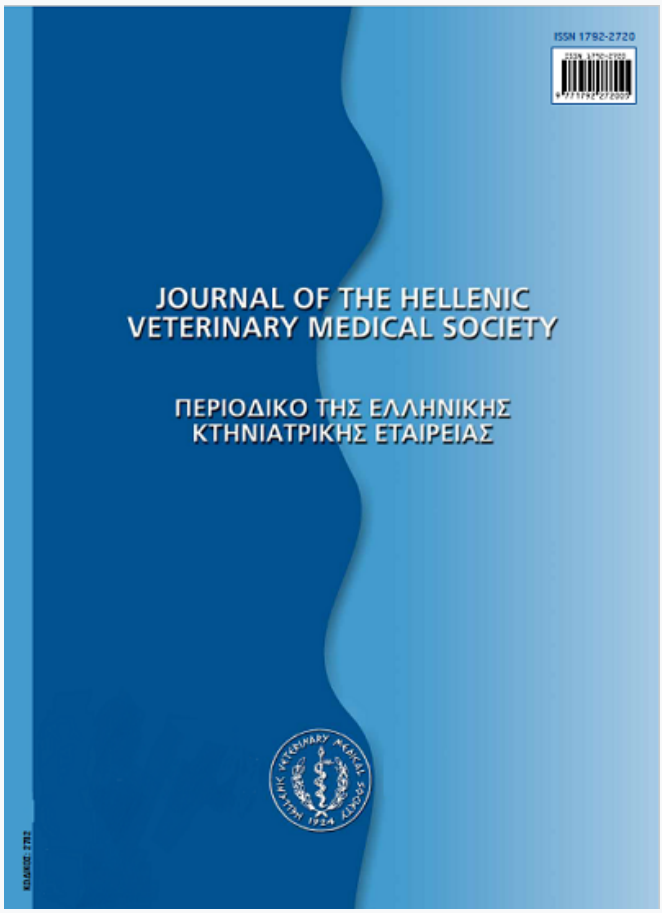
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 56, No 2 (2005)



Outbreak of mastitis in ewes caused by Streptococcus agalactiae

A. ZDRAGAS (Α. ΖΔΡΑΓΚΑΣ), P. TSAKOS (Π. ΤΣΑΚΟΣ), C. KOTZAMANIDIS (Χ. ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ), K. ANATOLIOTIS (Κ. ΑΝΑΤΟΛΙΩΤΗΣ), I. TSAKNAKIS (Η. ΤΣΑΚΝΑΚΗΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15075

To cite this article:

ZDRAGAS (Α. ΖΔΡΑΓΚΑΣ) A., TSAKOS (Π. ΤΣΑΚΟΣ) P., KOTZAMANIDIS (Χ. ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ) C., ANATOLIOTIS (Κ. ΑΝΑΤΟΛΙΩΤΗΣ) K., & TSAKNAKIS (Η. ΤΣΑΚΝΑΚΗΣ) I. (2017). Outbreak of mastitis in ewes caused by Streptococcus agalactiae. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *56*(2), 114–121. https://doi.org/10.12681/jhvms.15075

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 23/01/2026 12:33:28

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2005, 56(2): 114-121
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2005, 56(2): 114-121

Ερευνητική
Original article

Ο *Streptococcus agalactiae* ως αιτιολογικός παράγοντας σφοδρής κλινικής μαστίτιδας προβάτων

Α. Ζδράγκας[1], Π. Τσάκος[2], Χ. Κοτζαμανίδης[3], Κ. Ανατολιώτης[2], Η. Τσακνάκης[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Μελετήθηκαν μαζικά κρούσματα οξείας κλινικής μαστίτιδας σε πρόβατα από επτά ποίμνια, που βρίσκονται στην ίδια περιοχή του Ν. Λάρισας. Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου ταυτοποιήθηκε ως ο *Streptococcus agalactiae* με βάση τις βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές. Επιπλέον, εφαρμογή της ανοσοπλεκτροφόρησης του παλλόμενου πεδίου (PFGE) σε αντιπροσωπευτικά στελέχη έδειξε πλήρη ομοιότητα των εξεταζόμενων στελεχών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο *S. agalactiae* πρέπει να θεωρείται σημαντικό παθογόνο αίτιο πρόκλησης μαστίτιδας των προβατίνων, που χαρακτηρίζεται από υψηλή νοσηρότητα, εύκολη μετάδοση και ταχεία μείωση της γαλακτοπαραγωγής. Η αντιμικροβιακή θεραπεία ήταν αναποτελεσματική, ακόμη και με αντιβιοτικά στα οποία τα στελέχη του *S. agalactiae* ήταν ευαίσθητα στο αντιβιόγραμμα, ενώ η χορήγηση αυτεμβολίου αποδείχθηκε ιδιαίτερα ελπιδοφόρος.

Λέξεις ευρετηρίασης: μαστίτιδα, *Streptococcus agalactiae*, πρόβατα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μαστίτιδα αποτελεί μεγάλο πρόβλημα για την προβατοτροφία, επειδή μειώνει την ποσότητα, αλλά και την ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος. Πάνω από 100 μικροβιακά είδη απομονώθηκαν από το μαστικό αδένα του προβάτου (Tripathi 1987). Το *Mycoplasma agalactiae* (Jones 1983, DaMassa 1983, Lambert 1987, Kindle και συν. 1994), ο *Staphylococcus aureus*, οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (Jensen και Swift 1982, Fthenakis και συν. 1994, de Santis και συν. 1998, Bergonier και συν. 2003) και η *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (El Massanat και συν. 1991),

[1] Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας.
[2] Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων, Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης.
[3] Τμήμα Βιομηχανικής Μικροβιολογίας, Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης.

