

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 55, No 2 (2004)



### Prevalence of bovine mastitis pathogens and antibioresistance of *Escherichia coli* isolates

A. ZDRAGAS (Α. ΖΔΡΑΓΚΑΣ), P. TSAKOS (Π. ΤΣΑΚΟΣ), K. ANATOLIOTIS (Κ. ΑΝΑΤΟΛΙΩΤΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15162](https://doi.org/10.12681/jhvms.15162)

#### To cite this article:

ZDRAGAS (Α. ΖΔΡΑΓΚΑΣ) Α., TSAKOS (Π. ΤΣΑΚΟΣ) Ρ., & ANATOLIOTIS (Κ. ΑΝΑΤΟΛΙΩΤΗΣ) Κ. (2017). Prevalence of bovine mastitis pathogens and antibioresistance of *Escherichia coli* isolates. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 55(2), 113–119. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15162>

## Συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων από μαστίτιδες βοοειδών και αντιβιοαντοχή απομονωθέντων στελεχών *Escherichia coli*

A. Ζδράγκας<sup>1</sup>, Π. Τσάκος<sup>2</sup>, Κ. Ανατολιώτης<sup>2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Εξετάστηκαν 952 δείγματα γάλακτος από περιστατικά κλινικής μαστίτιδας, προερχόμενα από 269 εκτροφές βοοειδών στη Βόρεια Ελλάδα. Η *Escherichia coli* απομονώθηκε στο 49,3% των δειγμάτων γάλακτος. Επιπλέον, απομονώθηκαν και άλλα είδη μικροοργανισμών: *Staphylococcus* spp, *Corynebacterium* spp, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp ή συνδυασμοί των παραπάνω βακτηρίων. Ο βακτηριολογικός έλεγχος στο 4,3% των δειγμάτων ήταν αρνητικός. Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση των περιστατικών κλινικής μαστίτιδας με τις εποχές του έτους. Η αντιβιοαντοχή των απομονωθέντων στελεχών της *E. coli* κυμαινόταν στην τετρακυκλίνη από 82-96%, στην ενροφλοξακίνη από 10-30%, στη γενταμικίνη από 58-80%, στις κεφαλοσπορίνες από 47-75%, στη σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη από 46-81%, στην αμπικιλίνη από 71-92% και στη νεομυκίνη από 83-97%. Την τελευταία χρονιά παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές αντιβιοαντοχής, καθώς και η απομόνωση για πρώτη φορά ανθεκτικών στελεχών της *E. coli* (6%) και στους 8 αντιβακτηριακούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** Βοοειδή, Μαστίτιδα, Αντιβακτηριακές Ουσίες, Αντιβιοαντοχή, *Escherichia coli*.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μαστίτιδα θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά αίτια οικονομικής απώλειας για την αγελαδοτροφία. Αν και τα είδη των μικροοργανισμών που απομονώνονται από το μαστικό αδένα της αγελάδας έχουν υπερβεί τους 135 (Watts 1988), εντούτοις ένας μικρός μόνο αριθμός ενοχοποιείται για τις περισσότερες κλινικές μαστίτιδες. Επιπλέον, η παρουσία κλινικής μαστίτιδας υποδηλώνει κατά κανόνα την ύπαρξη και υποκλινικής ασθένειας στην εκτροφή (Ηλιάδης και συν. 1997), η οποία έχει ως συνέπεια τη μείωση της ποσότητας του γάλακτος και την ποι-

## Prevalence of bovine mastitis pathogens and antibioresistance of *Escherichia coli* isolates

Zdragas A.<sup>1</sup>, Tsakos P.<sup>2</sup>, Anatoliotis K.<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** Nine hundred and fifty two milk samples from clinical bovine mastitis cases, originated from 269 farms in Northern Greece, were tested. *Escherichia coli* was isolated in 49.3% of samples. Furthermore, *Staphylococcus* spp, *Corynebacterium* spp, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp or a combination of the above bacteria were isolated. The bacteriological result from 4.3% of samples was negative. No correlation between clinical mastitis cases and seasonal variation was observed. Resistance of *E. coli* isolates to tetracycline was 82-96%, to enrofloxacin 10-30%, to gentamicin 58-80%, to cephalosporins 47-75%, to sulfamethoxazole-trimethoprim 46-81%, to ampicillin 71-92% and to neomycin 83-97%. The highest resistance rate and the appearance of multi-resistant isolates of *E. coli* (6%), to 8 antibacterials, were recorded during the last year of the survey.

**Key words:** Bovine, Mastitis, Antibacterials, Antibioresistance, *Escherichia coli*.

## INTRODUCTION

Mastitis is considered to be one of the most important agent of economic loss encountered in dairy herds. Although more than 135 microbial species have been isolated from the mammary gland of cow (Watts 1988), a relatively small number is responsible for most cases of clinical mastitis. In addition, clinical mastitis is associated with a subclinical infection in the same herd, which causes reduction of milk production and degradation of milk due to poor quality (Iliadis et al. 1997).

<sup>1</sup> Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας.

<sup>2</sup> Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης, Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων.

Ημερομηνία υποβολής: 16.03.2004  
Ημερομηνία εγκρίσεως: 15.06.2004

<sup>1</sup> Veterinary Research Institute of Thessaloniki, National Agricultural Research Foundation.

