -laktamowe	TTAAAGTCTTACCGAAAGCAG (F) TAAGAGATTTGCCTATGC (R)	377
pbp2	antybiotyki β -laktamowe	GATCCTCTAAATGATTCTCAGGTGG(F) CAATTAGCTTAGCAATAGGTGTTGG (R)	1500
ermB	makrolidy	ATTGGAACAGGTAAAGGGC (F) GAACATCTGTGGTATGGCG (R)	442
mefA	makrolidy	AGTATCATTAACTACTAGTGC (F) TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG (R)	346
aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	aminoglikozydy	GAGCAATAAGGGCATACCAAAAATC (F) CCGTGCATTTGTCTTAAAAA ACTGG (R)	348
aph(2'')-Ib	aminoglikozydy	TATGGATCCATGGTTAACTTGGACGC TGAG (F) ATTAAGCTTCCTGCTAAAAATATAAAC ATCTCTGCT (R)	121
aph(2'')-Id	aminoglikozydy	GG TGGTTTTTACAGGAATGCCATC (F) CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC (R)	642
linB	linkozamidy	CCTACCTATTGTTTGTGGAA (F) ATAACGTTACTCTCCTATTC (R)	926

3.5 Analiza statystyczna

W prezentowanym badaniu porównano poziom amyloidu A oraz cytokin: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β i TNF- α w surowicy i w mleku krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *Streptococcus uberis* oraz krów zdrowych. W badaniu przeprowadzonym za pomocą testu Shapiro-Wilka nie stwierdzono normalności rozkładu wartości cech w poszczególnych grupach, w związku z czym zastosowano test Manna-Whitney'a dla dwóch prób niezależnych. Za próg istotności statystycznej uznano wartość $p < 0,05$. Obliczenia wykonano przy użyciu pakietu statystycznego Statistica 12.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK).

4. WYNIKI BADAŃ

4.1 Ocena epizootyczna występowania *S. uberis* w stadach krów mlecznych znajdujących się w województwie kujawsko-pomorskim

Badania przeprowadzono w 28 stadach zlokalizowanych na terenie województwa kujawsko-pomorskiego o łącznej obsadzie 1241 krów mlecznych. Próbki mleka oraz krwi pobrano od krów, u których stwierdzono dodatni wynik Terenowego Odczynu Komórkowego. Z badania wykluczono krowy, u których występowały choroby metaboliczne i inne choroby towarzyszące *mastitis*, krowy wykazujące objawy rui oraz krowy w zasuszeniu. Ogółem pobrano próbki mleka oraz krwi od 194 krów w celu wykonania badania bakteriologicznego i oceny wrażliwości wyizolowanych drobnoustrojów na antybiotyki oraz oceny natężenia odpowiedzi immunologicznej. Ze 194 próbek mleka wyizolowano 176 szczepów drobnoustrojów, w tym 30 szczepów należących do gatunku *S. uberis* (17,0%). Do izolacji i identyfikacji szczepów *S. uberis* wybrano klasyczny schemat oparty na rutynowym badaniu bakteriologicznym, wykonaniu barwienia preparatów metodą Grama i próby na katalazę, hodowli na podłożu chromogennym przeznaczonym dla patogenów odpowiedzialnych za wywoływanie *mastitis* u krów, hydrolizie eskuliny oraz wzroście w środowisku zawierającym 6,5% NaCl. Identyfikację gatunkową potwierdzono dwoma metodami molekularnymi (spektrometria mas MALDI-TOF oraz łańcuchowa reakcja polimerazy PCR).

4.2 Określenie zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *Streptococcus uberis* a sytuacją zoohigieniczną w hodowli

4.2.1 Analiza zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stosowaniem antybiotyków DC (dry cow) w okresie zasuszenia w danym stadzie

W 26 stadach (92,9%) o łącznej obsadzie 1157 krów stosowano selektywnie antybiotyki o przedłużonym działaniu (SDCT). Łącznie do badania bakteriologicznego w tych stadach pobrano 171 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 21/30 szczepów *S. uberis* (70,0%). W pozostałych dwóch stadach (7,1%) o łącznej obsadzie 84 krów nie stosowano terapii DC. Do badania bakteriologicznego pobrano 23 TOK-dodatnie próbki mleka, z których wyizolowano 9/30 szczepów *S. uberis* (30,0%). Należy podkreślić, iż w jednym z dwóch stad, w którym nie stosowano antybiotyków DC, o

łącznej obsadzie 48 krów pobrano 19 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano aż 7/30 szczepów *S. uberis* (33,3% wszystkich wyizolowanych szczepów *S. uberis*). Tab. 4.

Tab. 4. Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stosowaniem antybiotyków DC (*dry cow*) w okresie zasuszenia w danym stadzie

	Terapia DC	Brak terapii DC
Liczba stad	26 (92,9%)	2 (7,1%)
Obsada łączna	1157 krów	84 krów
Ilość szczepów <i>S. uberis</i>	21/30 (70,0%)	9/30 (30,0%)
Liczba krów na które przypada 1 szczep <i>S. uberis</i>	55,1	9,3

Objaśnienia: DC – antybiotyki o przedłużonym działaniu typu DC (*dry cow*) stosowane w okresie zasuszenia krowy

4.2.2 Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stosowaniem szczepień krów przeciw drobnoustrojom powodującym mastitis w danym stadzie

Szczepienia przeciwko drobnoustrojom wywołującym zapalenie wymienia stosowano w 16 stadach (57,1%) o łącznej obsadzie 741 krów.

W 7 stadach o łącznej obsadzie 346 krów stosowano preparat szczepionkowy Ubac, którego substancją czynną jest kwas lipotejchojowy (LTA) z komponentu wiążącego biofilm (BAC) bakterii *S. uberis*. Do badania bakteriologicznego z tych stad pobrano łącznie 44 TOK-dodatnie próbki mleka, z których wyizolowano 3/30 szczepy *S.uberis* (10,0%). Należy podkreślić, iż w czterech stadach stosujących szczepienia krów przy użyciu Ubac nie wyizolowano żadnego szczepu *S. uberis* z 28 pobranych próbek mleka, natomiast w pozostałych trzech stadach wyizolowano zaledwie 3 szczepy *S.uberis* z 16 próbek mleka pobranych z TOK-dodatnich ćwiartek wymienia.

Preparat Startvac, którego substancjami czynnymi są: inaktywowany szczep *Escherichia coli* J5, inaktywowany szczep SP 140 *Staphylococcus aureus* (CP8, wyrażony w Slime Associated Antigenic Complex) stosowano w 6 stadach o łącznej obsadzie 267 krów. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 40 próbek mleka z TOK-dodatnich ćwiartek wymienia, z których wyizolowano 9/30 szczepów *S. uberis* (30,0%).

W 2 stadach o łącznej obsadzie 100 krów stosowano dwa preparaty: Ubac oraz Startvac. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 12 próbek mleka z TOK-dodatnich ćwiartek wymienia, z których wyizolowano 2/30 szczepy *S. uberis* (6,7%).

W jednym stadzie o obsadzie 28 krów stosowano preparat Mastibiovac, którego substancjami czynnymi są inaktywowane szczepy bakteryjne: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli* (szczep Bov-10, szczep Bov-14, szczep Bov-15, szczep Suis-21 oraz szczep J5). Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 6 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 1/30 szczep *S. uberis* (3,3%).

W 12 stadach (42,9%) o łącznej obsadzie 500 krów nie stosowano żadnych szczepień przeciw drobnoustrojom odpowiedzialnym za zapalenie wymienia. Do badania bakteriologicznego pobrano z tych stad 92 TOK-dodatnie próbki mleka, z których wyizolowano 15/30 szczepów *S. uberis* (50,0%). Tab. 5.

Tab. 5. Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stosowaniem szczepień krów przeciw drobnoustrojom powodującym mastitis w danym stadzie

	Rodzaj preparatu szczepionkowego					
	U	S	U+S	M	Stada szczepione	Stada nieszczepione
Liczba stad	7 (25,0%)	6 (21,4%)	2 (7,1%)	1 (3,6%)	16 (57,1%)	12 (42,9%)
Obsada łączna	346 krów	267 krów	100 krów	28 krów	741 krów	500 krów
Liczba szczepów <i>S. uberis</i>	3 (10,0%)	9 (30,0%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	15/30 (50,0%)	15/30 (50,0%)
Liczba krów na które przypada 1 szczep <i>S. uberis</i>	115,3	29,7	50	28	49,4	33,3

Objaśnienie skrótów: U -Ubac, S-Startvac, U+S -Ubac + Startvac, M - Mastibiovac

4.2.3 Analiza zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stosowaniem przed- i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion krów w danym stadzie

W 7 stadach (25,0%) o łącznej obsadzie 316 krów nie stosowano ani przedudojowej ani poudojowej dezynfekcji strzyków. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 49 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 5/30 szczepów *S. uberis* (16,7%).

W 7 stadach (25,0%) o łącznej obsadzie 360 krów stosowano zarówno dezynfekcję przed jak i poudojową strzyków. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 68 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 12/30 szczepów *S. uberis* (40,0%).

W 14 stadach (50,0%) o łącznej obsadzie 565 krów stosowano tylko poudojową dezynfekcję strzyków. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 77 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 13/30 szczepów *S. uberis* (43,3%).

W żadnym ze stad nie stosowano predippingu jako jedynej formy dezynfekcji strzyków wymion u krów. Tab. 6.

Tab. 6. Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stosowaniem przed- i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion krów w danym stadzie

	Przed- i poudojowa dezynfekcja strzyków wymion krów			
	Wyłącznie pre-dipping	Wyłącznie post - dipping	Stosowanie pre i post - dippingu	Brak pre i post - dippingu
Liczba stad	0	14 (50,0%)	7 (25,0%)	7 (25,0%)
Obsada łączna	0	565 krów	360 krów	316 krów
Ilość szczepów <i>S. uberis</i>	0	13/30 (43,3%)	12/30(40,0%)	5/30(16,7%)
Liczba krów na które przypada 1 szczep <i>S. uberis</i>	0	43,5	30	63,2

Objaśnienia: predipping – przedpoudojowa dezynfekcja strzyków wymion; postdipping – poudojowa dezynfekcja strzyków wymion krów

4.2.4 Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stopniem czystości krów w danym stadzie

I stopień czystości krów stwierdzono w 6 stadach (21,4%) o łącznej obsadzie 260 krów. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 31 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 4/30 szczepy *S. uberis* (13,3%).

II stopień czystości krów stwierdzono w 7 stadach (25,0%) o łącznej obsadzie 317 krów. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 43 TOK-dodatnie próbki mleka, z których wyizolowano 6/30 szczepów *S. uberis* (20,0%).

III stopień czystości krów stwierdzono w 10 stadach (35,7%) o łącznej obsadzie 448 krów. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 90 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 14/30 szczepów *S. uberis* (46,7%).

IV stopień czystości krów stwierdzono w 5 stadach (17,9%) o łącznej obsadzie 216 krów. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 30 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 6/30 szczepów *S. uberis* (20,0%). Tab.7.

Tab. 7. Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a stopniem czystości krów w danym stadzie

	Stopień czystości krów			
	I	II	III	IV
Liczba stad	6 (21,4%)	7 (25,0%)	10 (35,7%)	5 (17,9%)
Obsada łączna	260 krów	317 krów	448 krów	216 krów
Ilość szczepów <i>S. uberis</i>	4/30 (13,3%)	6/30 (20,0%)	14/30 (46,7%)	6/30 (20,0%)
Liczba krów na które przypada 1 szczep <i>S. uberis</i>	65	52,8	32	36

4.2.5 Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a liczbą komórek somatycznych w mleku zbiorczym

Przyjętą umowną granicą zdrowego i chorego gruczołu mlekowego u krów jest wartość 200 000 /mL mleka. W przypadku badanych stad tylko 4 stada (14,3%) o łącznej obsadzie 220 krów miały LKS równą lub poniżej tej wartości. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 23 TOK-dodatnie próbki mleka, z których wyizolowano 3/30 szczepy *S. uberis* (10,0%). Niestety w zdecydowanej większości stad 24 (85,7%) o łącznej obsadzie 1021 krów LKS wynosiła powyżej 200 000/mL mleka. Do badania bakteriologicznego pobrano łącznie 171 TOK-dodatnich próbek mleka, z których wyizolowano 27/30 szczepów *S. uberis* (90,0%). Tab. 8.

Tab. 8. Ocena zależności pomiędzy odsetkiem wyizolowanych szczepów *S. uberis* a liczbą komórek somatycznych w 1 mL mleka zbiorczego

	LKS w 1 mL mleka zbiorczego	
	≤200 000/mL	>200 000/mL
Liczba stad	4 (14,3%)	24 (85,7%)
Obsada łączna	220 krów	1021 krów
Ilość szczepów <i>S. uberis</i>	3/30 (10,0%)	27/30 (90,0%)
Liczba krów na które przypada 1 szczep <i>S. uberis</i>	73,3	37,8

4.3 Ocena natężenia odpowiedzi immunologicznej u krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *Streptococcus uberis* w oparciu o określenie poziomu białka ostrej fazy: serum amyloid A oraz cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β oraz TNF- α w mleku oraz surowicy krów

4.3.1 Ocena stężenia amyloidu A w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez *S. uberis* i zdrowych krów

Badania wykazały znacząco wyższe stężenie amyloidu A w mleku krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis* w porównaniu do mleka krów zdrowych (2817,5 ng/mL i 318,25 ng/mL, $P < 0,001$). Nie zanotowano natomiast istotnej różnicy poziomu tej cytokiny w surowicy obu badanych grup krów (1810,0 ng/mL i 2445,0 ng/mL, $P > 0,05$). W grupie krów zdrowych, poziom amyloidu A był istotnie wyższy w surowicy w porównaniu do mleka (2445,0 ng/mL i 318,25 ng/mL, $P < 0,001$), podczas gdy w grupie krów chorych stężenie amyloidu A w surowicy i w mleku nie różniło się w znaczącym stopniu (1810,0 ng/mL i 2817,5 ng/mL, $P > 0,05$). Tab.9.

Tab. 9. Stężenie amyloidu A w mleku (MAA) i surowicy (SAA) krów chorych na mastitis wywołane przez *Streptococcus uberis* (S.ub.) oraz zdrowych krów (ZDR)

Symbol	Próbki	N	SERUM AMYLOID A (ng/mL)		
			Mediana	Min	Max
A	MLEKO S.ub.	30	2817,5 ^B	41,6	11347,9
B	MLEKO ZDR.	10	318,3 ^{A,D}	79,0	406,0
C	SUROWICA S.ub.	30	1810,0	880,0	3240,0
D	SUROWICA ZDR.	10	2445,0 ^B	1410,0	2940,0

Dane przedstawiono jako wartości mediany, minimalne (Min) i maksymalne (Max). N – liczba próbek. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Manna-Whitneya ($P < 0,05$) w odniesieniu do poszczególnych grup oznaczonych symbolami A-D.

4.3.2 Ocena stężenia IL-1 β w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez *Streptococcus uberis* i krów zdrowych

Poziom IL-1 β w surowicy i mleku zdrowych krów wahał się odpowiednio w zakresie 53,3 – 186,6 pg/ml z medianą 126,0 pg/ml oraz 25,5 – 112,4 pg/ml z medianą 63,0 pg/ml. Badania wykazały, że stężenie IL-1 β było istotnie wyższe w mleku zaś niższe w surowicy krów chorych na *mastitis* w porównaniu do krów zdrowych (odpowiednio: 220,7 pg/mL vs 63,0 pg/mL, $p < 0,001$ oraz 29,3 pg/mL vs 126,0 pg/mL, $p < 0,001$). Stwierdzono także odwrotną korelację poziomu tej cytokiny w surowicy w stosunku do mleka w obydwu grupach krów. Stężenie IL-1 β w mleku w porównaniu do surowicy było znacząco niższe w grupie krów zdrowych zaś wyższe w grupie krów chorych na zapalenie wymienia (odpowiednio: 63,0 pg/mL vs 126,0 pg/mL, $p < 0,05$ oraz 220,7 vs 29,3 pg/mL, $p < 0,001$). Tab. 10.