Ημερομηνία υποβολής: 10.05.2005
Ημερομηνία εγκρίσεως: 21.07.2005

Outbreak of mastitis in ewes caused by *Streptococcus agalactiae*

Zdragas A.[1], Tsakos P.[2], Kotzamanidis C.[3], Anatoliotis K.[2], Tsaknakis I.[2]

ABSTRACT. Many cases of acute clinical mastitis, in seven neighboring sheep flocks of Larissa Prefecture, were investigated. The causative agent was identified by biochemical and serological tests as *Streptococcus agalactiae*. Further investigation of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) revealed identical profiles. The results indicate that *S. agalactiae* should be considered as a significant pathogen that induces mastitis in ewes; the disease is characterized by high morbidity, easy transmission between ewes and rapid reduction in milk production. The antibiotic therapy proved to be ineffective, even though antibiotics administered after the sensitivity test, however, the administration of an autovaccine was promising.

Keywords: mastitis, *Streptococcus agalactiae*, sheep

INTRODUCTION

Ovine mastitis represents a major problem for milking sheep farmers, because it reduces the amount and quality of milk production. More than 100 microbial species have been isolated from the mammary glands of ewes (Tripathi 1987). *Mycoplasma agalactiae* is a particularly common agent for most cases of mycoplasmal mastitis (Jones 1983; DaMassa 1983; Lambert 1987; Kindle et al. 1994). *Staphylococcus aureus*, the coagulase negative staphylococci (Jensen and Swift 1982; Fthenakis et al. 1994; de Santis et al. 1998; Bergonier et al. 2003) and *Mannheimia (Pasteurella)*

[1] Veterinary Research Institute of Thessaloniki, National Agricultural Research Foundation.
[2] Institute of Infectious and Parasitic Diseases, Center of Veterinary Institutes of Thessaloniki.
[3] Laboratory of Industrial Microbiology, Hellenic Sugar Industry.

Submission date: 10.05.2005
Approval date: 21.07.2005

θεωρούνται τα πιο σημαντικά παθογόνα αίτια για την πρόκληση μαστίτιδας στα πρόβατα.

Μέλη του γένους των στρεπτόκοκκων, που προκαλούν μαστίτιδες στα πρόβατα, είναι ο *Streptococcus agalactiae* (Keefe 1997), ο *Streptococcus dysgalactiae* (Scott 2000), ο *Streptococcus uberis* (Shouman και συν. 1986) και πρόσφατα ο *Streptococcus zooepidemicus* (Las Heras και συν. 2002). Ο *S. agalactiae* θεωρείται αυστηρά ενδομαστικό παθογόνο, αλλά μπορεί μερικώς να επιβιώσει στο περιβάλλον ή στο δέρμα των ζώων (Keefe 1997). Σε εκτροφές με ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής, οι περιβαλλοντικές μολύνσεις ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Μετά την είσοδο στο μαστικό αδένα, ο *S. agalactiae* πολλαπλασιάζεται και εισβάλλει στο γαλακτοφόρο πόρο, απ' όπου εισέρχεται στο λεμφικό σύστημα και στα υπερμαστικά λεμφογάγγλια (Fox και Gay 1993, Keefe 1997). Στις βιβλιογραφικές αναφορές ο *S. agalactiae* θεωρείται σημαντικό παθογόνο για το μαστό του προβάτου, με χαμηλά όμως ποσοστά απομόνωσης, 3% (Saeter και Einland 1961), 4% (Fleischer 1975), 2% (Krzyzanowski και συν. 1983), 6,8% (Lafi και συν. 1998), 3,1% (Ariznabarreta και συν. 2002), μέχρι 17 % (Korukov 1998). Επίσης, ο S. agalactiae έχει περιγραφεί σαν αίτιο χρόνιας μαστίτιδας στις αίγες (Tripathi και Chattopadhyay 1993) και σποραδικά σαν αίτιο κλινικής μαστίτιδας στα βοοειδή (Andersen και συν. 2003). Το συγκεκριμένο παθογόνο προκαλεί στα πρόβατα ελαφριάς μορφής μαστίτιδα με χαμηλά ποσοστά μόλυνσης (Kirk και συν. 1996), η οποία εμφανίζεται σε χαμηλή συχνότητα στην ίδια εκτροφή, είτε από μόνο του ή μαζί με άλλα παθογόνα.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να διερευνήσει μια ιδιαίτερα σοβαρή, σφοδρού χαρακτήρα, κλινική μαστίτιδα σε πρόβατα, που οφείλεται στο *S. agalactiae* και συνοδεύεται από ασυνήθη υψηλή νοσηρότητα και εύκολη μετάδοση με μεγάλες οικονομικές απώλειες, λόγω της μείωσης του παραγόμενου γάλακτος.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων ετών παρατηρήθηκαν πολλά κρούσματα οξείας κλινικής μαστίτιδας στην περίοδο των τοκετών σε 7 ποίμνια μεγέθους 350 - 900 προβάτων. Η νόσος εμφανίστηκε κατ' αρχήν στην εκτροφή Α (πίνακας 1) σε μια προβατοτροφική περιοχή του Ν. Λάρισας. Η μόλυνση εξαπλώθηκε σε 6 γειτονικές εκτροφές μέσα σε χρονικό διάστημα 6 μηνών, κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα. Οι εκτροφές αυτές είναι σχεδόν κλειστές, εντατικής μορφής από το Σεπτέμβριο μέχρι το Μάιο του επόμενου χρόνου και στα ζώα χορηγείται καλαμπόκι, κριθάρι, πούλπα ζαχαροτεύτλων, μηδική και άχυρο, ενώ

haemolytica (El-Massanat et al. 1991) are the most important pathogens responsible for mastitis in ewes.