Tab. 10. Stężenie Interleukiny-1 β (IL-1 β) w mleku i surowicy krów chorych na mastitis wywołane przez *Streptococcus uberis* (S. ub.) oraz zdrowych krów (ZDR)

Symbol	Próbki	N	IL-1 β (pg/mL)		
			Mediana	Min	Max
A	MLEKO S.ub.	30	220,7 ^{B,C}	131,3	376,3
B	MLEKO ZDR.	10	63,0 ^{A,D}	25,5	112,4
C	SUROWICA S.ub.	30	29,3 ^{A,D}	7,3	117,7
D	SUROWICA ZDR.	10	126,0 ^{B,C}	53,3	186,6

Dane przedstawiono jako wartości mediany, minimalne (Min) i maksymalne (Max). N – liczba próbek. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Manna-Whitneya ($P < 0,05$) w odniesieniu do poszczególnych grup oznaczonych symbolami A-D.

4.3.3 Ocena stężenia IL-6 w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez *Streptococcus uberis* i krów zdrowych

Poziom IL-6 w mleku zdrowych krów wahał się od 6,0 do 113,1 pg/mL (mediana 30,2 pg/mL) i był znacząco niższy w porównaniu do mleka krów chorych na *mastitis* wywołane przez *S. uberis* (119,5 pg/mL, $p < 0,05$). Natomiast stężenie tej cytokiny w surowicy zdrowych krów mieściło się w zakresie 74,1 – 143,8 pg/mL i było zdecydowanie wyższe w porównaniu do surowicy krów chorych (96,8 pg/mL vs 21,6

pg/mL; $p < 0,001$). Zarówno w grupie krów chorych jak i w grupie kontrolnej stwierdzono także istotną różnicę poziomu IL-6 pomiędzy surowicą a mlekiem (21,6 pg/mL vs 119,5 pg/mL, $p < 0,001$; 96,8 pg/mL vs 30,2 pg/mL; $p < 0,01$).

Tab. 11. Stężenie Interleukiny-6 (IL-6) w mleku i surowicy krów chorych na *mastitis* wywołane przez *Streptococcus uberis* (S. ub.) oraz zdrowych krów (ZDR)

Symbol	Próbki	N	IL-6 (pg/mL)		
			Mediana	Min	Max
A	MLEKO S.ub.	30	119,5 ^{B,C}	33,8	287,1
B	MLEKO ZDR.	10	30,2 ^{A,D}	6,0	113,1
C	SUROWICA S.ub.	30	21,6 ^{A,D}	15,8	39,2
D	SUROWICA ZDR.	10	96,8 ^{B,C}	74,1	143,8

Dane przedstawiono jako wartości mediany, minimalne (Min) i maksymalne (Max). N – liczba próbek. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Manna-Whitneya ($P < 0,05$) w odniesieniu do poszczególnych grup oznaczonych symbolami A-D.

4.4.4 Ocena stężenia IL-8 w mleku i surowicy krów z *mastitis* wywołanym przez *Streptococcus uberis* i krów zdrowych

Poziom IL-8 w surowicy i mleku zdrowych krów wahał się odpowiednio w zakresie 103,8 – 969,5 pg/mL z medianą 253,4 pg/mL oraz 69,7 – 254,7 pg/mL z medianą 132,0 pg/mL. Badania wykazały zdecydowanie wyższe stężenie tej cytokiny w mleku krów chorych w porównaniu do mleka krów zdrowych (275,2 pg/mL vs 132,0 pg/mL, $p < 0,01$), natomiast nie stwierdzono istotnej różnicy poziomu IL-8 w surowicy obydwu grup (237,6 pg/mL vs 253,4 pg/mL, $p > 0,05$). Należy podkreślić, iż stężenie IL-8 w surowicy i mleku krów chorych na *mastitis* kształtowało się niemalże na tym samym poziomie (237,6 pg/mL vs 275,2 pg/mL, $p > 0,05$). Również w grupie krów zdrowych nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w stężeniu IL-8 w surowicy i mleku pomimo zróżnicowanej wartości mediany (253,4 vs 132,0 pg/mL, $p > 0,05$). Tab. 12.

Tab. 12. Stężenie Interleukiny-8 (IL-8) w mleku i surowicy krów chorych na *mastitis* wywołane przez *Streptococcus uberis* (S. ub.) oraz zdrowych krów (ZDR)

Symbol	Próbki	N	IL-8 (pg/mL)		
			Mediana	Min	Max
A	MLEKO S.ub.	30	275,2 ^B	130,8	364,8
B	MLEKO ZDR.	10	132,0 ^A	69,7	254,7
C	SUROWICA S.ub.	30	237,6	36,5	858,4
D	SUROWICA ZDR.	10	253,4	103,8	969,5

Dane przedstawiono jako wartości mediany, minimalne (Min) i maksymalne (Max). N – liczba próbek. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Manna-Whitneya ($P < 0,05$) w odniesieniu do poszczególnych grup oznaczonych symbolami A-D.

4.4.5 Ocena stężenia IL-12 β w mleku i surowicy krów z *mastitis* wywołanym przez *Streptococcus uberis* i krów zdrowych

Poziom IL-12 β w mleku zdrowych krów wahał się w zakresie 75,4 – 288,8 pg/mL z medianą 194,5 pg/mL i był zdecydowanie niższy w porównaniu do mleka chorych krów (743,1 pg/mL, $p < 0,001$). Różnicę statystycznie istotną zanotowano także w stężeniu tej cytokiny w surowicy obydwu badanych grup krów (212,7 pg/mL vs 62,9 pg/mL, $p < 0,01$). Ponadto stwierdzono, że koncentracja IL-12 β w surowicy krów chorych była wielokrotnie niższa w porównaniu do ich mleka (62,9 pg/mL vs 743,1 pg/mL, $p < 0,001$), podczas gdy w grupie kontrolnej wartości te były zbliżone (212,7 pg/mL vs 194,5 pg/mL, $p > 0,05$). Tab. 13.

Tab. 13. Stężenie Interleukiny-12 β (IL-12 β) w mleku i surowicy krów chorych na *mastitis* wywołane przez *Streptococcus uberis* (S. ub.) oraz zdrowych krów (ZDR)

Symbol	Próbki	N	IL-12 β (pg/mL)		
			Mediana	Min	Max
A	MLEKO S.ub.	30	743,1 ^{B,C}	198,4	2314,0
B	MLEKO ZDR.	10	194,5 ^A	75,4	288,8
C	SUROWICA S.ub.	30	62,9 ^{A,D}	9,5	240,4
D	SUROWICA ZDR.	10	212,7 ^C	96,9	572,9

Dane przedstawiono jako wartości mediany, minimalne (Min) i maksymalne (Max). N – liczba próbek. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Manna-Whitneya ($P < 0,05$) w odniesieniu do poszczególnych grup oznaczonych symbolami A-D.

4.4.6 Ocena stężenia TNF α w mleku i surowicy krów z mastitis wywołanym przez *Streptococcus uberis* i krów zdrowych

Poziom TNF- α w mleku zdrowych krów mieścił się w zakresie 16,6 – 164,2 pg/mL z medianą 85,6 pg/mL i był zdecydowanie niższy w porównaniu do surowicy tych krów (151,4 pg/mL, $p < 0,05$). Odwrotną korelację stwierdzono w przypadku stężenia TNF- α w mleku krów chorych, które okazało się zdecydowanie wyższe niż w surowicy tych krów (355,9 pg/mL vs 71,8 pg/mL; $p < 0,001$) oraz znacząco wyższe w porównaniu do mleka grupy kontrolnej (355,9 pg/mL vs 85,6 pg/mL, $p < 0,001$). Statystycznie istotną różnicę stwierdzono także pomiędzy stężeniem TNF- α w surowicy obydwu badanych grup krów (151,4 vs 71,8 pg/mL, $p < 0,05$). Tab. 14.

Tab. 14. Stężenie TNF- α (TNF- α) w mleku i surowicy krów chorych na mastitis wywołane przez *Streptococcus uberis* (S. ub.) oraz zdrowych krów (ZDR)

Symbol	Próbki	N	TNF- α (pg/mL)		
			Mediana	Min	Max
A	MLEKO S.ub.	30	355,9 ^{B,C}	44,4	502,2
B	MLEKO ZDR.	10	85,6 ^{A,D}	16,6	164,2
C	SUROWICA S.ub.	30	71,8 ^{A,D}	17,1	200,4
D	SUROWICA ZDR.	10	151,4 ^{B,C}	68,7	305,3

Dane przedstawiono jako wartości mediany, minimalne (Min) i maksymalne (Max). N – liczba próbek. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Manna-Whitneya ($P < 0,05$) w odniesieniu do poszczególnych grup oznaczonych symbolami A-D.

4.5 Ocena lekowrażliwości szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia

Wyniki badań wykazały wielolekooporność w przypadku 10 szczepów *S. uberis* (33,3%), które były odporne na co najmniej trzy antybiotyki. Sześć szczepów (20,0%) było opornych na dwa antybiotyki zaś osiem szczepów (26,7%) - tylko na jeden antybiotyk. Największy poziom oporności wśród szczepów *S. uberis* stwierdzono w przypadku tetracykliny (16 szczepów – 53,3%), linkomycyny (16 szczepów – 53,3%) oraz erytromycyny (14 szczepów – 46,7%). Sześć szczepów *S. uberis* (20,0%) było wrażliwych lub średniowrażliwych na wszystkie antybiotyki. Największą aktywność *in vitro* wykazały cefoperazon i cefquinom (100%), cefaleksyna (93,3%), penicylina (90,0%) oraz ceftiofur (86,7%, wrażliwych/średniowrażliwych szczepów).

Stwierdzono 21 różnych profili lekowrażliwości na wybrane do badania antybiotyki. Najczęściej powtarzającym się wzorem była jednoczesna oporność szczepów *S. uberis* na tetracyklinę, erytromycynę i linkomycynę z wrażliwością na pozostałe badane antybiotyki (6 szczepów – 20,0%). Kolejne profile obejmowały szczepy odporne tylko na jeden antybiotyk: tetracyklinę (4 szczepy – 13,3%), linkomycynę (3 szczepy – 10,0%) i erytromycynę (1 szczep – 3,3%) oraz szczepy odporne na 2 antybiotyki: linkomycynę i erytromycynę (2 szczepy – 6,7%), erytromycynę i tetracyklinę (1 szczep – 3,3%) oraz tetracyklinę i linkomycynę (1 szczep – 3,3%). Pozostałe szczepy wykazały zmienną oporność na antybiotyki należące do różnych grup. Należy przy tym podkreślić, iż nie stwierdzono szczepu opornego wyłącznie na antybiotyki β -laktamowe. Tab. 15.

Tab. 15. Profile lekowrażliwości fenotypowej szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*

Antybiotyki wybrane do badania										
L.p (Nr szczepu)	Nr stada	P	CL	CFP	EFT	CEQ	T	ER	L	Profil
1 (9)	I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1
2 (11)	I	+++	++	++	op	++	op	+++	++	2
3 (14)	I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1
4 (15)	I	+++	++	++	++	++	op	++	++	3
5 (16)	I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	op	4
6 (17)	I	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	op	5
7 (19)	I	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	op	5
8 (22)	II	op	op	++	++	++	op	op	op	6
9 (33)	IV	+++	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	7
10 (39)	V	+++	++	++	++	+++	++	op	op	8
11 (56)	VIII	+++	++	++	++	+++	+++	++	+++	9
12 (61)	IX	op	++	++	op	++	+++	op	op	10
13 (63)	IX	+++	++	+++	op	+++	op	op	++	11
14 (74)	XII	+++	+++	+++	+++	+++	++	op	++	12
15 (75)	XII	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	op	5
16 (114)	XVIII	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	op	13
17 (115)	XVIII	op	op	+++	+++	+++	op	op	op	14
18 (126)	XIX	+++	+++	++	op	+++	++	++	op	15
19 (136)	XXI	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	op	5
20 (137)	XXI	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	op	5
21 (138)	XXI	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	op	5
22 (140)	XXI	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	16
23 (142)	XXI	+++	+++	+++	++	+++	op	++	++	17
24 (152)	XXIII	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	18
25 (157)	XXIV	+++	+++	+++	+++	+++	op	+++	+++	19
26 (158)	XXIV	+++	+++	+++	+++	+++	op	+++	+++	19
27 (166)	XXV	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	op	4
28 (177)	XXVI	+++	+++	+++	+++	+++	op	op	++	20
29 (178)	XXVI	+++	+++	+++	+++	+++	op	+++	op	21
30 (184)	XXVII	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1

Objaśnienia: P - penicylina; CL – cefaleksyna; CFP – cefoperazon; EFT - ceftiofur; CEQ – cefquinom; T – tetracyklina; ER – erytromycyna; L - linkomycyna

4.6 Genetyczne uwarunkowanie oporności szczepów *S.uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis na wybrane antybiotyki

W przypadku 20 szczepów *S. uberis* (66,7%) wykryto co najmniej 1 gen oporności. Łącznie stwierdzono obecność 36 genów, w tym u 8 szczepów (26,7%) występował tylko 1 gen, u 9 szczepów (30,0%) – 2 geny, u 2 szczepów (6,7%) – 3 geny oraz u 1 szczepu (3,3%) – 4 geny oporności. W przypadku 10 szczepów (33,3%) nie stwierdzono występowania żadnego genu oporności pomimo tego, iż u ośmiu z nich stwierdzono fenotypową oporność na różne grupy antybiotyków. Profile lekowrażliwości fenotypowej były tożsame z determinantami oporności genetycznej jedynie w przypadku dwóch szczepów wrażliwych/średniowrażliwych na wszystkie badane antybiotyki, u których nie stwierdzono obecności żadnych genów.

W przeprowadzonym badaniu najczęściej występowały geny *tet* odpowiedzialne za oporność na tetracykliny: 12 genów *tetL*, 10 genów *tetM* oraz 3 geny *tetO*. W dalszej kolejności stwierdzono obecność genów kodujących oporność na: makrolidy - 4 geny *ermB*, linkozamidy – 4 geny *linB*, antybiotyki β -laktamowe – 2 geny *blaZ* oraz aminoglikozydy – 1 gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. W przypadku 4 szczepów *S. uberis* fenotypowo wrażliwych/średniowrażliwych na wszystkie badane antybiotyki stwierdzono obecność 7 genów kodujących oporność na: tetracykliny (2 geny *tetM* i 2 geny *tetL*), makrolidy (1 gen *ermB*) oraz linkozamidy (2 geny *linB*).

Dwanaście szczepów fenotypowo opornych na tetracykliny posiadało co najmniej 1 lub 2 geny *tet* (łącznie 18 genów, w tym: 9 genów *tetL*, 7 genów *tetM* oraz 2 geny *tetO*). Obecność genów *tet* stwierdzono także w przypadku 6 szczepów *S. uberis* fenotypowo wrażliwych na tetracykliny. Z kolei gen *ermB* wykryto u każdego z 3 szczepów fenotypowo opornych oraz 1 szczepu wrażliwego na erytromycynę. Podobnie w przypadku linkomycyny: obecność genu *linB* stwierdzono u 2 szczepów fenotypowo opornych oraz 2 szczepów wrażliwych na ten antybiotyk. Ponadto należy podkreślić, że jedenaście szczepów *S. uberis* było jednocześnie opornych na erytromycynę i linkomycynę co może świadczyć o krzyżowej oporności makrolidów i linkozamidów. Kolejnych jedenaście szczepów *S. uberis* było natomiast wrażliwych/średniowrażliwych zarówno na erytromycynę jak i linkomycynę. Gen *blaZ* stwierdzono u 2 badanych szczepów, chociaż tylko jeden z nich wykazał fenotypową oporność na penicylinę.

Tab. 16. Profile oporności genotypowej szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*

L.p.	Nr szczepu	Nr stada	Gen	Profil
1.	9	I	<i>tetM, linB</i>	1
2.	14	I	<i>tetL, ermB</i>	2
3.	15	I	<i>tetL, tetM</i>	3
4.	16	I	<i>blaZ</i>	4
5.	17	I	<i>tetL, tetM, ermB, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	5
6.	19	I	<i>tetL, tetM, linB</i>	6
7.	22	II	<i>tetM</i>	7
8.	33	IV	<i>tetL, tetO</i>	8
9.	63	IX	<i>tetO, ermB</i>	9
10.	74	XII	<i>tetL, ermB</i>	2
11.	75	XII	<i>tetM</i>	7
12.	115	XVIII	<i>tetL, blaZ</i>	10
13.	137	XXI	<i>tetL</i>	11
14.	140	XXI	<i>tetL</i>	11
15.	152	XXIII	<i>tetM, linB</i>	1
16.	157	XXIV	<i>tetL</i>	11
17.	158	XXIV	<i>tetL, tetO</i>	8
18.	166	XXV	<i>tetM</i>	7
19.	177	XXVI	<i>tetM</i>	7
20.	178	XXVI	<i>tetL, tetM, linB</i>	6

5. DYSKUSJA

Zapalenie wymienia nadal pozostaje znaczącym problemem w stadach krów mlecznych, który generuje ogromne straty w okresie laktacji (zmniejszona wydajność w produkcji mleka i niższa jego jakość, wysokie koszty leczenia, niejednokrotnie konieczność wymiany chorych zwierząt w stadzie (Abd El-Aziz i wsp., 2021; Bar i wsp., 2008; Bochniarz i wsp., 2023; Halasa i wsp., 2007; Harjanti i wsp., 2020; Hogeveen i wsp., 2011; Huijps i wsp., 2008; Kibebew i wsp., 2017; Palanivel i wsp., 2008; Pascu i wsp., 2022; Seegers i wsp., 2003).