Streptococci are important pathogens responsible for mastitis in small ruminants. The causative agents are *Streptococcus agalactiae* (Keefe 1997), *Streptococcus dysagalactiae* (Scott 2000), *Streptococcus uberis* (Shouman et al. 1986) and the more recently identified *Streptococcus equi subsp.zooepidemicus* (Las Heras et al. 2002). On one hand, *S. agalactiae* is considered to be a strictly intramammary pathogen, but on the other hand it can also survive to a limited extent in the environment or on the animal's skin (Keefe 1997). The environmental sources of infection may be important in flocks with poor hygienic conditions. After entering the mammary gland, *S. agalactiae* multiplies and invades the lactiferous ducts and passes through the duct walls into the lymphatic system and the supramammary lymph nodes (Fox and Gay 1993; Keefe 1997). Numerous publications indicate that *S. agalactiae* is a mammary gland pathogen in small ruminants, confirmed though by low isolation rates, e.g. 3% (Saeter and Einland 1961), 4% (Fleischer 1975), 2% (Krzyzanowski et al. 1983), 6.8% (Lafi et al. 1998), 3.1% (Ariznabarreta et al. 2002), 17% (Korukov 1998). Furthermore, mastitis, caused by *S. agalactiae,* has been also described as a spontaneous chronic mastitis in goats (Tripathi and Chattopadhyay 1993) and on few occasions as a clinical mastitis in different bovine herds (Andersen et al. 2003). The pathogen has also been isolated in sheep, where it usually appears in low frequency in the same herd, either alone or with other pathogens, and it causes a low number of infections with mild mastitis (Kirk et al. 1996).

The objective of this study was to investigate a severe outbreak of clinical mastitis in ewes, which was easily transmitted, resulted in an unusually high morbidity rate and caused economic losses due to milk reduction. The agent of this outbreak was *S. agalactiae*.

MATERIALS AND METHODS

In the last two years, a severe clinical mastitis occurred in seven flocks of sheep (350–900 heads per flock; see table 1) at the onset of the lambing period. Initially, the disease was detected in flock A (table-1), in a sheep milk productive area of the municipality of Larissa. Within six months, the infection spread to six other farms. The sheep were kept in close farms from September to May. They were fed corn, barley, fresh pulpous of sugar beets, alfalfa and straw, and allowed to graze in the same pastures, 3-4 hours per day. Overall, the hygienic conditions were poor; in addition, three times per day, ewes were hand milked. In the summer months, all flocks were moved to the Pindos mountain chain (Samarina-village) grazing only in the open

Πίνακας 1. Αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων στα δείγματα γάλακτος

Εκτροφές	Μέγεθος ποιμνίου	% ασθενών προβάτων	Αριθμός δειγμάτων γάλακτος	«Καθαρές» καλλιέργειες *S. agalactiae* (%)	Καλλιέργειες *S. agalactiae* σε συνδυασμό με άλλα βακτήρια*(%)	Άλλα βακτήρια* (%)	Αρνητικές (στείρες) καλλιέργειες (%)
A	700	42,8	25	11 (44,0)	9 (36,0)	5 (20,0)	0 (0)
B	850	42,3	20	15 (75,0)	5 (25,0)	0 (0)	0 (0)
C	400	37,5	10	9 (90,0)	1 (10,0)	0 (0)	0 (0)
D	830	54,2	16	10 (62,5)	0 (0)	6 (37,5)	0 (0)
E	350	34,3	12	9 (75,0)	1 (8,33)	1 (8,33)	1 (8,33)
F	470	14,9	9	5 (55,5)	0 (0)	1 (11,11)	3 (33,33)
G	900	50,0	20	12 (60,0)	5 (25,0)	3 (15,0)	0 (0)
Μ.Ο.	642,8	39,4	16	10,1 (66)	3,0 (14,9)	2,3 (12,9)	0,5 (5,9)
± Τ.Α.	± 87,5	± 4,8	± 2,2	± 1,2 (5,7)	± 1,3 (5,2)	± 0,9 (5,6)	± 0,4 (4,7)
ΣΥΝΟΛΟ	4500	1900	112	71	21	16	4

**Staphylococcus* spp, *Pasteurella multocida, Corynebacterium* spp, *E. coli*, *Klebsiella* spp.

Table 1. Results of the bacteriological cultures obtained from ewes milk specimens

Flocks	Flock size	% of diseased ewes	Number of milk samples	Pure cultures *S. agalactiae* (%)	Cultures of *S. agalactiae* in combination with other bacteria*(%)	Other bacteria* (%)	Negative cultures (%)
A	700	42,8	25	11 (44,0)	9 (36,0)	5 (20,0)	0 (0)
B	850	42,3	20	15 (75,0)	5 (25,0)	0 (0)	0 (0)
C	400	37,5	10	9 (90,0)	1 (10,0)	0 (0)	0 (0)
D	830	54,2	16	10 (62,5)	0 (0)	6 (37,5)	0 (0)
E	350	34,3	12	9 (75,0)	1 (8,33)	1 (8,33)	1 (8,33)
F	470	14,9	9	5 (55,5)	0 (0)	1 (11,11)	3 (33,33)
G	900	50,0	20	12 (60,0)	5 (25,0)	3 (15,0)	0 (0)
M.O.	642,8	39,4	16	10,1 (66)	3,0 (14,9)	2,3 (12,9)	0,5 (5,9)
± T.A.	± 87,5	± 4,8	± 2,2	± 1,2 (5,7)	± 1,3 (5,2)	± 0,9 (5,6)	± 0,4 (4,7)
TOTAL	4500	1900	112	71	21	16	4

**Staphylococcus* spp, *Pasteurella multocida, Corynebacterium* spp, *E. coli*, *Klebsiella* spp.

επιπλέον για 3-4 ώρες την ημέρα βόσκουν σε κοινά λιβάδια. Γενικά, οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι καλές, γεγονός που επιτείνεται από το μη μηχανικό, αλλά με το χέρι, άμελγμα των προβατίνων ανά 8ωρο. Το καλοκαίρι μετακινούνται στην οροσειρά της Πίνδου (Σαμαρίνα), όπου βρίσκονται σε άμεση επαφή μεταξύ τους, εκτρεφόμενα με παραδοσιακή μορφή, χρησιμοποιώντας δηλαδή τη βόσκηση ως μέσο διατροφής.

Τα ασθενή ζώα εμφάνιζαν διογκωμένο και διατεταμένο μαστό. Οι μαστικοί αδένες ήταν θερμοί και επώδυνοι, η έκκριση του γάλακτος εμφάνισε απότομη μείωση και η σύστασή του γινόταν υδαρής και ινιδώδης με βλεννοπυώδες έκκριμα και ακολουθούσε πλήρης αγαλαξία σε διάστημα 3-4 ημερών.

Η νοσηρότητα άγγιξε το 40 % των ζώων του ποιμνίου. Κανένα άλλο κλινικό σύμπτωμα δεν παρατηρήθηκε, εκτός από μικρή αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος για 2-3 μέρες, τα πρόβατα συνέχιζαν να βρί-

pasture, coming in close contact with each other.

The morbidity rate reached 40% of the sheep flock. All the diseased animals developed swollen and distended udders; their glands became hot and painful. Milk secretion rapidly decreased, followed by complete agalaxia within three to four days. During that period, milk became watery and flocculent, characterized by mucopurelent discharge. No other adverse clinical signs occurred besides a slight increase in body temperature, which lasted two to three days. Eventually, the milk losses reached to two thirds of the total annual production and this fact resulted in the death of new born lambs. The aetiology of lamb's mortality finally wasn't clarified, because of the implication with other bacteria, such as *E. coli, Pasteurella* spp.

Milk from the ewes' affected mammary glands was aseptically collected, transported to the laboratory and was surface plated on sheep blood agar and Mac Conkey

σκονται σε καλή κατάσταση, αλλά οι παραγωγοί διαμαρτύρονταν για την απώλεια του γάλακτος που προσέγγιζε τα δύο τρίτα της ετήσιας παραγωγής, καθώς επίσης και για το θάνατο των νεαρών αμνών. Η αιτιολογία της θνητότητας δε διευκρινίστηκε τελικώς, λόγω των επιπλοκών με άλλα βακτήρια, όπως *E. coli, Pasteurella* spp.

Γάλα από τους προσβεβλημένους μαστούς προβάτων και από τις 7 εκτροφές συλλέχθηκε άσηπτα και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο. Η απομόνωση των βακτηρίων έγινε με την απευθείας σπορά σε MacConkey και αιματούχο agar (Merck, Darmstad, Germany). Ταυτόχρονα έγινε σπορά στο τροποποιημένο μέσο Hayflick για την απομόνωση μυκοπλασμάτων (Quinn και συν. 1999).

Τα απομονωθέντα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με βιοχημικές δοκιμές, που περιελάμβαναν την αιμόλυση, τη χρώση κατά Gram, την καταλάση, το CAMP test, την ανάπτυξη παρουσίας NaCl 6,5 %, τη ζύμωση και παραγωγή οξέος από την τρεαλόζη, ινουλίνη και λακτόζη, την υδρόλυση του ιπποτρικού νατρίου, την υδρόλυση της εσκουλίνης και την ανάπτυξη στο άγαρ bile escoulin azide.

Η ορολογική ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών κατά Lancefield έγινε με βάση εμπορικό kit (Streptex, Remel Europe Ltd) για τις ομάδες A, B, C, D, F και G. Ο καθορισμός της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έγινε με τη μέθοδο της διάχυσης στο Mueller-Hinton agar (Oxoid, Hamshire, England), σύμφωνα με τις οδηγίες του NCCLS (2000). Τα δισκία που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν βακιτρακίνη (10 UI), πενικιλλίνη (10 UI), αμπικιλλίνη (30 μg), κεφοπεραζόνη (75 μg), κεφουροξίνη (30μg), γενταμυκίνη (10 μg), ερυθρομυκίνη (15μg), νεομυκίνη (30μg), οξυτετρακυκλίνη (30μg), λινκοσπεκτίνη (30μg), τριμεθοπρίνη (1,25 μg), σουλφομεθοξαζόλη (23,75 μg).

Για την επιπλέον ανάλυση των επιδημιολογικών δεδομένων εφαρμόστηκε η ανοσοηλεκτροφόρηση του παλλόμενου πεδίου (PFGE) με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου Sma I (New England Biolabs, inc., USA) και της μονάδας ηλεκτροφόρησης, Rotaphor type V (Biometre Gmbh, Germany). Η παρασκευή και η πέψη του DNA έγινε σύμφωνα με τους Patterson και Kelly 1998, Wang και συν. 1999. Τα κλάσματα του DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε 1 % αγαρόζη με 2-15 παλμούς ανά δευτερόλεπτο, στα 180 V στους 22°C, για 20 ώρες.