Przez wiele lat *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae* były opisywane jako główna przyczyna *mastitis* u krów (Carlton i McGavin, 1995; Keefe, 2012). Obecne badania wskazują jednak, że częstość występowania tych dwóch patogenów w zakażeniach wymienia jest zdecydowanie niższa, co wynika najprawdopodobniej z postępu higieny w produkcji mleka i terapii krów zasuszonych. Należy podkreślić, iż wdrożenie środków przeciwdziałających *mastitis* okazało się skuteczne głównie w eliminacji zakaźnych patogenów, nie przyniosło natomiast oczekiwanego rezultatu w przypadku drobnoustrojów środowiskowych, takich jak *S. uberis* (Cheng i Han, 2020; Hillerton i wsp., 2003; Krömker i wsp., 2014). Przyczyny tego zjawiska można upatrywać w powszechnym występowaniu bakterii w otoczeniu krów co sprawia, że kanał strzykowy gruczołu mlekowego jest stale narażony na kontakt z tymi patogenami (Sherwin i Breen, 2022). Aktualnie dostępne wyniki badań wskazują, że najczęściej rozpoznawanym czynnikiem etiologicznym *mastitis* w wielu krajach Europy i świata jest *S. uberis* (Abd El-Aziz i wsp., 2021; Kabelitz i wsp., 2021; Tomazi i wsp., 2019; Vezina i wsp., 2021). W badaniach własnych szczepy *S. uberis* stanowiły 17,0% wszystkich wyizolowanych drobnoustrojów z mleka krów chorych na *mastitis* w 28 stadach. Wskaźnik zakażeń *S. uberis* u krów mlecznych w badaniach innych autorów osiągał różne wartości w zakresie od 6,3% (9,3%; 11,8%; 20,59%; 23,5%; 33,0%), nawet do 55,4% (Abd El-Aziz i wsp., 2021; Bradley i wsp. 2007). Należy podkreślić, iż zakażenia wymienia tym patogenem występowały niezależnie od sposobu utrzymania zwierząt (zarówno duże stada wolnostanowiskowe, jak i w obory uwiązowe) (Oliver i Pighetti, 2002; Ruegg, 2017; Sherwin i wsp., 2022). Rozbieżne opinie pojawiają się także w kontekście związku pomiędzy występowaniem zakażeń a porą roku, przy czym większość danych wskazuje okres letni i wypasanie zwierząt jako czynniki predysponujące. Z kolei inne badania wykazały, że przebywanie krów stale w oborze, szczególnie przy wysokiej temperaturze

i braku odpowiedniej wentylacji prowadzi do osłabienia odporności organizmu i zwiększonej tendencji do zakażeń wymienia wywoływanych przez *S. uberis* (Oliver i Pighetti, 2002; Ruegg, 2017; Sherwin i wsp., 2022). W badaniach własnych próbki mleka pobierano w okresie letnim (od maja do września) ze stad, w których utrzymywano krowy głównie w systemie wolnostanowiskowym bez dostępu do wybiegu.

Dane z literatury wskazują, że *S. uberis* może być odpowiedzialny zarówno za podkliniczne jak i kliniczne formy *mastitis* przebiegające z wyraźnie widocznymi objawami (Abd El-aziz i wsp., 2021; Bochniarz i wsp., 2020; Cobirka i wsp., 2020; Krömker i wsp., 2014; Malinowski i Gajewski, 2009; Tommasoni i wsp., 2023). Epidemiologia zakażeń wymienia powodowanych przez *S. uberis* nie jest do końca poznana, natomiast liczne badania dowiodły, że jest patogenem wyróżniającym się dużą zmiennością genetyczną oraz wybitną zdolnością przystosowania się do różnych niekorzystnych warunków (Krömker i wsp., 2014; Sherwin i Breen, 2022). Ponadto wykazano wysoki potencjał zakaźny tego patogenu pomimo przynależności do grupy drobnoustrojów środowiskowych. Parametry odpowiedzi immunologicznej wskazują, że miejscowa odpowiedź immunologiczna w wymieniu po zakażeniu *S. uberis* jest znacząca i porównywalna do patogenów zakaźnych takich jak *S. agalactiae* (Bochniarz i wsp., 2020; Bochniarz i wsp., 2022). Günther i wsp. (2016) stwierdzili, że ten drobnoustrój wywołuje silną ekspresję genów kodujących cytokiny i chemokiny, niestety uruchomiony process fagocytozy w tym przypadku jest mało efektywny, ponieważ *S. uberis* posiada zdolność przetrwania wewnątrz makrofagów.

Wyniki badań własnych wskazują, iż u krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis* dochodzi najpierw do miejscowego odczynu zapalnego i reakcji ostrej fazy, której wyznacznikiem jest wzrost poziomu białek ostrej fazy (Berg i wsp., 2011; Murata i wsp., 2004; Petersen i wsp., 2004; Saco i Bassols, 2022). Najważniejszym białkiem w mleku, które może być uznane jako marker zapalenia wymienia u krów jest izoforma 3 surowiczego amyloidu A (McDonald i wsp., 2001). W badaniach własnych stwierdzono blisko 9-krotny wzrost stężenia MAA w mleku krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis* w porównaniu do mleka krów zdrowych. Wyższe stężenie tego białka w mleku przy braku zmian w surowicy chorych krów skutkowało niemalże wyrównaniem wartości MAA i SAA u tych zwierząt. Natomiast w grupie krów zdrowych poziom SAA wynosił 2445,0 ng/mL i okazał się 7,7 razy wyższy niż MAA. W stanie fizjologicznym surowiczy amyloid A jest produkowany głównie w wątrobie i wydzielany do krążenia obwodowego, stąd znacząco wyższe

stężenie tego białka w surowicy w porównaniu do mleka. Natomiast brak wzrostu poziomu amyloidu A w surowicy krów chorych na *mastitis* może wynikać z wczesnej fazy stanu zapalnego, kiedy ogólnoustrojowa odpowiedź immunologiczna organizmu nie została jeszcze zainicjowana. Dodatkowo pula surowiczego amyloidu A w krwiobiegu zostaje pomniejszona o znaczną część przetransportowaną do wymienia.

Uzyskane wyniki badań korelują z doniesieniami innych autorów (Eckersall i wsp., 2001; Gerardi i wsp., 2009; Kovačević-Filipović i wsp., 2012). Eckersall i wsp. (2001) odnotowali istotnie wyższy poziom tego białka ostrej fazy u krów nawet z umiarkowanym i łagodnym przebiegiem *mastitis* w porównaniu z krowami zdrowymi. Także Gerardi i wsp. (2009) uzyskali wyższe stężenie SAA u krów z kliniczną formą *mastitis*, chociaż przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic. Z kolei Kovačević-Filipović i wsp. (2012) stwierdzili trzykrotnie wyższy poziom amyloidu A w surowicy krów z podkliniczną formą *mastitis* wywołaną przez *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) niż w surowicy krów grupy kontrolnej. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że tak znaczące różnice w stężeniu SAA wynikają z jednej strony ze zróżnicowanego czasu trwania choroby, z drugiej zaś ze stopnia nasilenia odpowiedzi immunologicznej w przebiegu procesu zapalnego. Winter i wsp. (2003) wykazali, że stężenie SAA u owiec po doświadczalnym zakażeniu wymienia w bardzo szybkim czasie osiągnęło wysoki poziom, który utrzymywał się przez okres 2-7 dni, po czym obserwowano powrót do wartości fizjologicznej pomimo przewlekłe trwającego procesu zapalnego. Wyniki badań własnych wskazują, że zapalenie wymienia u krów wywołane przez *S. uberis* nie ma wpływu na stężenie amyloidu A w surowicy, ale prowadzi do zwiększonego stężenia tego białka w mleku, co dowodzi, że w przebiegu zapalenia wymienia głównym miejscem jego syntezy są komórki nabłonka gruczołowego wymienia. Berry i wsp. (2005) stwierdzili, że fizjologiczne stężenie MAA w mleku zdrowej krowy jest niskie, a jego wzrost do wartości ponad 500 ng/mL wskazuje na rozwijającą się reakcję organizmu na zakażenie gruczołu mlekowego. Znacznie wyższe wartości MAA w porównaniu z wartościami wskazanymi przez Berry i wsp. (2005), zarówno dla krów chorych na *mastitis*, ale także krów zdrowych odnotowali Nazifi i wsp. (2008) oraz Kováč i wsp. (2011). W badaniach przeprowadzonych przez Kováč i wsp. (2011) stężenie MAA u krów bez klinicznych objawów zapalenia wynosiło 473,7 ng/mL. W badaniach własnych stężenie MAA w mleku zdrowych krów wynosiło 318,3 ng/mL i było blisko 9-krotnie niższe w porównaniu do mleka krów chorych. Biorąc pod uwagę fakt, że próbki krwi i mleka pobierano w początkowej fazie zapalenia, znaczny wzrost

stężenia amyloidu A w mleku można zatem uznać za wczesny i czuły marker zakażenia wymienia.

Należy podkreślić, iż wspólne działanie wszystkich mechanizmów odpowiedzi immunologicznej oraz wyzwolenie reakcji ostrej fazy opiera się na przekazywaniu za pośrednictwem cytokin sygnałów pobudzających lub hamujących (Alluwaimi i Cullor, 2002; Bannerman i wsp., 2009; Bochniarz i wsp., 2017). Najsilniejszym stymulatorem produkcji i wydzielania białek ostrej fazy jest IL-6, która pełni także wiele innych ważnych funkcji: wspomaga napływ makrofagów do wymienia, indukuje różnicowanie limfocytów B i produkcję immunoglobulin, a także odpowiada za generowanie objawów ogólnoustrojowych m.in. wzrost ciepłoty ciała (Bochniarz i wsp., 2024b; Hagiwara i wsp., 2001; Vitenberga-Verza i wsp., 2022). Cytokina ta jest wydzielana przez różne komórki, w tym limfocyty, monocyty, makrofagi, komórki nabłonka gruczołu mlekowego i fibroblasty, a jej ekspresję stymulują bakterie wnikające do gruczołu mlekowego. IL-6 została uznana za wczesny, ale niespecyficzny wskaźnik zapalenia wymienia (Bochniarz i wsp., 2017; Vitenberga-Verza i wsp., 2022). Dostępne w literaturze wyniki badań wskazują, że poziom tej cytokiny zależy od wielu czynników, w tym od postaci *mastitis*, fazy zakażenia, ale także rodzaju drobnoustrojów wnikających do wymienia (Bannerman i wsp., 2004 a,b; Bochniarz i wsp., 2017; Osman i wsp., 2010; Shaheen i wsp., 2016). Hagiwara i wsp. (2001) stwierdzili znaczący wzrost poziomu IL-6 w początkowej fazie zakażenia (25-krotny w mleku i 5-krotny w surowicy u krów z ostrym klinicznym *mastitis* w porównaniu do krów zdrowych). Ponadto badania tych autorów wykazały, że stężenie IL-6 w mleku i surowicy było zdecydowanie wyższe u krów z *mastitis* wywołanym przez *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* i *Streptococcus* spp., zaś istotnie niższe w przypadku gronkowców koagulazo-ujemnych (CNS). Z drugiej strony należy podkreślić, iż w innych badaniach poziom IL-6 był nieoczekiwanie zdecydowanie wyższy w podklinicznej niż w klinicznej formie *mastitis* (Osman i wsp., 2010) lub utrzymywał się na wyrównanym wysokim poziomie w obu postaciach zapalenia (Shaheen i wsp., 2016).

Badania własne wykazały 3,7-krotny wzrost poziomu IL-6 w mleku oraz 4,5-krotny spadek stężenia tej cytokiny w surowicy krów z *mastitis* wywołanym przez *S. uberis* w porównaniu do krów zdrowych. Należy także zwrócić uwagę na zróżnicowanie poziomu tej cytokiny w mleku i surowicy w obu badanych grupach zwierząt. W mleku zdrowych krów stężenie IL-6 było 3,2-krotnie niższe niż w surowicy, podczas gdy w grupie krów chorych okazało się 5,5-krotnie wyższe w mleku niż w surowicy. Wyniki

tego badania wyraźnie pokazują, że gruczoł mlekowy jest głównym miejscem obrony przed patogenami, z miejscową syntezą mediatorów zapalenia, ale także zwiększonym przepływem komórek obronnych z krwi obwodowej do chorej ćwiartki wymienia. Badania własne oraz przeprowadzone przez innych autorów potwierdzają tezę, że IL-6 może być uważana za potencjalny marker *mastitis*, co jest szczególnie ważne, w przypadku trudnej do wykrycia podklinicznej formy zapalenia (Batavani i wsp., 2007; Bochniarz i wsp., 2024b; Hagiwara i wsp., 2001). IL-6 posiada jeszcze jedną niezwykle ważną cechę jaką jest zdolność do utrzymywania się w krążeniu obwodowym przez dłuższy okres czasu w porównaniu do innych cytokin prozapalnych (Vitenberga-Verza i wsp., 2022). Oznacza to, że cytokina ta wykazuje także działanie przeciwzapalne prowadzące do zahamowania ekspresji IL-1 β i TNF- α , a w konsekwencji spadku poziomu samej IL-6. Kawecka-Grochocka i wsp. (2021) stwierdzili obniżony poziom IL-6 u krów chorych na przewlekłe zapalenie wymienia w porównaniu z krowami zdrowymi. Może to sugerować, że w procesie przechodzenia formy klinicznej *mastitis* w postać przewlekłą organizm przestaje produkować cytokiny prozapalne, prawdopodobnie w celu ochrony tkanek gospodarza przed ich uszkodzeniem podczas długotrwałej infekcji.

Zdolność *S. uberis* do aktywacji układu immunologicznego w badaniach własnych potwierdzony został poprzez znaczący wzrost poziomu wszystkich badanych, ściśle ze sobą powiązanych czynnościowo cytokin w mleku. Po wnikięciu bakterii do wymienia natępuje wiązanie bakteryjnych PAMP (*pathogen associated molecular patterns* - wzorce molekularne związane z patogenami) z TLR (*Toll-like receptor*), a w efekcie stymulacja wydzielania czynnika martwicy nowotworów α (Bannerman i wsp., 2009; Riollet i wsp., 2002; Sordillo i wsp., 1997). TNF- α jest cytokiną prozapalną wytwarzaną głównie przez makrofagi, neutrofile oraz komórki MEC, która pełni różne funkcje: stymuluje syntezę innych cytokin, kontroluje procesy życiowe komórek i utrzymuje homeostazę tkanek, przyczynia się do rozwoju objawów ogólnoustrojowych takich jak gorączka, wzmacnia fagocytozę i aktywność bakteriobójczą neutrofili, indukuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych oraz stymuluje wydzielanie IL-8 przez różne komórki (Vitenberga-Verza i wsp., 2022). Cytokina ta aktywuje także produkcję IL-1 (zarówno IL-1 α jak i IL-1 β), której podwyższony poziom wielokrotnie notowano już we wczesnych stadiach zakażenia wymienia wywołanych przez *S. uberis*, ale także *E. coli* i *S. aureus* (Bannerman i wsp. 2004 a i b; Oviedo-Boyso i wsp. 2007; Riollet i wsp. 2002; Zhang i Issekutz, 2002). Należy zaznaczyć, iż w doświadczalnie wywołanej ostrej postaci *mastitis* u krów

wykazano, że IL-1 β wykazuje działanie ogólnoustrojowe w przeciwieństwie do działającej miejscowo IL-1 α , która jest odpowiedzialna za stymulowanie wydzielania mediatorów pierwszej linii obrony, tj. prostaglandyny (PGF-2 α) i leukotrienu (LTB-4) w wymieniu (Vitenberga-Verza i wsp., 2022). Działanie IL-1 β wykazuje analogię do aktywności TNF- α : pośredniczy w procesie ostrej fazy reakcji zapalnej i wspomaga syntezę białek ostrej fazy, przyczynia się do zwiększenia transportu neutrofili do wymienia i wzmacnia ich fagocytarną i bakteriobójczą aktywność oraz stymuluje wydzielanie IL-6, IL-8, IL-12 i TNF α . Wynikiem wspólnego działania IL-1 β oraz TNF- α jest także uwalnianie czynników chemotaktycznych takich jak IL-8. W konsekwencji dochodzi do przepływu neutrofili z krwi obwodowej do ogniska zapalnego i nasilenia ich aktywności bójczej (Bannerman i wsp., 2004b; Boulanger i wsp., 2003; Stein i wsp., 2003). Uwalnianie IL-8 w odpowiedzi na zakażenie różnymi drobnoustrojami potwierdziły badania prowadzone na pierwotnych hodowlach komórek nabłonka gruczołu mlekowego (bMECs - *bovine mammary epithelial cell line*) (Lahouassa et al. 2007). Z kolei eksperymentalne zakażenie wymienia wywołane przez *S. uberis* doprowadziło do wzrostu poziomu IL-8 w mleku, który utrzymywał się przez ponad 96 godzin od momentu wprowadzenia zawiesiny bakteryjnej (Bannerman et al. 2004a). Wyniki badań potwierdzają, że IL-8 posiada zdolność zmiany integralności bariery mleko-krew, umożliwiając zwiększony przepływ komórek z surowicy do mleka, dzięki czemu populacja neutrofili w gruczole mlekowym znacznie wzrasta (Watanabe et al. 2008).