Η στατιστική ανάλυση ANOVA χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν αναλογικά τα στελέχη του *S. agalactiae* με τα άλλα απομονωθέντα βακτήρια και τις αρνητικές (στείρες) καλλιέργειες.

agar plates (Merck, Darmstadt, Germany). All milk samples were cultured for the presence of Mycoplasmas in modified Hayflick's medium (Quinn et al. 1999).

The isolates of Streptococci were confirmed by biochemical tests which included the presence of hemolysis, Gram staining, catalase test, the CAMP test, using a streak of *Staphylococcus aureus* as the gold standard to identify *S. agalactiae,* which was performed according to the recommendations of Quinn et al (1999), growth in Trypticase Soya Broth (TSB) (Oxoid, Hapshire, England), containing 6.5% NaCl, fermentation of carbohydrates; acid production from trehalose, inulin and lactose, the hydrolysis of sodium hippurate, esculin hydrolysis, growth in bile esculin azide agar.

Serogrouping of the isolates (groups A, B, C, D, F and G) was conducted using a commercially available kit (Streptex, Remel Europe Ltd).

The determination of antibiotic susceptibility was performed by the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar (Oxoid, Hapshire, England) following the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines (2000). The paper discs used contained bacitracin (10 UI), penicillin G (10 UI), ampicillin (30 μg), cefoperazone (75 μg), cefuroxime (30 μg), gentamicin (10 μg), erythromycin (15 μg), neomycin (30 μg), oxytetracycline (30 μg), lincospectin (30 μg), trimethoprim (1,25 μg)-sulfamethoxazole (23.75 μg).

The epidemiological relationship of the isolates was further analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE, Rotaphor type V electrophoresis unit, Biometra GmbH, Germany), using SmaI restriction endonuclease digested patterns of chromosomal DNA (New England Biolabs, inc., USA). Preparation and digestion of the genomic DNA was performed according to the protocol as described elsewhere (Patterson and Kelly 1998; Wang et al. 1999). DNA digests were loaded onto 1% agarose gel with 2-15 pulses/sec at 180 V and 22°C for 20h.

ANOVA single factor analysis was used to compare the bacteriological isolates between *S. agalactiae* and other species or negative cultures.

RESULTS

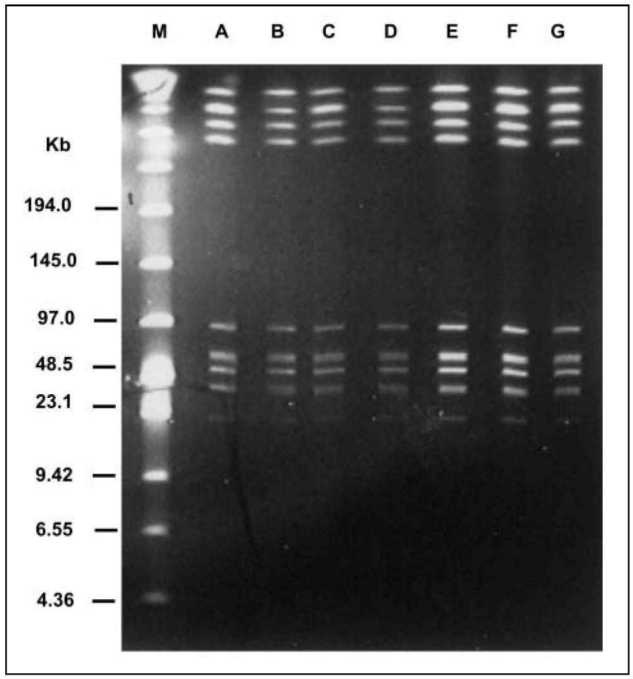
Seventy one (71) pure cultures of hemolytic, gram positive, catalase-negative cocci, were isolated from 112 milk samples (table 1). All cultures were positive for the CAMP test, trehalose, lactose, hydrolysis of hippurate and the NaCl test, and negative on esculine and bile esculin azide agar. There was no acid production in the inulin test. All isolates were categorized in the Lancefield group B. The above tests conclusively confirmed that the isolated colonies were *S. agalactiae*. The biochemical profile of all *S. agalactiae* isolates was

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά εξετάστηκαν 112 δείγματα γάλακτος και απομονώθηκαν 71 καθαρές καλλιέργειες αιμολυτικών, Gram θετικών καταλάση αρνητικών κόκκων (πίνακας 1). Όλες οι καλλιέργειες ήταν θετικές στο Camp test, στην τρεαλόζη, στη λακτόζη, στην υδρόλυση του ιπ-πουρικού νατρίου, στο NaCl, 6,5 % και αρνητικές στην υδρόλυση της εσκουλίνης και στο άγαρ bile esculin azide. Δεν υπήρχε παραγωγή οξέος από την ινουλίνη. Οι 71 καλλιέργειες ανήκαν όλες στην ομάδα Β κατά Lancefield. Οι παραπάνω δοκιμές επιβεβαιώνουν πλήρως ότι ο παθογόνος παράγοντας είναι ο *S. agalactiae*. Οι βιοχημικές ιδιότητες όλων των στελεχών ήταν απόλυτα ίδιες, χωρίς καμία διαφοροποίηση. Σε σύγκριση με τα άλλα βακτήρια που απομονώθηκαν και τις στείρες καλλιέργειες, η αναλογία του *S. agalactiae* που απομονώθηκε σε καθαρές καλλιέργειες ήταν στατιστικώς σημαντική (P<0.001).