Badania własne wykazały znacząco wyższy poziom cytokin w mleku krów chorych w porównaniu do mleka krów zdrowych (3,5-krotny dla IL-1 β ; 3,7-krotny dla IL-6; 2-krotny dla IL-8; 3,8-krotny dla IL-12 β oraz 4,2-krotny dla TNF- α). Ponadto należy podkreślić, iż stężenie badanych cytokin w surowicy krów chorych było niższe w porównaniu do mleka tych krów (7,5-krotnie dla IL-1 β ; 5,5-krotnie dla IL-6; 11,8-krotnie dla IL-12 β oraz 5-krotnie dla TNF- α), ale także znacząco niższe niż w surowicy krów zdrowych (4,3-krotnie dla IL-1 β ; 4,5-krotnie dla IL-6; 3,4-krotnie dla IL-12 β oraz 2-krotnie dla TNF- α). Uzyskane wyniki potwierdzają zatem tezę o natężonej reakcji immunologicznej miejscowo w wymieniu i przechodzeniu komórek produkujących cytokiny z krwi obwodowej do ogniska zapalnego. Jedynie w przypadku IL-8 poziom tej cytokiny kształtował się niemalże na tym samym poziomie w surowicy i mleku chorych krów (237,6 pg/mL oraz 275,2 pg/mL). Wysokie stężenie tej cytokiny nie tylko w mleku,

ale i surowicy krów chorych na *mastitis* jest uzasadnione najważniejszą jej funkcją, czyli wspomaganie przechodzenia komórek odpornościowych z krwioobiegu do wymienia.

Wyniki tego badania wyraźnie pokazują, że gruczoł mlekowy jest pierwszym i zarazem głównym miejscem obrony przed zakażeniem *S. uberis*, z miejscową syntezą mediatorów zapalenia wspomaganą zwiększonym przepływem komórek obrony immunologicznej z krwi obwodowej do chorej ćwiartki wymienia.

Oporność fenotypowa i genotypowa szczepów S. uberis wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis

S. uberis należy obecnie do mikroorganizmów najczęściej powodujących zapalenie wymienia w stadach krów mlecznych zatem uznawany jest za najważniejszy czynnik wymuszający konieczność stosowania antybiotyków, ponieważ dotychczas nie została opracowana skuteczniejsza metoda pozwalająca radzić sobie z *mastitis* (Ruegg, 2017; Tomanić i wsp., 2023).

Ze względu na wysoką wrażliwość szczepów *S. uberis* na antybiotyki β -laktamowe, penicyliny i cefalosporyny są zalecane jako leki pierwszego wyboru (De Jong i wsp., 2018; Käppeli i wsp., 2019; Minst i wsp., 2012; Monistero et al. 2021; Pitkälä i wsp., 2008). Jednak w ciągu ostatnich lat obserwowany jest stopniowy wzrost odsetka szczepów *S. uberis* opornych na tę grupę antybiotyków (Haenni i wsp., 2018). Zmniejszona wrażliwość na penicylinę najczęściej spowodowana jest występowaniem mutacji w genach cząsteczek docelowych, znanych jako białka wiążące penicylinę (PBP), co skutkuje niższym powinowactwem PBP do tego antybiotyku. W badaniu przeprowadzonym w Czechach wrażliwość szczepów *S. uberis* wyizolowanych z *mastitis* na antybiotyki β -laktamowe była bardzo wysoka, nie stwierdzono żadnego szczepu opornego na tę grupę antybiotyków (Zouharova i wsp., 2023). Jednakże odnotowano stosunkowo wysoką częstość występowania szczepów średniowrażliwych na penicylinę (18,0%) i ampicylinę (44,0%). W badaniach własnych 90,0% szczepów *S.uberis* było wrażliwych na penicylinę. Natomiast nie dokonano oceny wrażliwości *S. uberis* na ampicylinę i amoksycylinę, ponieważ zgodnie z rekomendacjami EUCAST i CLSI jest ona zgodna z wrażliwością na penicylinę. W przeprowadzonym badaniu stwierdzono natomiast zdecydowanie niższą wrażliwość szczepów *S. uberis* na ceftiofur – 86,7% (w tym 16,7% średniowrażliwych), co może wynikać z szerokiego zastosowania tego antybiotyku w leczeniu różnych chorób u krów. W przypadku cefalosporyn innych generacji nadal obserwuje się wysoką ich skuteczność zarówno *in vitro* jak i w

zastosowaniu *in vivo*. W badaniach przeprowadzonych przez Zouharovą i wsp. (2023) wszystkie szczepy były w pełni wrażliwe na cefaleksynę (cefalosporyna pierwszej generacji) i cefquinome (cefalosporyna czwartej generacji), natomiast zanotowano 3% szczepów opornych na ceftiofur (cefalosporyna trzeciej generacji). W badaniach własnych stwierdzono 100% szczepów wrażliwych na cefoperazon i cefquinom oraz 93,3% szczepów wrażliwych na cefaleksynę, przy czym część z nich zakwalifikowano do grupy średniowrażliwych (odpowiednio: 26,7%; 16,7%; 26,7%). W przypadku szczepów o obniżonej wrażliwości *in vitro* istnieje niestety duże prawdopodobieństwo, że również skuteczność preparatu *in vivo* będzie zmniejszona, czego konsekwencją może być niepowodzenie terapii i konwersja szczepów w wielolekooporne. Konieczne jest zatem stałe monitorowanie wrażliwości drobnoustrojów odpowiedzialnych za *mastitis*, szczególnie występujących w otoczeniu krów.

Należy podkreślić, że stopień wrażliwości *S. uberis* na antybiotyki β -laktamowe w wielu krajach europejskich jest zbliżony. W badaniach monitoringowych lekowrażliwości przeciwdrobnoustrojowej szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*, przeprowadzonych w Niemczech w latach 2004-2010, nie stwierdzono *in vitro* oporności na penicylinę, ampicylinę, oksacylinę, cefquinome, amoksycylinę z kwasem klawulanowym ani cefazolin, zaś oporność na cefoperazon wynosiła mniej niż 1% (Krömker i wsp., 2014). Podobne wyniki badań uzyskano w Szwajcarii (100% szczepów *S. uberis* wrażliwych na penicylinę) (Käppeli i wsp., 2019). Z kolei we Włoszech zanotowano 84,5% szczepów wrażliwych na penicylinę, po 98,6% szczepów wrażliwych na ampicylinę, amoksycylinę, ceftiofur i cefquinome oraz 97,2% na cefoperazon (Monistero i wsp., 2021). Zupełnie odmienne okazały się wyniki badań przeprowadzonych w krajach na innych kontynentach, w których wielokrotnie wykazano zdecydowanie wyższy poziom oporności szczepów *S. uberis* na antybiotyki β -laktamowe. W Chinach 31,2% szczepów (Zhang i wsp. 2021), zaś w Brazylii 50,0% szczepów (Tomazi i wsp., 2019) było opornych na penicylinę. W badaniach przeprowadzonych w Egipcie stwierdzono aż 79,7% szczepów *S. uberis* opornych na penicylinę, 90,0% na ampicylinę, 100,0% na cefaleksynę, a 26,0% na cefalosporyny trzeciej generacji (Abd El-Aziz i wsp., 2021). Ponadto gen *blaZ* kodujący oporność na penicylinę został znaleziony u 46,38% badanych izolatów, co wskazuje na alarmująco wysoki poziom potencjalnej oporności na antybiotyki β -laktamowe stosowane w zapaleniu wymion u bydła (Abd El-Aziz i wsp., 2021). W badaniach własnych gen *blaZ* stwierdzono u 2 badanych szczepów (6,7%), chociaż tylko jeden z nich wykazał

fenotypową oporność na penicylinę. Podobne wyniki badań uzyskali Kaczorek i wsp. (2017) w północno-wschodniej części Polski, w których obecność genu *blaZ* wykryli zaledwie u trzech spośród 53 szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis* (5,7%).

Przyczyną wysokiego poziomu oporności na wiele środków przeciwdrobnoustrojowych w krajach spoza UE może być mniej rygorystyczna polityka antybiotykowa, która pozwala na większe zużycie leków przeciwdrobnoustrojowych w hodowli zwierząt (Bolte i wsp., 2020; Tomazi i wsp., 2019). Drugim bardzo ważnym aspektem jest problematyczna interpretacja wyników uzyskanych w ocenie lekowrażliwości. Porównanie wyników badań może nie być do końca wiarygodne z powodu zastosowania różnych metod badawczych, z drugiej strony zaś brak konkretnych kryteriów interpretacyjnych dla patogenów wywołujących *mastitis* może powodować znaczące nieścisłości w klasyfikacji szczepów *S. uberis* do kategorii wrażliwy/średniowrażliwy/oporny (Mc Dougall i wsp., 2013; Monistero i wsp., 2021; Zouharova i wsp., 2023). Wielkość strefy zahamowania wzrostu i punkty graniczne dla większości antybiotyków z konieczności oceniane są według kryteriów określonych dla ludzi lub zwierząt innych niż krowy (Mc Dougall i wsp., 2013). Jedynie wprowadzenie standaryzowanych zasad interpretacji wyników badań lekowrażliwości drobnoustrojów izolowanych od zwierząt stworzyłoby szansę poprawy nadzoru antybiotykowego i optymalizacji leczenia *mastitis* i innych chorób u zwierząt.

Alternatywę dla antybiotyków β -laktamowych w leczeniu *mastitis* stanowią antybiotyki należące do grupy makrolidów i linkozamidów. Wysoką wrażliwość *S. uberis* na erytromycynę wykazano w Czechach oraz we Włoszech (96,0% i 91,6% wrażliwych szczepów), nieco niższą zaś w Szwajcarii i Niemczech (odpowiednio 84,3% i 70,0% wrażliwych szczepów) (Käppeli i wsp., 2019; Monistero i wsp., 2021, Zouharova i wsp., 2023). W badaniach własnych stwierdzono 53,3% szczepów wrażliwych na ten makrolid, co koreluje z wynikami uzyskanymi w Brazylii (53,0%) (Tomazi i wsp., 2019). Bardziej zadawalające są wyniki badań w Finlandii, Francji, Argentynie i Chinach, gdzie stwierdzono występowanie odpowiednio: 15,6%; 21,0%, 27,6% oraz 31,2% szczepów opornych (Boireau i wsp., 2018; Denamiel i wsp., 2005; Pitkälä i wsp., 2008; Zhang i wsp., 2020). Wysoką natomiast oporność *S. uberis* na erytromycynę zanotowano w Egipcie (74,0% szczepów), przy czym należy podkreślić, iż gen *erm B* determinujący genetyczną oporność na ten antybiotyk był najczęściej występującym genem wśród

badanych szczepów *S. uberis* (75,36%) (Abd El-Aziz i wsp., 2021). W badaniach własnych gen *erm* B wykryto u 4 szczepów *S. uberis* (13,3%).

Ocena wrażliwości na linkozamidy także wykazała zróżnicowany poziom w różnych regionach świata. W Czechach 29,0% szczepów *S. uberis* było opornych na klindamycynę, podczas gdy w innych krajach zanotowano wysoką oporność na linkomycynę (we Włoszech 82,0% zaś w Egipcie 100% szczepów opornych) (Abd El-Aziz i wsp. 2021; Monistero i wsp., 2021; Zouharova i wsp., 2023). W badaniach własnych oporność na linkomycynę wykazała ponad połowa szczepów *S. uberis* (53,3%). Należy mieć na uwadze, iż w przypadku linkozamidów i makrolidów może pojawiać się oporność krzyżowa (Haenni i wsp. 2011). W badaniu Zouharowej i wsp. (2023) spośród 193 szczepów opornych na klindamycynę, tylko 9 było jednocześnie opornych na erytromycynę. Pozostałe szczepy wykazywały fenotypową oporność na linkozamidy z towarzyszącą jednocześnie wrażliwością na makrolidy. W badaniach własnych obecność oporności krzyżowej dla erytromycyny i linkomycyny stwierdzono u 11 szczepów *S. uberis* (36,7%).

Z uwagi na fakt, że paciorkowce posiadają naturalną oporność na aminoglikozydy, w badaniach własnych nie przeprowadzono oceny wrażliwości fenotypowej na antybiotyki należące do tej grupy. Zmniejszona przepuszczalność ściany komórkowej *Streptococcus* spp. dla tych leków sprawia, że nie zaleca się ich stosowania w terapii paciorkowcowego zapalenia wymienia samodzielnie (Kaczorek i wsp., 2017). Jedynie połączenie aminoglikozydów z antybiotykami, których działanie polega na uszkodzeniu ściany komórkowej bakterii np. z antybiotykami β -laktamowymi, ma szansę na uzyskanie większej efektywności leczenia. Należy podkreślić, iż profil oporności fenotypowej danego szczepu *S. uberis* nie zawsze jest kompatybilny z wykryciem u niego genów oporności na antybiotyki. W badaniach przeprowadzonych w Czechach 36,8% szczepów *S. uberis* posiadających gen *ant* (6)-*Ia* nie wykazywało fenotypowej oporności na streptomycynę (Zouharova i wsp., 2023). Natomiast w badaniach Abd El-Aziz i wsp. (2021) odsetek szczepów *S. uberis* opornych na streptomycynę wynosił 96,0%, przy czym blisko połowa szczepów (46,38%) posiadała gen odpowiadający za oporność na aminoglikozydy (*aac*(6')*aph*(2'')). W badaniach własnych obecność genu *aac*(6')-*Ie-aph*(2'')-*Ia* stwierdzono tylko u jednego szczepu *S. uberis* (3,3%). Również w badaniach Kaczorek i wsp. (2017) geny determinujące oporność na aminoglikozydy stwierdzono u niewielkiego odsetka szczepów *S. uberis* (3 geny/53 szczepów *S. uberis* (5,7%)).

Większość dostępnych wyników badań w różnych regionach świata pokazuje ogromny problem związany ze znaczną opornością *S. uberis* także na tetracykliny (De Jong i wsp., 2018). W Niemczech badania przeprowadzone w latach 2004-2010 pokazały wyraźną tendencję wzrostową z 1,0% do ponad 50,0% szczepów opornych (Krömker i wsp., 2014). W Czechach i Chinach liczba szczepów *S. uberis* opornych na tetracyklinę kształtowała się na tym samym poziomie (59,0%) (Zouharova i wsp. 2023) i była zbliżona do wyników badań własnych (53,3%). W Finlandii stwierdzono 40,6% szczepów *S. uberis* opornych na tetracyklinę (Pitkälä i wsp., 2008). Szczególnie wysoki odsetek szczepów opornych na tetracyklinę zanotowano natomiast w Tajlandii (82,0%) oraz w Egipcie, gdzie ponad 65% szczepów *S. uberis* wykazywało oporność na tetracyklinę, a gen *tet* (M) wykryto u 46,38% szczepów (Abd El-Aziz i wsp., 2021; Zhang i wsp., 2021). W badaniach własnych geny *tet* wykryto u 19 szczepów *S. uberis* (63,3%). Przyczyną wysokiej oporności bakterii na tetracykliny najprawdopodobniej jest długotrwałe stosowanie tych antybiotyków w leczeniu różnego rodzaju zakażeń u ludzi i zwierząt. Potwierdzają to wyniki badań w Szwecji oraz Francji, gdzie tetracykliny stosowano zdecydowanie rzadziej w porównaniu do penicylin, prawdopodobnie z tego powodu odsetek szczepów *S. uberis* opornych na tę grupę antybiotyków wynosił zaledwie 12,0% i 18,1% (Persson i wsp., 2011; Boireau i wsp., 2018).

Dostępne wyniki badań oraz własne potwierdzają występowanie wielolekooporności wśród szczepów *S. uberis*. W badaniach Zouharovej i wsp. (2023) tylko 28,8% szczepów *S. uberis* było wrażliwych na wszystkie badane środki przeciwdrobnoustrojowe, zaś 19,5% izolatów było wieloopornych, tj. opornych na trzy lub więcej antybiotyków. Najczęściej występowała oporność na tetracyklinę (31,3%), a drugim najczęściej występującym fenotypowym profilem była połączona oporność na tetracyklinę, streptomycynę i klindamycynę (16,6%). Podobny odsetek szczepów wieloopornych stwierdzono we Włoszech (25,4%) (Monistero i wsp. 2021). W badaniach własnych: 6 szczepów *S. uberis* (20,0%) było wrażliwych/średniowrażliwych na wszystkie antybiotyki użyte w badaniu, 8 szczepów było opornych tylko na 1 antybiotyk (26,7%), 6 szczepów było opornych na 2 antybiotyki (20,0%), natomiast 10 szczepów (33,3%) było wielolekoopornych, czyli opornych na conajmniej 3 antybiotyki. W badaniach przeprowadzonych w Niemczech spośród wszystkich gatunków *Streptococcus* spp. 13,0% wykazywało oporność na wiele leków. Należy przy tym podkreślić, iż odsetek szczepów wielolekoopornych był zdecydowanie wyższy wśród szczepów *S. uberis* (15,0%) niż wśród szczepów *S. dysgalactiae* (6,0%) i *S. agalactiae* (0%) (Minst i wsp.,

2012). Bardzo niepokojące dane pochodzą z Chin oraz Egiptu, gdzie 100% szczepów *S. uberis* było wielolekoopornych (Abd El-Aziz i wsp., 2021; Tian i wsp., 2019). Te różnice między krajami mogą wynikać z różnego poziomu kontroli stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych, co pozwala na bardziej masowe i często nieuzasadnione stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych szczególnie w krajach poza UE.

Kolejny problem wynika z występowania w tym samym środowisku jednocześnie szczepów *S. uberis* wrażliwych oraz opornych na leki przeciwdrobnoustrojowe, w tym szczepów wielolekoopornych. Współwystępowanie szczepów o różnych stopniach wrażliwości w stadzie może powodować problemy w leczeniu *mastitis*, szczególnie jeśli patogen nie jest badany pod kątem wrażliwości w każdym indywidualnym przypadku lub jeśli nie mamy zweryfikowanej wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe u dużej liczby szczepów *S. uberis* z danego stada w ramach ustalonego profilu bakteriologicznego w tym gospodarstwie (Zouharova i wsp., 2023). Ponadto należy zauważyć kolejny problem jakim jest występowanie w jednym gospodarstwie odmiennych profili fenotypowej i genotypowej oporności szczepów *S. uberis* (Davies i wsp. 2016).

W badaniach własnych w stadzie nr I, w którym z mleka krów chorych na *mastitis* wyizolowano 7 szczepów *S. uberis*, stwierdzono 5 różnych profili lekowrażliwości fenotypowej oraz potwierdzono obecność 14 genów kodujących oporność na wszystkie klasy antybiotyków: tetracykliny (4 geny *tetM* oraz 4 geny *tetL*), linkozamidy (2 geny *linB*), makrolidy (2 geny *ermB*), penicyliny (1 gen *blaZ*) i aminoglikozydy (1 gen *aac(6)*). Tylko jeden szczep *S. uberis* wyizolowany z tego stada okazał się wrażliwy na wszystkie badane antybiotyki i nie stwierdzono u niego obecności żadnego genu oporności. W przypadku trzech szczepów *S. uberis* stwierdzono występowanie 2 genów, u jednego szczepu stwierdzono obecność 1 genu oporności, u jednego szczepu – 3 genów i u jednego szczepu aż 4 genów oporności. W stadzie tym nie stwierdzono wśród szczepów *S. uberis* oporności fenotypowej na penicylinę, cefaleksynę, cefoperazon oraz cefquinom. Stwierdzono natomiast oporność na tetracyklinę (4 szczepy), linkomycynę (3 szczepy), erytromycynę (2 szczepy) oraz ceftiofur (1 szczep).

Brak zgodności pomiędzy profilami oporności fenotypowej i genotypowej może wynikać z braku ekspresji genów, być może z powodu obecności tzw. „cichych genów”, których częstość występowania u różnych bakterii waha się od 0,16% do 79,31% (Stasiak i wsp., 2021). Należy podkreślić, iż geny te mogą zostać aktywowane poprzez mutację lub rekombinację, ale także w sytuacji, gdy zostaną przeniesione do nowego gospodarza w procesie horyzontalnego transferu genów (Stasiak i wsp., 2021). Monitorowanie genów

ARGs (ang. *Antimicrobial Resistance Genes*), w tym cichych genów, jest niezbędne do oszacowania potencjału oporności przeciwdrobnoustrojowej populacji bakterii w danym środowisku (Zouharova i wsp., 2023).

Program kontroli mastitis wywołanego przez S. uberis

Skuteczność antybiotyków niestety dramatycznie obniża się głównie z powodu rosnącej lekooporności bakterii, uważanej obecnie za wiodący ogólnoswiatowy problem zdrowotny u ludzi i zwierząt (De Jong i wsp., 2018; Tomanić i wsp., 2023). Program kontroli *mastitis* powinien opierać się na ustalonej strategii stosowania leków przeciwdrobnoustrojowych tylko w uzasadnionych przypadkach, czego efektem będzie zminimalizowanie możliwości wystąpienia lekooporności u patogenów, ale także wyeliminowanie pozostałości antybiotyków w mleku krów (Ruegg, 2017). Potrzeba ograniczenia terapii opartej na stosowaniu antybiotyków wiąże się zatem z koniecznością podejmowania działań profilaktycznych (Schukken i wsp., 2003; Tomanić i wsp., 2023; Tommasoni i wsp., 2023; Zhylkaidar i wsp., 2021). Większość czynności prewencyjnych skoncentrowana jest na procedurach odpowiedniej higieny pozyskiwania mleka (Ruegg, 2006; Ruegg, 2017). Zmniejszenie liczby drobnoustrojów znajdujących się na skórze strzyków i w ujściu kanału strzykowego jest jednym z najważniejszych czynników obniżających ryzyko zakażenia wymienia. Im większa ilość drobnoustrojów zostanie usunięta ze wskazanych krytycznych miejsc tym mniejsze jest ryzyko przedostania się ich do zatoki mlekowej drogą wstępującą (Breen i wsp., 2019; Neculai-Valeanu i Ariton, 2022; Verbeke i wsp., 2014).

Jednym z najbardziej efektywnych sposobów eliminacji drobnoustrojów jest utrzymanie czystości krów, ale także całego środowiska, w którym te zwierzęta przebywają. Im wyższy poziom higieny skóry wymienia tym mniejsza ekspozycja na zakażenie drobnoustrojami środowiskowymi (Ruegg, 2006; Ruegg, 2017). W badaniach własnych w stadach o wysokim stopniu czystości krów (I i II) częstotliwość izolacji szczepów *S. uberis* z mleka krów chorych na *mastitis* była zdecydowanie niższa (1 szczep przypadał odpowiednio na 65 oraz 52,8 krowy) w porównaniu do stad z III i IV stopniem czystości (1 szczep przypadał odpowiednio na 32 oraz 36 krów). Zatem dbałość o czystość krów ma ogromne znaczenie dla ograniczenia występowania *mastitis* powodowanego przez *S. uberis* (Ruegg, 2017; Verbeke i wsp., 2014). Efekt ten można uzyskać m.in. dzięki zastosowaniu przed i poudojowej dezynfekcji strzyków, która

powinna stać się ważnym elementem codziennych czynności wykonywanych podczas doju (Breen i wsp., 2019; Silva i wsp., 2023). Działania te odgrywają niezwykle ważną rolę, o ile wykonywane są w prawidłowy sposób. Niedopuszczalne jest mycie wymion samą wodą i osuszanie wielorazowymi ścierkami dla różnych krów. Prawidłowo przeprowadzona higiena przedudojowa polega na zanurzeniu strzyków wymienia w roztworze środka dezynfekcyjnego. Z kolei postdipping polega na zanurzeniu lub spryskiwaniu strzyków preparatem antyseptycznym po zakończonym doju (Gruet i wsp., 2001; Silva i wsp., 2023). Godinho i Bramley (1980) badali skuteczność środków dezynfekcyjnych zawierających etanol, jodofory lub chlorheksydynę stosowanych po doju na zanieczyszczonych strzykach. Wszystkie substancje wykazywały bardzo dobre działanie bakteriobójcze, ale trwałość tego efektu na powierzchni strzyków była różna w zależności od rodzaju drobnoustrojów. Również wyniki badań własnych potwierdziły, że efekt stosowania pre- i postdippingu w przypadku patogenów środowiskowych takich jak *S. uberis* może nie być zadawalający. Odsetek krów, od których wyizolowano szczepy *S. uberis* był większy w stadach, w których stosowano preparaty postdippingowe lub łącznie pre- i postdippingowe w porównaniu do całkowitego braku przed i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion (1/43,5 i 1/30 vs 1/63,2). To zjawisko prawdopodobnie może być spowodowane możliwością przenoszenia patogenów środowiskowych stale obecnych na skórze strzyków i w kanale strzykowym, szczególnie w przypadku zanurzania strzyków wymion kolejnych krów w tym samym pojemniku zawierającym środek dezynfekcyjny. Ponadto źródłem *S.uberis* może być kał, ścieki, a nawet woda w poidłach i sierść, a ponieważ wzajemne lizanie jest naturalną aktywnością zwierząt, patogen może być łatwo przenoszony na kolejne krowy (Zadoks, 2007). Z tego powodu poprawa warunków higienicznych krów powinna obejmować także miejsca legowiskowe krów i wybór odpowiedniej ściółki. Zadoks (2007) wskazał, że ściółka może odgrywać bardzo dużą rolę sprzyjającą rozwojowi *mastitis* wywołanemu przez *S. uberis*. Badania wykazały, że ten patogen nie jest w stanie rozwijać się w materiałach ściółkowych przy wartościach pH powyżej 9.5. Również Paduch i wsp. (2013) wykazali, że alkalizacja ściółki trocinowej zmniejsza liczbę bakterii *S.uberis* na skórze strzyków. Jedną z najlepszych opcji jest stosowanie piasku, jednakże w badaniach własnych tylko w jednym spośród 28 badanych stad wybrano ten rodzaj ściółki, w związku z tym nie jest możliwe dokonanie wiarygodnej oceny.

Bardzo ważną rolę odgrywa także rutynowa konserwacja i kontrola sprawności sprzętu udojowego, które to czynności stanowią jeden z kluczowych filarów strategii

planu najpierw 5-punktowego, a następnie 10-punktowego zarządzania hodowlą krów mlecznych (Ruegg, 2017). Niestety schemat wprowadzony w latach sześćdziesiątych XX wieku jest skuteczny głównie w kontrolowaniu zakaźnych patogenów powodujących zapalenie gruczołu mlekowego (Breen et al., 2019; Ruegg, 2017). Zastosowanie procedur wskazanych w tym planie niestety nie przynosi pozytywnych efektów w walce z drobnoustrojami środowiskowymi (Cheng i Han, 2020). Stąd też w celu zapobiegania *mastitis* wywołanemu przez *S. uberis* należy połączyć różne formy działania zwiększające szansę na skuteczne zmniejszenie odsetka przypadków *mastitis* w stadzie (Down et al., 2017). Generalnie czystość i dobre zarządzanie higieną w stadzie ma znaczenie dla częstości występowania *mastitis* powodowanego przez *S. uberis* (Ruegg, 2017). Niski poziom LKS $\leq 200\ 000/\text{mL}$ w mleku zbiorczym świadczy o zdrowotności wymion i zmniejszonym problemie *mastitis* w stadzie. W badaniach własnych w stadach z LKS $\leq 200\ 000/\text{mL}$ odsetek szczepów *S.uberis* w przeliczeniu na jedną krowę był dwukrotnie mniejszy niż w stadach z LKS $> 200\ 000/\text{mL}$ (1/73,3 vs 1/37,8).

Niestety w dalszym ciągu główną strategią leczenia zapalenia gruczołu mlekowego jest stosowanie antybiotyków. Idealna koncepcja leczenia zakłada wystarczająco długą terapię, aby osiągnąć odpowiednią skuteczność, ale jednocześnie w miarę możliwości jak najkrótszą, aby nie doprowadzić do wystąpienia lekooporności drobnoustrojów i ograniczyć straty finansowe wynikające z konieczności przestrzegania okresu karencji na mleko (Tomanić i wsp., 2023; Tommasoni i wsp., 2023). Stąd też jedną z najkorzystniejszych opcji jest leczenie *mastitis* w czasie wyłączenia krowy z produkcji mleka, czyli w okresie zasuszenia, który jest niezwykle ważnym etapem okresu laktacji każdej krowy (Biggs, 2017; Cheng i Han, 2020). Zastosowanie antybiotykowego preparatu dowymieniowego o przedłużonym działaniu (DC) pozwala wyeliminować istniejący proces zapalny w wymieniu, ale także zapobiec nowym zakażeniom w okresie poporodowym (Biggs, 2017). Przez wiele lat stosowano całkowitą terapię krów zasuszonych (BDCT - ang. *Blanket Dry Cow Therapy*), która obejmowała wprowadzenie antybiotyku DC do każdej ćwiartki wymienia u wszystkich krów niezależnie od protokołu występowania *mastitis* w stadzie w ostatniej laktacji. Ze względu na rosnące obawy związane z pojawieniem się patogenów opornych na środki przeciwdrobnoustrojowe, wprowadzono selektywną terapię krów zasuszonych (SDCT - ang. *Selective Dry Cow Therapy*), która zakłada leczenie w okresie zasuszenia tylko ćwiartek wymienia ze stwierdzonym *mastitis* (Rowe i wsp., 2023). Od czasu wprowadzenia SDCT stosowano różne metody selekcji zakażonych krów lub ćwiartek

głównie oparte na hodowli bakteriologicznej mleka, ocenie liczby komórek somatycznych oraz uwzględnieniu historii klinicznych przypadków zapalenia wymienia w stadzie. Wiele badań wykazało, że SDCT stanowi skuteczną metodę leczenia pozwalającą na ograniczenie stosowania leków przeciwdrobnoustrojowych oraz pozostaje bez wpływu na dobrostan zwierząt i ekonomię gospodarstwa (Hommels i wsp., 2021). Potwierdzają to wyniki badań własnych. Ze stad, w których stosowano terapię SDCT wyizolowano ponad 5-krotnie mniej szczepów *S. uberis* w przeliczeniu na jedną krowę w porównaniu do stad bez antybiotyków długodziałających (1/55,1 vs 1/9,3). Leczenie *mastitis* w okresie laktacji powinno zatem dotyczyć tylko formy klinicznej zapalenia wymienia (Hosain i wsp., 2017), a wyznacznikiem efektywności leczenia jest poprawa stanu klinicznego krowy w ciągu 5-7 dni od aplikacji leków (Schukken i wsp., 2003).