Η δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έδειξε ότι όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην κεροπεραζόνη και στην κεφουροξίνη. Επιπλέον, το 90 % των στελεχών ήταν ευαίσθητα στην λινκοσπεκτίνη και το 70% στην αμπικιλλίνη, ενώ όλα ήταν ανθεκτικά στην πενικιλλίνη G, νεομυκίνη, βακιτρακίνη, γενταμυκίνη, ερυθρομυκίνη, οξυτετρακυκλίνη και την τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη.

Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά για το μυκόπλασμα, αποκλείοντας έτσι τον παθογόνο αυτόν παράγοντα για την πρόκληση της νόσου. Η πέψη του χρωμοσωμικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο Sma I έδειξε ότι όλα τα στελέχη του *S. agalactiae* ήταν απόλυτα ίδια (εικόνα 1).



Εικόνα 1. *Πρότυπα ζωνών (PFGE) που παρήχθησαν με τη χρήση ενζύμου Sma I στα στελέχη του S. agalactiae, που απομονώθηκαν από τις 7 εξεταζόμενες εκτροφές (A-G). Στήλη M , Δείκτης M.B. (New England Biolabs, inc., USA), Στήλες A-G κλινικά στελέχη.*

Figure 1. *Macrorestriction patterns with the enzyme SmaI of S. agalactiae isolates of the seven flocks (A-G). Lane M, Low range PFGE marker (New England Biolabs, inc., USA); Lane A-G, clinical isolates.*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το, σφοδρού χαρακτήρα, νόσημα που περιγράφεται χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταδοτικότητα και εμφάνιση οξείας κλινικής μαστίτιδας που έχει ως αποτέλεσμα την αγαλαξία, σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα γνωστά σχετικά με το συγκεκριμένο παθογόνο (Keefe 1997).

Ο τρόπος μετάδοσης της νόσου δεν είναι διευκρινισμένος. Πιθανολογείται ότι η μετάδοση μεταξύ των γειτονικών εκτροφών μπορεί να γίνεται το χειμώνα, που επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες επιπολασμού του μικροβίου στο περιβάλλον, αλλά και το καλοκαίρι, όπου κυρίως η βόσκηση γίνεται σε κοινά λιβάδια.

Η νόσος εμφανίζεται σχεδόν αμέσως μετά τους τοκετούς, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις το παθογόνο απομονώνεται από το πρωτόγαλα πρωτόγεννων προβατίνων, δύο ημέρες πριν τον τοκετό. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι ο αιτιολογικός παράγοντας μπορεί εύκολα να μεταδοθεί από το μολυσμένο περιβάλλον, σε

identical. In comparison to the other isolated bacteria and negative cultures, the percentage of *S. agalactiae* isolated in pure and mixed cultures was significantly different (P<0.001).

The antibiotic susceptibility test indicated that all isolates were sensitive to cefoperazone and cefuroxime. Furthermore, 90 % of the strains were sensitive to lincospectin and 70 % to ampicillin, but all the strains were resistant to penicillin G, neomycin, bacitracin, gentamicin, erythromycin, oxytetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole.

All milk samples were negative for Mycoplasma, ruling out the implication of this pathogen in the outbreak.

Digestion of the chromosomal DNA with the restriction enzyme Sma I revealed that all isolated, group B streptococci were identical (figure 1).

DISCUSSION

The aforementioned outbreak evolved in a different pattern than what is currently known about the pathogen (Keefe 1997). It started fast, followed by high

αντίθεση με τις μέχρι τώρα περιγραφές που θεωρούν το *S. agalactiae* ως αποκλειστικό ενδομαστικό παθογόνο (Keefe 1997, Wang και συν. 1999).

Επιπλέον, στα βοοειδή το παθογόνο βακτήριο είναι ευαίσθητο σε πολλά αντιβιοτικά (Keefe 1997), ενώ αντίθετα, σύμφωνα με τα δικά μας ευρήματα, στα πρόβατα εμφανίστηκε σημαντική αντιβιοανθεκτικότητα, η οποία προφανώς οφείλεται γενικά στην κατάχρηση αντιβιοτικών.

Η ανοσοηλεκτροφόρηση του παλλόμενου πεδίου είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας με ευρεία εφαρμογή, επαναλήψιμα αποτελέσματα και υψηλή διακριτική ικανότητα στην ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών. Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε επιδημιολογικές έρευνες των στρεπτόκοκκων (Bert και συν. 1997, O'Sullivan και Fitzegerald 1998, Svenshon και συν. 1998, Patterson και Kelly 1998, Martinez και συν. 2000, Las Heras και συν. 2002). Χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος από κάθε εκτροφή, δεδομένου ότι όλα τα στελέχη φαινοτυπικώς ήταν ίδια. Η εκτίμηση και αξιολόγηση των κλασμάτων του DNA στην PFGE έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του Tenover και συν. (1995) και έδειξε ότι όλες οι απομονώσεις στελεχών ήταν πανομοιότυπες. Η, σφοδρού χαρακτήρα, αυτή νόσος επομένως προήλθε από ένα κοινό στέλεχος από άγνωστη πηγή, η οποία ήταν πολύ δύσκολο να ανιχνευθεί. Η χορήγηση αντιβιοτικών αποδείχθηκε αναποτελεσματική, ακόμα και όταν εφαρμόστηκε η θεραπεία της ξηράς περιόδου. Η μόλυνση ήταν πολύ σοβαρή από την οικονομική σκοπιά, δεδομένων των οικονομικών απωλειών.