Szczepienie krów przeciw drobnoustrojom powodującym zapalenie wymienia

Wśród strategii zapobiegawczych stosowanych w celu zminimalizowania *mastitis* u bydła, znaczące miejsce zajmują szczepienia. Szczepionki są powszechnymi i skutecznymi narzędziami do kontroli chorób zakaźnych (Fanelli i wsp., 2022; Tomanić i wsp., 2023; Zhylkaidar i wsp., 2021). Szczepienie krów także można uznać za jedno z najbardziej obiecujących działań profilaktycznych zapobiegających *mastitis* w stadach. Założeniem stosowania immunoprofilaktyki jest zwiększenie odporności immunologicznej organizmu na zakażenia drobnoustrojami a tym samym zmniejszenie ilości przypadków zapalenia wymienia w stadzie i redukcję ilości antybiotyków stosowanych w terapii *mastitis* (Tomanić i wsp., 2023). Szczepionki przeciwko zapaleniu wymienia zyskują coraz większe zainteresowanie jako narzędzia w walce z lekoopornością mimo, że badania naukowe w tej dziedzinie wskazują na ograniczony sukces w uzyskiwaniu znaczących wyników (Ismail, 2017; Zhylkaidar i wsp., 2021). Brak oczekiwanego efektu wysokiej skuteczności szczepionek może wynikać z wieloetiotologicznego charakteru zapalenia gruczołu mlekowego u bydła, które może być powodowane przez szereg różnych drobnoustrojów. Niestety większość szczepionek jest przeznaczona do zwalczania tylko kilku gatunków drobnoustrojów: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis* i *E. coli* (Ismail, 2017). Podjęto szereg działań w celu opracowania jednej szczepionki przeciwko kilku patogenom, ale niewiele z nich przyniosło zadowalające wyniki. Głównym problemem są znaczące różnice pod względem zdolności immunogennych oraz posiadanych cech wirulencji pomiędzy poszczególnymi rodzajami a nawet szczepami tych samych gatunków bakterii (Gomes i Henriques, 2016;

Ruegg, 2017). Zróżnicowane stopnie skuteczności szczepionek mogą być związane także z różnymi praktykami zarządzania w stadach (Ruegg, 2017). Dlatego też, niezależnie od rodzaju szczepionki, samo szczepienie nie jest skuteczne w zapobieganiu zapalenia gruczołu mlekowego, szczególnie w stadach mlecznych o wysokiej częstotliwości występowania zapalenia gruczołu mlekowego. Szczepienie musi być połączone z innymi procedurami kontrolnymi, takimi jak wysoka higiena doju, leczenie SDCT, eliminacja zakażonych krów i powinno być łatwe do wdrożenia w codziennej rutynie oraz ekonomicznie przystępne (Ismail, 2017; Ruegg, 2017; Schukken i wsp., 2003; Tomanić i wsp., 2023).

Badania własne potwierdziły skuteczność stosowania szczepionek skierowanych przeciw *S. uberis*. Odsetek szczepów *S. uberis* w przeliczeniu na 1 krowę był zdecydowanie niższy w stadach szczepionych w porównaniu do stad nieszczepionych (1/49,4 vs 1/33,3). Należy przy tym podkreślić szczególnie znaczący pozytywny efekt stosowania szczepionki przeciw *S. uberis* (Ubac) – 1 szczep *S. uberis* przypadał na 115,3 krów. Korzystne okazało się także zastosowanie szczepionki Ubac łącznie ze szczepionką Startvac (1 szczep *S. uberis* przypadał na 50 krów).

6. Wnioski

1. *Streptococcus uberis* należy do istotnych czynników etiologicznych zapalenia wymienia u krów mlecznych. Szczepy *S. uberis* stanowiły 17,0% wszystkich szczepów bakterii wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia.
2. Ocena parametrów odpowiedzi immunologicznej potwierdziła zdolność *S. uberis* do aktywacji układu immunologicznego wymienia. W badaniach własnych stwierdzono znaczący wzrost poziomu wszystkich badanych, ściśle ze sobą powiązanych czynnościowo cytokin (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β , TNF- α) oraz amyloidu A w mleku krów chorych na *mastitis* w porównaniu do mleka krów zdrowych.
3. Ocena stężenia amyloidu A w mleku może zostać uznana za potencjalny marker prognostyczny zapalenia wymienia powodowanego przez *S. uberis*. Poziom MAA był statystycznie istotnie wyższy w mleku krów z *mastitis* w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$).
4. Największą aktywność wobec szczepów *S. uberis* w badaniu *in vitro* wykazały antybiotyki β -laktamowe, zalecane jako leki pierwszego wyboru w leczeniu *mastitis* u krów: cefoperazon, cefquinom, cefaleksyna, penicylina oraz ceftiofur (odpowiednio: 100%, 100%, 93,3%, 90% oraz 86,7% wrażliwych szczepów *S. uberis*).
5. Wyizolowane z mleka szczepy *S. uberis* mogą stanowić źródło genów determinujących oporność na różne grupy antybiotyków. W przypadku 66,7% szczepów *S. uberis* wykryto co najmniej 1 gen oporności.
6. Profile oporności fenotypowej szczepów *S. uberis* nie są zgodne z profilami oporności genotypowej tych patogenów. W przypadku 33,3% szczepów *S. uberis* wykazujących fenotypową oporność na wybrane antybiotyki w badaniu *in vitro* badania molekularne nie potwierdziły genetycznej determinanty tej lekooporności.

7. Mleko krów chorych na zapalenie wymienia może być potencjalnym rezerwuarem wielolekoopornych szczepów *S. uberis*. 33,3% badanych szczepów *S. uberis* wykazało oporność na co najmniej 3 antybiotyki.
8. Jednym z najbardziej efektywnych sposobów eliminacji szczepów *S. uberis* jest utrzymanie czystości krów oraz całego środowiska, w którym te zwierzęta przebywają. W stadach o wysokim stopniu czystości krów (I i II) częstotliwość izolacji szczepów *S. uberis* z mleka krów chorych na *mastitis* była zdecydowanie niższa w porównaniu do stad z III i IV stopniem czystości.
9. Efekt stosowania przed i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion krów w przypadku patogenów środowiskowych, takich jak *S. uberis* może nie być zadawalający. Odsetek krów, od których wyizolowano szczepy *S. uberis* był większy w stadach, w których stosowano preparaty postdippingowe lub łącznie pre- i postdippingowe w porównaniu do całkowitego braku przed i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion.
10. Zastosowanie antybiotykowego preparatu dowymieniowego o przedłużonym działaniu w okresie zasuszenia krowy zmniejsza odsetek zakażeń wymion wywołanych przez *S. uberis*. Ze stad, w których stosowano antybiotyki *dry cow* wyizolowano 6-krotnie mniej szczepów *S. uberis* w porównaniu do stad nie wdrażających terapii DC.
11. Szczepienie krów można uznać za jedno z najbardziej obiecujących działań profilaktycznych zapobiegających *mastitis* wywołanemu przez *S. uberis*. Badania własne potwierdziły wysoką skuteczność stosowania szczepionek skierowanych przeciw *S. uberis*. Odsetek szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis* w stadach szczepionych był zdecydowanie niższy w porównaniu do stad nieszczepionych.

7. Piśmiennictwo

1. Abd El-Aziz N.K., Ammar A.M., El Damaty H.M., Abd Elkader R.A., Saad H.A., El-Kazzaz W., Khalifa E. Environmental *Streptococcus uberis* Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows: Virulence Traits, Antimicrobial and Biocide Resistance, and Epidemiological Typing. *Animals* 2021, 11, 1849, <https://doi.org/10.3390/ani11071849>.
2. Abdi R.D., Gillespie B.E., Ivey S., Pighetti G.M., Almeida R.A., Dego O.K. Antimicrobial Resistance of Major Bacterial Pathogens from Dairy Cows with High Somatic Cell Count and Clinical Mastitis. *Animals* 2021, 11, 131, doi: 10.1051/vetres:2003027.
3. Akers R.M., Nickerson S.C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2011, 16(4), 275-89, doi: 10.1007/s10911-011-9231-3.
4. Ali A., Rehman M.U., Mushtaq S., Ahmad S.B., Khan A., Karan A., Bashir Wani A., Ganie S.A., Mir M.U. Biochemical and Computational Assessment of Acute Phase Proteins in Dairy Cows Affected with Subclinical Mastitis. *Current Issues in Molecular Biology* 2023, 45(7), 5317-5346, <https://doi.org/10.3390/cimb45070338>.
5. Alluwaimi A.M., Cullor J.S. Cytokines Gene Expression Patterns of Bovine Milk During Middle and Late Stages of Lactation. *J. Vet. Med.* 2002, 49 (2), 105–110, doi: 10.1046/j.1439-0450.2002.00515.x.
6. Alnakip M.E., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernandez-No I., Caamaño-Antelo S., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J. Vet. Med.* 2014, 19, 1-3, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/659801>.
7. Baggiolini M., Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992, 307, pp. 97-101, doi:10.1016/0014-5793(92)80909-z.
8. Bannerman D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2009, 87(1), 10-25, doi:10.2527/jas.2008-1187.
9. Bannerman D.D., Paape M.J., Goff J.P., Kimura K., Lippolis J.D., Hope J.C. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Vet. Res.* 2004a, 35(6), 681-700, doi:10.1051/vetres:2004040.
10. Bannerman D.D., Paape M.J., Lee J.W., Zhao X., Hope J.C., Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses

following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004b, 11, 463-472, doi: 10.1128/CDLI.11.3.463-472.2004.

11. Bar D., Tauer L.W., Bennett G., González R.N., Hertl J.A., Schukken Y.H., Schulte H.F., Welcome F.L., Gröhn Y.T. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 2008, 91(6), 2205-14, doi: 10.3168/jds.2007-057.

12. Batavani R.A., Asri S., Naebzadeh H. The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iran. J. Vet. Res.* 2007, 8, 205-211, doi: 10.22034/20070302.pdf.

13. Berg L.C., Thomasen P.D., Andersen P.H., Jensen H.E., Jacobsen S. Serum amyloid A is expressed in histologically normal tissues from horses and cattle, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011, 144, 155-159. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.037>

14. Berry E.A., Hillerton J.E., P. Torgerson P. Use of acute phase proteins in bovine milk. British Mastitis Conference, Warwickshire, UK, 2005, 28.

15. Bianchi R.M., Schwartz C.I., de Cecco B.S., Panziera W., De Lorenzo C., Heck L.C., Snel G.G., Lopes B.C., da Silva F.S., Pavarini S.P. Pathological and Microbiological Characterization of Mastitis in Dairy Cows. *Trop. Anim. Health Prod.* 2019, 51, 2057–2066, doi: 10.1007/s11250-019-01907-0.

16. Biggs A. Update on dry cow therapy 1. antibiotic v non-antibiotic approaches. *In Practice* 2017, 39, 255-72, <https://doi.org/10.1136/inp.j2226>.

17. Blank L.M., Hugenholtz P., Nielsen L.K. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci. *J. Mol. Evol.* 2008, 67, 13–22, doi: 10.1007/s00239-008-9117-1.

18. Bochniarz M., Zdzisińska B., Wawron W., Szczubiał M., Dąbrowski R. Milk and serum IL-4, IL-6, IL-10 and amyloid A (MAA, SAA) concentrations in cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative staphylococci (CNS). *J. Dairy Sci.* 2017, 100, 9674-9680, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13552>.

19. Bochniarz M., Szczubiał M., Brodzki P., Krakowski L., Dąbrowski R. Serum amyloid A as an marker of cow's mastitis caused by *Streptococcus* sp. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2020, 72, 101498, doi:10.1016/j.cimid.2020.101498.

20. Bochniarz M., Dąbrowski R., Kocki T., Błaszczuk P., Szczubiał M., Brodzki P., Krakowski L., Turski W.A. Content of tryptophan and kynurenines in serum and milk of dairy cows with mastitis caused by *Streptococcus* spp. *Reprod. Domest. Anim.* 2022, 57 (3), 277-283, <https://doi.org/10.1111/rda.14050>.

21. Bochniarz M., Hahaj-Siembida A., Krajewska-Wędzina M., Osińska M., Tracz A., Trościańczyk A., Brodzki P., Krakowski L., Kosior-Korzecka U., Nowakiewicz A. Cytokine inflammatory response in dairy cows with mastitis caused by *Streptococcus agalactiae*. J. Vet. Res. 2024 a, 23, 68(1), 115-121, doi: 10.2478/jvetres-2024-0002.
22. Bochniarz M., Ziomek M., Szczubiał M., Dąbrowski R., Wochnik M., Kurek Ł., Kosior-Korzecka U., Nowakiewicz A. Interleukin-6 as a Milk Marker of Clinical and Subclinical Intramammary Infections (IMI) in Cows Caused by *Streptococcus* spp. Animals (Basel). 2024b, 4, 14(7), 1100, doi: 10.3390/ani14071100.
23. Bochniarz M., Błaszczuk P., Szczubiał M., Vasiu I., Adaszek Ł., Michalak K., Pietras-Ożga D., Wochnik M., Dąbrowski R. Comparative analysis of total protein, casein, lactose, and fat content in milk of cows suffering from subclinical and clinical mastitis caused by *Streptococcus* spp. J. Vet. Res. 2023, 67 (2), 251-257, <https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0028>
24. Boireau C., Cazeau G., Jarrige N., Calavas D., Madec J.Y., Leblond A., Haenni, M., Gay É. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. J. Dairy Sci. 2018, 101, 9451–9462, doi: 10.3168/jds.2018-14835.
25. Boonyayatra S. Treatment of bovine mastitis during lactating period. Chiang Mai Vet.J. 2012, 10, 87, <https://web.archive.org/web/20180421145542id>.
26. Bolte J., Zhang Y., Wente N. Krömker V. In Vitro Susceptibility of Mastitis Pathogens Isolated from Clinical Mastitis Cases on Northern German Dairy Farms. Vet. Sci. 2020, 7, 10, <https://doi.org/10.3390/vetsci7010010>.
27. Bougarn S., Cunha P., Gilbert F.B., Harmache A., Foucras G., Rainard P. Staphylococcal-associated molecular patterns enhance expression of immune defense genes induced by IL-17 in mammary epithelial cells. Cytokine 2011, 56(3), 749–759, doi: 10.1016/j.cyto.2011.09.020.
28. Boulanger D., Bureau F., Mélotte D., Mainil J., Lekeux, P. Increased nuclear factor kb activity in milk cells of mastitis-affected cows. J. Dairy Sci. 2003, 86(4), 1259-1267, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73710-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73710-2).
29. Bradley A., Green M. Use and Interpretation of Somatic Cell Count Data in Dairy Cows; Use and Interpretation of Somatic Cell Count Data in Dairy Cows. Practice 2005, 27, 310–315. <https://doi.org/10.1136/inpract.27.6.310>.
30. 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. Vet. Rec. 2007, 160, 253–257, <http://dx.doi.org/10.1136/vr.160.8.253>.

31. Breen J. The importance of teat disinfection in mastitis control. *Livestock*, 2019, 24, 122–128, doi:10.12968/live.2019.24.3.122.
32. Carlton W., McGavin M. Identification, control and eradication of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy herds, *Thompson's Special Veterinary Pathology*, 2nd ed. (1995), pp. 537-541.
33. Carvalho-Castro G.A., Silva J.R., Paiva L.V., Custódio D.A., Moreira R.O., Mian G.F., Prado I.A., Chalfun-Junior A., Costa G.M. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. *Braz. J. Microbiol.* 2017, 483, 551-559, doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.004.
34. Cheng W.N., Gu Han S. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 2020, 33(11), 1699–1713, doi: 10.5713/ajas.20.0156.
35. Chockalingam A., Paape M.J., Bannerman D.D. Increased milk levels of transforming growth factor- α , β 1, and β 2 during *Escherichia coli*-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* 2005, 88(6), 1986–1993, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72874-5.
36. CA-SFM-VET. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie—Recommandations Vétérinaires; Société Française de Microbiologie: Paris, France, 2021; p. 15.
37. Clinical and Laboratory Standard Institute Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Second Informational Supplement, 4th ed.; CLSI Document VET01-S2; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2013.
38. Clinical and Laboratory Standard Institute Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, 5th ed.; CLSI supplement VET01S; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.
39. Clinical and Laboratory Standard Institute M100-S31. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement No1 vol. 34 Wayne, PA: CLSI; 2021.
40. Cobirka M., Tancin V., Slama. P. Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals* 2020, 10, 2212, doi: 10.3390/ani10122212.
41. Coculescu B.I. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *J. Med. Life* 2009, 2(2), 114-23, PMID: 20108530; PMCID: PMC3018982.