Μία σημαντική παρατήρηση που διαπιστώθηκε κατά τις βιοχημικές δοκιμές ήταν ότι όλα τα στελέχη του *S. agalactiae* που απομονώθηκαν, μπορούσαν να αναπτυχθούν παρουσία 6,5% NaCl. Οι Daignault και συν (2003) παρατήρησαν ακριβώς το ίδιο στην πλειονότητα (92 %) των στελεχών που απομονώθηκαν. Από την άλλη μεριά, εγχειρίδια αναφοράς, όπως του Quinn και συν. (1994), θεωρούσαν ότι ο *S. agalactiae* δεν αναπτύσσεται παρουσία 6,5% NaCl. Συμπερασματικά, η χρησιμοποίηση της δοκιμής του NaCl ως μέθοδος ρουτίνας πρέπει να αναθεωρηθεί, γιατί ενδεχομένως στελέχη *S. agalactiae* θα μπορούσαν να θεωρηθούν λανθασμένα ως εντερόκοκκοι.

Για την πρόληψη του νοσήματος παρασκευάστηκε και χορηγήθηκε υποδορίως στις προβατίνες φορμολούχος ολική βακτερίνη. Η πρώτη έγχυση έγινε σε 50 ημέρες και η αναμνηστική δόση σε 20 ημέρες πριν τον τοκετό. Τα πρόδρομα αποτελέσματα του εμβολιασμού χαρακτηρίστηκαν ως ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, αλλά η τελική αξιολόγησή του θα γίνει μετά την παρέλευση ικανού χρονικού διαστήματος.

contagiousness rate and turned out in acute clinical mastitis resulting in agalaxia.

The transmission of the disease wasn't fully understood. Probably the transmission of the pathogen between the neighboring flocks takes place in the winter period, when the climatic conditions are favorable for the prevalance of the disease, but also in the summer period, when animals are grazing in the same open pastures.

The disease appeared just after the parturition, but in some cases the pathogen was isolated from the colostrum of primigravida ewes, two days before parturition. This fact implies that the infection can be easily transmitted, through a contaminated environment, contrary to what is known about the epidemiology of the pathogen in bovine, where *S. agalactiae* considered to be highly contagious obligate parasite of the mammary gland (Keefe 1997; Wang et al. 1999).

Furthermore in bovine the microorganism is susceptible to a variety of antimicrobial agents (Keefe 1997), while, according to our findings, in ewes a considerable resistance was detected due to the overuse of the antibiotics.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has emerged as the one of the most widely applicable, reproducible and highly discriminatory techniques to identify bacterial strains. This technique has been successfully applied to the epidemiological investigation of streptococci (Bert et al. 1997; O' Sullivan and Fitzegerald 1998; Svenshon et al. 1998; Patterson and Kelly 1998; Martinez et al. 2000; Las Heras et al. 2002). One isolate per flock was used, because all isolates were phenotypically similar. Interpretation of the PFGE patterns, according to Tenover et al (1995), indicated that all clinical isolates were molecularly the same. The outbreak was possibly produced by a single strain from an unknown source of infection. The antibiotherapy was not effective, even when a dry period therapy was used. The infection was very serious from the economical point of view.

An interesting observation was that all of our isolates were able to grow in a broth containing 6.5% NaCl. Daignault et al. (2003) observed exactly the same thing in the majority (92%) of the examined isolates of *S. agalactiae*. On the other hand, the reference manual of Quinn et al. (1994) indicates that *S. agalactiae* is unable to grow in this medium. Conclusively, the routine utilization of this test in the identification procedure should not be revised, because isolates of *S. agalactiae* could be incorrectly identified as enterococci.

In an effort to prevent the mastitis produced by *S. agalactiae*, a formolized whole cell bacterin autovaccine was prepared and administered subcutaneously in ewes. The recommended protocol comprised of vaccination

Ο *S. agalactiae* θεωρείται, επίσης, ως παθογόνο στον άνθρωπο και ενοχοποιείται για θνητότητα και νοσηρότητα διεθνώς (Jarva και συν. 2003). Προσβάλλει νεογέννητα και ενήλικες με σηψαιμία, πυελονεφρίτιδα και άλλες λοιμώξεις (Onile 1985). Δεν είναι διευκρινισμένο εάν ο *S. agalactiae* είναι αίτιο ζωονόσου ή είναι ξενιστής είδους, μολονότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ κλασμάτων της PFGE και της RAPD σε στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους και ζώα (Devriese 1991, Jensen και συν. 1996, Martinez και συν. 2000). Η απέκκριση του παθογόνου από το γάλα ίσως να αποτελεί σημαντικό παράγοντα επικινδυνότητας για καταναλωτές προϊόντων, που παρασκευάζονται από μη παστεριωμένο γάλα. ❑

and revaccination 50 and 20 days before birthing. The results of this vaccination prophylaxis was promising, but the final evaluation will take place in the future.