42. Davies P.L., Leigh J.A., Bradley A.J., Archer S.C., Emes R.D., Green M.J. Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission. J. Clin. Microbiol. 2016, 54, 68–74, doi: 10.1128/JCM.01583-15.
43. Davoodi S., Shahbazi R., Esmaeili S., Sohrabvand S., Mortazavian A-M., Jazayeri S., Taslimi A. Health-Related Aspects of Milk Proteins. Iran J. Pharm. Res. 2016, 15(3), 573-591, PMCID: PMC5149046 PMID: 27980594.
44. De Jong A., Garch F.E., Simjee S., Moyaert H., Rose M., Youala M., Siegwart E. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. Vet. Microbiol. 2018, 213, 73–81, doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.021.
45. De Visscher A., Piepers S., Haesebrouck F., De Vliegher S. Intramammary infection with coagulase-negative staphylococci at parturition: Species-specific prevalence, risk factors, and effect on udder health. J. Dairy Sci. 2016, 99, 6457–69, doi: 10.3168/jds.2015-10458.
46. Dego O.K., Almeida R.A., Saxton A.M., Abdi R.D., Ensermu D.B., Oliver S.P. Bovine intramammary infection associated immunogenic surface proteins of *Streptococcus uberis*. Microb. Pathogenesis 2018, 115, 304-311, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.046>.
47. Denamiel G., Llorente P., Carabella M., Rebuelto M., Gentilini E. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 2005, 52, 125–128, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00830.x>.
48. Down P.M., Bradley A.J., Breen J.E., Green M.J. Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to the treatment of clinical mastitis in dairy cows. Prev. Vet. Med. 2017, 145, 91-99, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.07.006>.
49. Dzierżanowska D. Antybiotykoterapia praktyczna. Wydawnictwo Medyczne Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała, 2018 (wyd. 6), ISBN: 9788375221602.
50. Eckersall P.D., Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. Vet. J. 2010, 185(1), doi:10.1016/j.tvjl.2010.04.009
51. Eckersall P.D., Young F.J., McComb C., Hogarth C.J., Safi S., Weber A., McDonald T., Nolan A.M., Fitzpatrick J.L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis Vet. Rec. 2001, 14, 35-41, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11202551>.

52. Eklund K.K., Niemi K., Kovanen P.T. Immune functions of serum amyloid A, *Crit.Rev. Immunol.* 2012, 32, 335–348, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237509>
53. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 12.0. 2022. Available online: <http://www.eucast.org> (accessed on 5 May 2023).
54. European Commission. EU Action on Antimicrobial Resistance. Available online: https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_en (accessed on 1 March 2023).
55. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15, 613–630, doi: 10.1051/vetres:2003027.
56. Fanelli A., Mantegazza L., Hendrickx S., Capua I. Thermostable Vaccines in Veterinary Medicine: State of the Art and Opportunities to Be Seized. *Vaccines (Basel)*. 2022, 5, 10(2), 245, doi:10.3390/vaccines10020245.
57. Fessia A., Dieser S.A., Raspanti C.G., Odierno L.M. Genotyping and study of adherence-related genes of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Microbial. Pathog.* 2019, 130, 295–301, doi:10.1016/j.micpath.2019.03.027.
58. Fortin M., Messier S., Paré J., Higgins R. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 106–109, doi: 10.1128/JCM.41.1.106–109.2003.
59. Gajdács M., Urbán E., Stájer A., Baráth Z. Antimicrobial resistance in the context of the sustainable development goals: A brief review. *Eur. J. Investig. Health Psychol. Educ.* 2021, 11, 71–82, <https://doi.org/10.3390/ejihpe11010006>.
60. Galal Abdel Hameed K., Sender G., Korwin-Kossakowska A. Public health hazards due to mastitis in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports* 2006, 2, 73–85, Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec Zdrój.
61. Gerardi G., Bernardini D., Elia C.A., Ferrari V., Iob L., Segato S. Use of serum amyloid A and milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Res.* 2009, 76, 411–417, doi:10.1017/S0022029909990057.
62. Godinho K.S., Bramley A.J. The efficacy of teat dips of differing persistence on teat skin in preventing intramammary infection by *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli* in dry cows. *Br Vet J.* 1980, 136(6), 574–9, doi: 10.1016/s0007-1935(17)32137-1.
63. Gomes F., Henriques M. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Curr. Microbiol.* 2016, 72, 377–382, doi:10.1007/s00284-015-0958-8.

64. Gruet P., Maincent P., Berthelot X., Kaltsatos V. Bovine Mastitis and Intramammary Drug Delivery: Review and Perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 50, 245–259, doi: 10.1051/vetres:2003027.
65. Günther J., Czabanska A., Bauer I., Leigh J.A., Holst O., H.M. Seyfert H.M. *Streptococcus uberis* strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages. *Vet. Res.* 2016, 47, 2-14, <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0287-8>.
66. Haenni M., Galofaro L., Ythier M., Giddey M., Majcherczyk P., Moreillon P., Madec J.Y. Penicillin-binding protein gene alterations in *Streptococcus uberis* isolates presenting decreased susceptibility to penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, doi:1140–1145. 10.1016/j.ijmm.2006.11.008.
67. Haenni M., Lupo A., Madec J. Antimicrobial resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiol. Spectr.* 2018, 6, 1–25, doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017.
68. Haenni M., Saras E., Chaussière S., Treilles M., Madec J.Y. *ermB* mediated erythromycin resistance in *Streptococcus uberis* from bovine mastitis. *Vet. J.* 2011, 189, 356–358, doi:10.1016/j.tvjl.2010.06.021.
69. Hagihara J.M., Nishikawa T., Isobe T., Song J., Sugamata Y., Yoshizaki K. IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 314, 363-369, doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.096.
70. Hagiwara K., Yamanaka H., Hisaeda K., Taharaguchi S., Kirisawa R., Iwai H. Concentration of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Vet. Res. Commun.* 2001, 25, 99-108, doi:10.1023/a:1006400801305.
71. Halasa T., Huijps K., Østerås O., Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Q.* 2007, 29, 18–31, doi: 10.1080/01652176.2007.9695224.
72. Harada A., Sekido N., Akahoshi T., Wada T., Mukaida N., Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 1994, 56(5), 559–564. PMID: 7964163.
73. Harjanti D.W., Sambodho P. Effects of mastitis on milk production and composition in dairy cows. The 5th International Seminar on Agribusiness 2019. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 518 (2020) 012032 IOP Publishing doi:10.1088/1755-1315/518/1/012032.

74. Harris T.O., Shelver D.W., Bohnsack J.F., Rubens C.E. A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 61–70, doi:10.1172/JCI16270.
75. Hensler M.E., Quach D., Hsieh C.J., Doran K.S., Nizet V. CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. *Microb. Pathog.* 2008, 44, 84–88, doi:10.1016/j.micpath.2007.08.005.
76. Hill A.W., Finch J.M., Leigh J.A., T.R. Field T.R. Immune modification of the pathogenesis of Streptococcus uberis mastitis in the dairy cow. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1994, 8, 109-118, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1994.tb00432.x>
77. Hillerton J.E., Berry E.A. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2003, 19, 157-169. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00069-5).
78. Hillerton J.E., Booth J.M. The Five-Point Mastitis Control Plan - A Revisory Tutorial! Cambridge, New Zealand, Worcester, United Kingdom <https://www.ruminantia.it/wp-content/uploads/2018/03/NATIONAL-MASTITIS-COUNCIL-2018.pdf>
79. Hogeveen H., Huijps K., Lam T.J. Economic Aspects of Mastitis: New Developments. *N. Z. Vet. J.* 2011, 59, 16–23, doi: 10.1080/00480169.2011.547165.
80. Hommels N., Ferreira F.C., van den Borne B.H., Hogeveen H. Antibiotic use and potential economic impact of implementing selective dry cow therapy in large US dairies, *J. Dairy Sci.* 2021, 104, 8, 8931-8946, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20016>.
81. Hossain M., Paul S., Hossain M., Islam M., Alam M. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 2017, 4, 1030.
82. Huijps K., Lam T.J., Hogeveen H. Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.* 2008, 75, 113-120, doi: 10.1017/S0022029907002932.
83. Hussein H.A., El-Razik K.A., Gomaa A.M., Elbayoumy M.K., Abdelrahman K.A., Hosein H.I. Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Vet. World.* 2018, 11(1), 34-41, doi: 10.14202/vetworld.2018.34-41.
84. Iqomah M., Arisona A., Prasetya I.D., Soedarmanto A., Yanuartono, Indarjulianto S. Mini Review: Lactoferrin-binding protein of Streptococcus in Bovine Mastitis. *BIO Web of Conferences* 49, 01008 (2022), <https://doi.org/10.1051/bioconf/20224901008>.

85. Ismail Z.B. Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Vet. World*, 2017, 10(9), 1057-1062, doi: 10.14202/vetworld.2017.1057-1062.
86. Kabelitz T., Aubry E., van Vorst K., Amon T., Fulde M. The Role of *Streptococcus* spp. in Bovine Mastitis. *Microorganisms* 2021, 9, 1497, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>.
87. Kaczorek E., Małaczewska J., Wójcik R., Rękawek W., Siwicki A.K. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. *J. Dairy Sci.* 2017, 100(8), 6442-6453, doi: 10.3168/jds.2017-12660.
88. Käppeli N., Morach M., Zurfluh K., Corti S., Nüesch-Inderbinen M., Stephan R. Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis. *Front. Vet. Sci.* 2019, 16, 234, doi:10.3389/fvets.2019.00234.
89. Kawecka-Grochowska E., Zalewska M., Rzewuska M., Kościuczek E., Ząbek T., Sakowski T., Marczak S., Bagnicka E. Expression of cytokines in dairy cattle mammary gland parenchyma during chronic staphylococcal infection. *Vet. Res.* 2021, 52, 132, doi:10.1186/s13567-021-01003-y.
90. Keefe G.P. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 2012, 28(2), 203-216, <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>.
91. Kehrli M.E., Harp J.A. Immunity in the Mammary Gland. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 2001, 17, 495–516, doi:10.1016/s0749-0720(15)30003-7.
92. Kehrli M.E., Shuster D.E. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 619–627, [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(94\)76992-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(94)76992-7).
93. Khan I., Hassan A., Abdulmawjood A, Lammler C., Wolter W., Zschock M. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods, *J. Vet. Sci.* 2003, 4(3), 213-223, <https://doi.org/10.4142/jvs.2003.4.3.213>.
94. Kibebew K. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *J. Biol. Agric. Healthc.* 2017, 7, 1–14. <https://core.ac.uk/download/pdf/234662234.pdf>.
95. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in Bioscience* 2008, 13(7), 2400–2407, doi: 10.2741/2853.

96. Köhler W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007, 297, 133–150, doi: 10.1016/j.ijmm.2006.11.008
97. Kowalska-Krochmal B., Dolna I., Dobosz A. Aminoglikozydy – mechanizmy działania i oporność drobnoustrojów. *Forum zakażeń.* 2010, Tom 1, Zeszyt 1-2, 9-14.
98. Kováč G., Tóthová C., Nagy O., Seidel H. Milk amyloid A and selected serum proteins in cows suffering from mastitis. *Acta Vet. Brno* 2011, 80, 3-9, <https://doi.org/10.2754/avb201180010003>.
99. Kovačević Z., Samardžija, M., Horvat, O., Tomanić D., Radinović M. Bijelić K. Vukomanović A.G., Kladar N. Is There a Relationship between Antimicrobial Use and Antibiotic Resistance of the Most Common Mastitis Pathogens in Dairy Cows? *Antibiotics* 2022, 12, 3, doi:10.3390/antibiotics12010003.
100. Kovačević-Filipović M., Ilić V., Vujčić Z., Dojnov B., Stevanov-Pavlović M., Mijačević Z., Božić T. Serum amyloid A isoforms in serum and milk from cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2012, 145, 120-128. 10.1016/j.vetimm.2011.10.015
101. Krawczyk B., Lewandowski K., Bronk M., Samet A., Myjak P., Kur J. Evaluation of a novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Microbiol. Methods* 2003, 52, 341–51, doi:10.1016/S0167-7012(02)00187-2.
102. Krömker V., Leimbach S. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 2017, 52, 21–29, doi:10.1111/rda.13032.
103. Krömker V., Reinecke F., Paduch J.H., Grabowski N. Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis. *Clin. Microbiol.* 2014, 3, 2-7, doi: 10.4172/2327-5073.1000157.
104. Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* 2012, 127(1), 4-22, doi: 10.1177/003335491212700103.
105. Lancefield R.C. A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic *Streptococci*. *J. Exp. Med.* 1933, 57, 571–595.
106. Lahouassa H., Rainard P, Caraty A, Riollot C. Identification and characterization of a new interleukin-8 receptor in bovine species. *Mol. Immunol.* 2008, 45(4), 1153-64. doi: 10.1016/j.molimm.2007.07.011.

107. Lassa H., Kubiak J., Małkińska-Horodyska M. Bakterie najczęściej izolowane z klinicznych postaci mastitis u krów oraz ich wrażliwość na antybiotyki. *Życie Wet.* 2013, 88(8), 651-653.
108. Leigh J.A. *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet. J.* 1999, 157, 225-238, <https://doi.org/10.1053/tvj.1998.0298>.
109. Leslie K.E., Petersson-Wolfe C.S. Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2012, 28, doi: 289-30510.1051/vetres:2003027.
110. Malinowski E., Gajewski Z. Charakterystyka zapaleń gruczołu mlekowego u krów wywoływanych przez odżywnościowe patogeny człowieka. *Życie Wet.* 2009, 84, 290-294.
111. Malinowski E., Gajewski Z., Pawliński B., Nagas T., Perzyna M. Zapobieganie colimastitis u krów. *Życie Weterynaryjne* 2011, 86 (2), 114-117.
112. Markiewicz Z., Kwiatkowski A. Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawca PWN, Warszawa, 2018. ISBN: 9788301148607.
113. Martin P., Barkema H.W., Brito L.F., S.G. Narayana S.G., Miglior F. Symposium review: Novel strategies to genetically improve mastitis resistance in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2018, 101(3), 2724-2736.
114. Matthews K.R., Almeida R.A., Oliver S.P. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* 1994, 62(12), 5641-5646, doi: 10.1128/iai.62.12.5641-5646.1994.
115. McDonald T.C., Larson M.A., Mack D.R., Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A(M-SAA3) into colostrum, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001, 3, 203-211. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00380-4).
116. McDougall S., Hussein H., Petrovski, K. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *N. Z. Vet. J.* 2013, 62(2), 68-76, <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.843135>.
117. Medrano-Galarza C., Gibbons J., Wagner S., de Passillé A.M., Rushen J. Behavioral changes in dairy cows with mastitis. *J. Dairy Sci.* 2012, 95(12), <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5247>.
118. Mestrovic T., Aguilar G.R., Swetschinski L.R., Ikuta K.S., Gray A.P., Weaver N.D., Han C., Wool E.E., Hayoon A.G., Hay S.I. The burden of bacterial antimicrobial

resistance in the WHO European region in 2019: A cross-country systematic analysis. *Lancet Public Health* 2022, 7, 897–913, [10.1016/S2468-2667\(22\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(22)00225-0).

119. Minst K., Märklbauer E., Miller T., Meyer C. Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *J. Dairy Sci.* 2012, 95, 6957–6962, [doi:10.3168/jds.2012-5852](https://doi.org/10.3168/jds.2012-5852)
120. Monistero V., Barberio A., Cremonesi P., Castiglioni B., Morandi S., Lassen D.C., Astrup L.B., Locatelli, C., Piccinini, R., Addis M.F. Genotyping and Antimicrobial Susceptibility Profiling of *Streptococcus uberis* Isolated from a Clinical Bovine Mastitis Outbreak in a Dairy Farm. *Antibiotics* 2021, 10, 644, [doi: 10.3390/antibiotics10060644](https://doi.org/10.3390/antibiotics10060644).
121. Mora M., Bensi G., Capo S., Falugi F., Zingaretti C., Manetti A.G., Maggi T., Taddei A.R., Grandi G., Telford J.L. Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 15641–15646, [doi: 10.1073/pnas.0507808102](https://doi.org/10.1073/pnas.0507808102).
122. Morales-Ubaldo A.L., Rivero-Perez N., Valladares-Carranza B., Velázquez-Ordoñez V., Delgadillo-Ruiz L., Zaragoza-Bastida A. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Vet. Anim. Sci.* 2023, 24, 21, 100306, [doi: 10.1016/j.vas.2023.100306](https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306).
123. Morrow J.E., Stearman R.S., Peltzman C.G., Potter D.A. Induction of hepatic synthesis of serum amyloid A protein and actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78, 4718-4722, [doi: 10.1073/pnas.78.8.4718](https://doi.org/10.1073/pnas.78.8.4718).
124. Murata H., Shimada N., Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnostic: an overview, *Vet. J.* 2004, 168, 28-40, [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9).
125. National Mastitis Council. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4th ed. (2004), NMC, Madison, WI.
126. Nazifi S., Khoshvaghti A., Gheisari H.R. Evaluation of serum and milk amyloid A in some inflammatory diseases of cattle. *Iran J. Vet. Res.* 2008, 9, 222-226, <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20210616100638>.
127. Neculai-Valeanu A.S., Ariton A.M. Udder Health Monitoring for Prevention of Bovine Mastitis and Improvement of Milk Quality. *Bioengineering* 2022, 9, 608, [doi: 10.3390/bioengineering9110608](https://doi.org/10.3390/bioengineering9110608).
128. Nizet V. Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends. Microbiol.* 2002, 10, 575–580, [doi:10.1016/s0966-842x\(02\)02473-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02473-3).