S. agalactiae is also considered to be a human pathogen, which causes significant morbidity and mortality world wide (Jarva et al. 2003). It affects newborn children and adults with sepsis, pyelonephritis and other wide range of infections (Onile 1985). It is unclear whether *S. agalactiae* is a zoonotic agent or a host specific pathogen, although there is a strong corrrelation between the PFGE and RAPD patterns of both types of isolates (Devriese 1991; Jensen et al. 1996; Martinez et al. 2000). The excretion of this pathogen in milk poses a significant health risk to consumers of raw sheep unpasteurized milk products. ❑

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

Andersen HJ, Petersen LH, Aarestrup FM, Chriel M (2003) Evaluation of the surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. J Dairy Sci, 86 (4):1233-1239

Anonymous (2000) National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests

Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F (2002) Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. J Dairy Sci, 85 (6):1370-1375

Bergonier D, de Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot, X (2003) Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res, 34 (5):689-716

Bert F, Branger C, Zechovsky N (1997) Pulsed-Field Gel Electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for pyogenic streptococci. Curr Microbiol, 34:226-229

Daignault D, Guevremont E, Guillemette JM, Messier S, Gottschalk M, Higgins R (2003) Serotypes of *Streptococcus agalactiae* cultured from dairy milk samples in Quebec. Can Vet J, 44:217-220

DaMassa AJ (1983) Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from mastitic goat milk. J Am Med Ass, 183:548-549

De Santis EPL, Mazzette R, Farina S, Maricosu G, Lai G, Nie MP (1998) Somatic cell count in ewes milk. Obiet e Docum Vet, 19:55-61

Devriese LA (1991) Streptococcal ecovars associated with different animal species : epidemiological significance of serogroups and biotypes. J Appl Bacteriol, 71:478-483

El-Massanat ETS, Jones JET, Scott MJ (1991) The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. J Comp Path, 105:455-465

Fleischer K (1975) Studies on the prevalence of mastitis of bacterial origin in sheep. Inaug Disser Fachber Tierm ed Munch, 61.

Fox LK, Gay JM (1993) Contagious mastitis. Vet Clin North Am: Food Animal Practice, 9:475-487

Fthenakis GC, Marples PR, Richerdson JF, Jones JET (1994) Some properties of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of ovine mastitis. Epidemiol & Infect, 112:171-176

Jarva H, Jokiranta TS, Wurzner R, Meri S (2003) Complement resistance mechanisms of streptococci. Mol Immunol, 40:95-107

Jensen NE, Aarestrup FM (1996) Epidemiological aspects of group B streptococci of bovine and human origin. Epidemiol & Infect, 117:417-422

Jensen R, Swift BL (1982) Diseases of ewes. In Diseases of sheep. 2nd edn Lea & Febiger, Philadelphia, USA,:28-30

Jones GE (1983) Mycoplasmas of sheep and goats A synopsis. Vet Rec, 113:619-620

Keefe GP (1997) *S. agalactiae* mastitis: a review. Can Vet J, 38:429-437

Kindle J, DaMassa AJ, Weknell PS, Petty R (1994) Mycoplasma infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* (caprine biotype). J Vet Diag Invest, (6):423-427

Kirk JH, Glenn JS, Maas JP (1996) Mastitis in a flock of milking sheep. Small Rum Res, 22:187-191

Korukov G (1998) Streptococcal mastitis in ewes. Vet Sbirka, 79:29-30

Krzyzanowski J, Wawron W, Malinowski E, Gluszak J, Orlik SJ (1983) Bacteria isolated from the secretion of mastitis udder of ewes and their sensitivity to antibiotics. Med Wet, 39:462-464

Lafi SQ, Al Majali AM, Rousan MD, Alawneh JM (1998) Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in Northern Jordon. Prev Vet Med, 33:171-181

Lambert M (1987) Contagious agalactiae of sheep and goats. Review Sci Tech Intern Epiz, 6:699-711

Las Heras A, Vela AI, Fernadez E, Legaz E, Dominguez L, Fernadez-Garayzabal JF (2002) Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by Streptococcus equi subsp. zooepidemicus. J Clin Microbiol, 40:1106-1108

Martinez G, Harel J, Higgins R, Lacouture S, Daignault D, Gottschalk M (2000) Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol, 38:71-78

Onile BA (1985) Review of group B streptococci and their infections. Afr J Med Sci, 14(3-4):131-143

O' Sullivan TF, Fitzegerald GF (1998) Comparison of Streptococcus thermophilus strains by pulsed field gel electrophoresis of genomic DNA. FEMS Microbiol Lett, 168:213-219

Patterson J, Kelly C (1998) Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool for enterococci and streptococci. Meth Cell Sci, 20:233-239

Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1999) The streptococci and related cocci. In Clinical Veterinary Microbiology (eds) Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, Mosby, Edinburgh, Scotland,:127-136

Saeter EA, Eieland E (1961) Ovine mastitis in Norway. Nord Vet Med 13:32-44

Scott PR (2000) Extensive fibrinous pleurisy associated with *Streptococcus dysgalactiae* mastitis in two ewes. Vet Microbiol, 146:347-349

Shouman MT, Rezk MS, Ismail M, El-Ged A (1986) The role of streptococci and corynebacteria in the subclinical and clinical mastitis in the goats and ewes. Ass Vet Med J, 16:350-351

Svenshon M, Lammer C, Siebert U (1998) Identification and molecular characterization of beta-hemolytic streptococci isolated from harbor porpoiscs (*Phocoena phocoena*) of the north and Baltic Seas. J Clin Microbiol, 36:1902-1906

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacteria strain typing. J Clin Microbiol, 33:2233-2239

Tripathi BN (1987) Studies on pathomorphological changes in mammary glands of sheep and goats. Ind J Vet Pathol, 15: 83-85

Tripathi BN, Chattopadhyay SK (1993) Caprine mastitis: clinicomorphological and etiopathological findings in spontaneously occurring cases in Indian goats. Inter J An Sci, 8:107-111

Wang SM, Deighton MA, Capstick JA, Gerraty N (1999) Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. Epidemiol & Infect, 123:317-324