129. Novac C.S., Andrei S. The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review. *Pathogens* 2020, 9(11), 882, <https://doi.org/10.3390/pathogens9110882>.
130. Obszańska K., Kern-Zdanowicz I., Sitkiewicz I. Mechanizmy wirulencji paciorkowców β -hemolizujących. *Post. Mikrobiol.* 2014, 53 (2), 101–111.
131. Odierno L., Calvino L., Traversa P., Lasagno M., Bogni C., Reinoso E. Conventional Identification of *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Argentinean Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* 2006, 89(10), 3886-90, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72431-6.
132. Olde Riekerink R.G., Barkema H.W., Kelton D.E., Scholl D.T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 2008, 91, 1366–1377, <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
133. Oliver S.P., Pighetti G.M., MASTITIS PATHOGENS | Environmental Pathogens, Encyclopedia of Dairy Sciences, Elsevier, 2002, 1728-1734, <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00286-8>.
134. Osman, K.M., Hassan H.M., Ibrahim I.M., Mikhail M.M. The impact of staphylococcal mastitis on the level of milk IL-6, lysozyme and nitric oxide. *Comp. Immunol. Microb.* 2010, 33, 85-93, doi: 10.1016/j.cimid.2008.08.009.
135. Østerås O., Sølverød L., Reksen O. Milk culture results in a large Norwegian survey - effects of season, parity, days in milk, resistance and clustering, *J. Dairy Sci.* 2006, 89, 1010-1023, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72167-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1).
136. Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcón J.J., Cajero-Juárez M., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Bravo-Patiño A., Baizabal-Aguirre V.M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 2007, 54(4), 399-409, doi: 10.1016/j.jinf.2006.06.010.
137. Paape M.J., Shafer-Weaver K., Capuco A. V., Van Oostveldt K., Burvenich C. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000, 480, 259–277, https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_31.
138. Paduch J.H., Mohr E., Krömker V. The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. *J. Dairy Res.* 2013, 80(2), 159-64, doi: 10.1017/S0022029913000046.

139. Palanivel K.M., Suresh R.V., Jayakumar R. Ganesan P.I., Dhanapalan P. Retrospective study of sub-clinical mastitis in buffaloes. *Indian J. Vet. Med.* 2008, 28, 34–36.
140. Pascu C., Herman V., Iancu I., Costinar L. Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania. *Antibiotics* 2022, 11, 57, doi: 10.3390/antibiotics11010057.
141. Patterson M.J. Streptococcus. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 13. PMID: 21413248.
142. Persson Y., Nyman A.K., Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 2011, 53, 36, doi: 10.1016/j.ijmm.2006.11.008.
143. Petersen H.H., Nielsen J.P., Heegaard P.M., Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 2004, 35, 163-187. doi: 10.1051/vetres:2004002.
144. Pitkälä A., Koort J., Björkroth J. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *J. Dairy Sci.* 2008, 91(10), 4075-81, doi: 10.3168/jds.2008-1040.
145. Puerto M.A., Shepley E., Cue R.I., Warner D., Dubuc J., Vasseur E. The Hidden Cost of Disease: I. Impact of the First Incidence of Mastitis on Production and Economic Indicators of Primiparous Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 2021, 104, 7932–7943, doi:10.1080/00480169.2011.547165.
146. Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K., Carter G.R. Bacterial causes of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 8th ed.; Mosby International Ltd. London, UK, 2002, pp. 465–475.
147. Rainard P., Foucras G., Martins R.P. Adaptive Cell-Mediated Immunity in the Mammary Gland of Dairy Ruminants. *Front. Vet. Sci.* 2022, 5, 9, 854890, doi: 10.3389/fvets.2022.854890.
148. Rainard P., Riollot C. Innate Immunity of the Bovine Mammary Gland. *Vet. Res.* 2006, 37 (3), 369–400, doi: 10.1051/vetres:2006007.
149. Rambeaud M., Almeida R.A., Pighetti G.M., Oliver S.P. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003, 96, 2003, 193-205, <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.08.008>.

150. Rato M.T., Bexiga R., Nunes S.F., Cavaco L.M., Vilela C.L., Santos-Sanches I. Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. J. Dairy Sci. 2008, 91, 4542-4551, <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0907>.
151. Reygaert W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol. 2018, 26, 4(3), 482-501, doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
152. Riollet C., Rainard P., Poutrel B. Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. In: Mol J.A., Clegg R.A., editors. Biology of the Mammary Gland. Springer; Boston, MA, USA 2002, pp. 247–258. Advances in Experimental Medicine and Biology.
153. Rowe S., Kabera F., Dufour S., Godden S., Roy J.P., Nydam D. Selective dry-cow therapy can be implemented successfully in cows of all milk production levels. J. Dairy Sci. 2023, 106(3), 1953-1967, doi: 10.3168/jds.2022-22547.
154. Ruegg P.L. The Role of Hygiene in Efficient Milking. WCDS Advances in Dairy Technology 2006, 18, 285-293, https://wcds.ualberta.ca/wp-content/uploads/sites/57/wcds_archive/Archive/2006/Manuscripts/Ruegg.pdf.
155. Ruegg P.L. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. J. Anim. Sci. 2009, 87(13), 43-55, doi: 10.2527/jas.2008-1217.
156. Ruegg P.L. New perspectives in udder health management. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2012, 28, 149-163, <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.001>.
157. Ruegg P.L. A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. J. Dairy Sci. 2017, 100, 10381-97, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.
158. Sack G.H. Serum amyloid A – a review. Molecular Medicine 2018, 24, 46. DOI: 10.1186/s10020-018-0047-0.
159. Saco Y., Bassols A. Acute phase proteins in cattle and swine: A review. 2022, 52(1), 50-63, <https://doi.org/10.1111/vcp.13220>.
160. Schukken Y., Wilson D., Welcome F., Garrison-Tikofsky L. Monitoring Udder Health and Milk Quality Using Somatic Cell Counts. Vet. Res. 2003, 34, 579–596, doi: 10.1051/vetres:2003028.
161. Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F. Production Effects Related to Mastitis and Mastitis Economics in Dairy Cattle Herds. Vet. Res. 2003, 34, 475–491, doi: 10.1051/vetres:2003027.
162. Shaheen M., Tantary H., Nabi S. A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic

management, prevention and control strategy. *Adv. Dairy Res.* 2016, 4, 1, doi: 10.4172/2329-888X.1000150.

163. Sharmila D., Mythili R., Tijo Ch., Dineshkumar R., Sivaraman G.K., Jayakumar R., Prathaban M., Duraimurugan M., Chandrasekar V., Willie J.G.M., Peijnenburg V. Overview of antimicrobial resistance and mechanisms: The relative status of the past and current. *The Microbe* 2024, (3), 100083, <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100083>.

164. Sherwin G., Breen J. Streptococcus uberis-associated mastitis in dairy herds: dealing with outbreaks and improving control. In *Practice* 2022, 44(1), 32-44, <https://doi.org/10.1002/inpr.166>.

165. Shuster D.E., Lee E.K., Stevens M.G. Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. *A. J. Vet. Res.* 1993, 54, 80-85, PMID: 8427476.

166. Shuster D.E., Kehrli M.E., Rainard P., Paape M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1997, 65(8), 3286-92, doi: 10.1128/iai.65.8.3286-3292.1997.

167. Siivonen J., Taponen S., Hovinen M., Pastell M., Lensink B.J., Pyörälä S., Hänninen L. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2011, 132, doi: 101-106. 10.1051/vetres:2003027.

168. Silva M.R., da Silva M.R., Nunes Neves C.L., Silva D., Araújo Machado F., Santos de Sousa A.P., Pereira L.M. Effects of pre-dipping and post-dipping protocol on the incidence of bovine mastitis. *Scientific Electronic Archives*, 2023, 16(11). <https://doi.org/10.36560/161120231804>.

169. Soehnlein O., Zernecke A., Eriksson E.E., Rothfuchs A.G., Pham C.T., Herwald H., Bidzhekov K., Rottenberg M.E., Weber C., Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 2008, 112(4), 1461-71, doi: 10.1182/blood-2008-02-139634.

170. Soler L., Dąbrowski R., García N., Alava M.A., Lampreave F., Piñeiro M., Wawron W., Szczubiał M., Bochniarz M. Acute-phase inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) levels in serum and milk of cows with subclinical mastitis caused by *Streptococcus* species and coagulase-negative *Staphylococcus* species. *J. Dairy Sci.* 2019, 102(1), 539-546, doi: 10.3168/jds.2018-14953.

171. Sordillo L.M., Shafer-Weaver K., DeRosa D. Immunobiology of the Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 1997, 80(8), 1851-1865, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76121-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6).

172. Stasiak M., Maćkiw E., Kowalska J., Kucharek K., Postupolski J. Silent Genes. Antimicrobial Resistance and Antibiotic Production. Pol. J. Microbiol. 2021, 70, 421–429, doi: 10.33073/pjm-2021-040.
173. Stein B.N., Gamble J.R., Pitson S.M., Vadas M.A., Khew-Goodall Y. Activation of endothelial extracellular signal-regulated kinase is essential for neutrophil transmigration: Potential involvement of a soluble neutrophil factor in endothelial activation. J. Immunol. 2003, 171(11), 6097-6104, doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6097.
174. Szczypa K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I. Mechanizmy wirulencji *Streptococcus pyogenes*. Post. Mikrobiol. 2012, 51, 1, 3-15, <http://am-online.org/web/archiwum/vol5112012003.pdf>.
175. Szewczyk E. „Diagnostyka bakteriologiczna” pod red. naukową Eligii Szewczyk, wydanie III, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2020.
176. Tenhagen T.A., Hansen I., Reinecke A., H. Heuwieser H. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. J. Dairy Sci. 2009, 76, 179-187, doi: 10.1016/j.ijmm.2006.11.008.
177. Tian X.Y., Zheng N., Han R.W., Ho H., Wang J., Wang Y.T., Wang S.Q., Li H.G., Liu H.W., Yu Z.N. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Streptococcus* isolated from dairy cows with mastitis in China. Microb. Pathog. 2019, 131, 33–39. doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.035.
178. Tomanić D., Samardžija M., Kovačević Z. Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review. Antibiotics 2023, 12(4), 683, <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>
179. Tomazi T., Freu G., Alves B.G., de Souza Filho A.F., Heinemann M.B., Veiga Dos Santos M. Genotyping and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine clinical mastitis. PLoS ONE 2019, 14, e0223719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223719>.
180. Tommasoni C., Fiore E., Lisuzzo A., Ganesella M. Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. Animals 2023, 13, 2538, <https://doi.org/10.3390/ani13152538>.
181. Tóthová C.S., Nagy O., Seidel H., Kováč G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. Vet. Med. Czech. 2014, 59, 163-180, doi: 10.17221/7478-VETMED.
182. Torres G., Macias D., Reyes-Vélez J., Rios-Agudelo P., Caraballo-Guzmán A. *Streptococcus agalactiae* virulence factors isolated from bovine mastitis and antibiotic

- treatment response. J. Appl. Microbiol. 2023, 134(6), lxad116. doi: 10.1093/jambio/lxad116.
183. Trela M., Domańska D., Witkowska-Piłaszewicz O. Diagnostic Use of Serum Amyloid A in Dairy Cattle. Agriculture 2022, 12(4), 459, <https://doi.org/10.3390/agriculture12040459>.
 184. Ward P.N., M.T. Holden, J.A. Leigh, N. Lennard, A. Bignell, A. Barron, L. Clark, M.A. Quail, J. Woodward, B.G. Barell, S.A. Egan, T.R. Field, D. Maskell, M. Kehoe, C.G. Dowson, N. Chanter, A.M. Whatmore, S.D. Bentley, J. Parkhill, Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*, BMC Genomics 10 (2009), 54-71, doi: 10.1186/1471-2164-10-54.
 185. Watanabe A., Yagi Y., Shiono H., Yokomizo Y., Inumaru S. Effects of intramammary infusions of interleukin-8 on milk protein composition and induction of acute-phase protein in cows during mammary involution. Can. J. Vet. Res. 2008, 72(3), 291-6. PMID: 18505194; PMCID: PMC2327244.
 186. Wataradee S., Boonserm T., Samngamnim S., Ajariyakhajorn K. Characterization of Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus agalactiae* Associated with Bovine Mastitis Cases in Thailand. Animals 2024, 14(3), 447, <https://doi.org/10.3390/ani14030447>.
 187. Whist A.C., Østerås O., Sølverød L., *Streptococcus dysgalactiae* isolates at calving and lactation performance within the same lactation, J. Dairy Sci. 2007, 90, 766-778, [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(07\)71561-8/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(07)71561-8/pdf).
 188. Winter P., Fuchs K., Walseh K., Colditz I.G. 2003. Production of serum amyloid A in serum and milk during experimental *Staphylococcus epidermidis* mastitis in ewes. Res. Vet. Sci. 2003, 81, 321-326, doi: 10.1136/vr.152.18.558.
 189. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A., Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2015, 112, 5649–5654, doi: 10.1073/pnas.1503141112.
 190. Verbeke J., Piepers S., Supre K., De Vliegher S. Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. J. Dairy Sci. 2014, 97, 6926-6934, <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8173>.
 191. Vezina, B.; Al-harbi, H.; Ramay, H.R.; Soust, M.; Moore, R.J.; Olchoway, T.W.; Alawneh, J.I. Sequence characterisation and novel insights into bovine mastitis-associated *Streptococcus uberis* in dairy herds. Sci. Rep. 2021, 11, 3046, doi: 10.1038/s41598-021-82357-3.

192. Vitenberga-Verza Z., Pilmane M., Šerstņova K., Melderis I., Gontar Ļ., Kochański M., Drutowska A., Maróti G., Prieto-Simón B. Identification of Inflammatory and Regulatory Cytokines IL-1 α -, IL-4-, IL-6-, IL-12-, IL-13-, IL-17A-, TNF- α -, and IFN- γ -Producing Cells in the Milk of Dairy Cows with Subclinical and Clinical Mastitis. *Pathogens* 2022, 17, 11(3), 372, doi: 10.3390/pathogens11030372.
193. Zadoks R.N. Sources and epidemiology of *Streptococcus uberis*, with special emphasison mastitis in dairy cattle. *CAB Reviews*, 2007, 2, doi:15.10.1016/j.ijmm.2006.11.008.
194. Zadoks R.N., Middleton J.R., McDougall S., Katholm J., Schukken Y.H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*. 2011, 16(4), 357-72, doi: 10.1007/s10911-011-9236-y.
195. Zhang H., Issekutz A.C. Down-regulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor. *Am. J. Pathol.* 2002, 160, 2219-2230, doi: 10.1016/S0002-9440(10)61169-8.
196. Zhang T., Niu G., Boonyayatra S., Pichpol D. Antimicrobial resistance profiles and genes in *Streptococcus uberis* associated with bovine mastitis in Thailand. *Front. Vet. Sci.* 2021, 8, <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.705338>.
197. Zhang H., Yang F., Li X.-P., Luo J.-Y., Wang L., Zhou Y.-L., Yan Y., Wang X.-R., Li H.S. Detection of antimicrobial resistance and virulence-related genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from clinical bovine mastitis cases in northwestern China. *J. Integr. Agric.* 2020, 19, 2784–2791, doi: 10.1016/S2095-3119(20)63185-9.
198. Zhao X., Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 2008, 86, 57–65, doi: 10.2527/jas.2007-0302.
199. Zhylkaidar A., Oryntaev K., Altenov A., Kylpybai E., Chayxmet E. Prevention of Bovine Mastitis through Vaccination. *Arch. Razi Inst.* 2021, 76, 1381, doi: 10.22092/ari.2021.356008.1764.
200. Zigo F., Vasil M., Ondrašovičová S., Výrostková J., Bujok J., Pecka-Kielb E. Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Front. Vet. Sci.* 2021, 8, 607311, doi: 10.3389/fvets.2021.607311.

201. Zouharova M., Nedbalcova K., Slama P., Bzdil J., Masarikova M., Matiasovic J. Occurrence of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine mastitis Vet. Med. 2022, 67, 123–130, <https://doi.org/10.17221/95/2021-VETMED> .