<sup>2</sup> Center of Veterinary Institutes of Thessaloniki, Institute of Infectious and Parasitic Diseases.

Submission date: 16.03.2004  
Approval date: 15.06.2004



οτική υποβάθμισή του.

Οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται από μαστίτιδες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) στους ενδογενείς μεταδοτικούς λοιμογόνους παράγοντες, δηλαδή τους *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis* και τους πηκτάση-αρνητικούς σταφυλόκοκκους, οι οποίοι αποικίζουν το δέρμα και το θηλαίο πόρο και δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα (Honkansen-Buzalski και συν. 1994) και β) στους εξωγενείς περιβαλλοντικούς λοιμογόνους παράγοντες, οι οποίοι μολύνουν το μαστικό αδένά από το θηλαίο πόρο, όπως η *Escherichia coli* και άλλοι μικροοργανισμοί: *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp (Chengappa 1990), *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Corynebacterium* spp και οι μύκητες (Schalm και συν. 1971).

Τα τελευταία χρόνια, οι αλλαγές του τρόπου διαχείρισης των αγελαδοτροφικών επιχειρήσεων με την εφαρμογή μέτρων υγιεινής του μαστικού αδένά κατά την άμεληξη και την ευρεία χρήση των αντιβακτηριακών μείωσαν κατά πολύ τις μαστίτιδες που οφείλονταν σε ενδογενείς λοιμογόνους παράγοντες, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη αύξηση της συχνότητας της μαστίτιδας από *E. coli* (Hill 1994).

Η καταχρηστική και αδιάκοπη χορήγηση αντιβακτηριακών (Bishop και συν. 1980) στην τρέχουσα κτηνιατρική πράξη έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικών μεταλλάκτων. Η μεταφερόμενη ανθεκτικότητα μέσω των παραγόντων ανθεκτικότητας (R factors) είναι καλά τεκμηριωμένη στην ομάδα των εντεροβακτηριοειδών (Carter και Chegappa 1991). Σήμερα γίνεται αποδεκτό ότι η αντιβιοαντοχή αποτελεί απειλή για την κτηνιατρική θεραπευτική, αλλά και για τη δημόσια υγεία (Ziv 1976, Boulton και Ross 1977, Linton και συν. 1979, Kremer και συν. 1989).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των βακτηρίων που προκαλούν κλινική μαστίτιδα και ο έλεγχος της ανθεκτικότητας σε 8 αντιβακτηριακές ουσίες στελεχών *E. coli* που απομονώνονται από μαστίτιδες.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συνολικά εξετάστηκαν 952 δείγματα γάλακτος προερχόμενα από κλινικές μαστίτιδες σε 269 εκτροφές βοοειδών της Β. Ελλάδας. Τα δείγματα συλλέγονταν άσηπτα από το προσβεβλημένο τεταρτημόριο του μαστικού αδένά και προσκομίζονταν με ισοθερμικό δοχείο στο Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων κατά το χρονικό διάστημα 1995-99 για μικροβιολογική εξέταση. Όπως αναφερόταν στο ιστορικό, στα ζώα, από τα οποία λαμβάνονταν τα δείγματα γάλακτος, δεν είχαν χορηγηθεί αντιβακτηριακά. Η βακτηριολογική εξέταση γινόταν αμέσως μετά την παραλαβή των δειγμάτων με καλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ, MacConkey άγαρ, χρώσεις κατά Gram, απομόνωση και βιοχημική ταυτοποίηση του είδους των βακτηρίων (Watts 1988). Ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε για τα στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν, σύμφωνα με τη

Bacterial pathogens isolated from cows with mastitis are divided into two major categories: a) endogenous contagious agents, such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis* and Coagulase Negative Staphylococci (CNS), which can colonize the teat skin and teat canal acting as occasionally pathogens (Honkansen-Buzalski et al. 1994) and b) exogenous environmental agents infecting the mammary gland through the teat canal, such as *Escherichia coli* and other bacteria: *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp (Chengappa 1990), *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Corynebacterium* spp and fungi (Schalm et al. 1971).

In recent years, changes in dairy herd management followed by application of hygienic milking practices and use of antibacterials, have reduced the likelihood of mastitis due to endogenous agents, increasing simultaneously the incidence of mastitis associated with *E. coli* (Hill 1994).

The indiscriminated and prolonged administration of antibacterials (Bishop et al. 1980) in current veterinary therapy resulted in the appearance of resistant mutants. Transferable multiple drug resistance caused by R factors is well established in members of enterobacteriaceae (Carter and Chegappa 1991). It is accepted nowadays that antibiotic resistance is a real threat for therapy and for the public health, as well (Ziv 1976, Boulton and Ross 1977, Linton et al. 1979, Kremer et al. 1989).

The objectives of the present study are to determine the causative agents of clinical mastitis in dairy herds and the resistance of 8 antibacterials against *E. coli*.

## MATERIALS AND METHODS

Totally 952 mastitic milk samples were examined from 269 dairy herds, located in Northern Greece. All samples were aseptically collected during the period 1995-1999 and carried under freeze in the Laboratory of Infections and Parasitic Diseases for further analysis. According to the clinical history, no antibacterials were administered in cows before sampling. Bacteriological examination was carried out just after the arrival of the samples, including the inoculation of milk in blood agar, MacConkey agar, Gram staining and the identification was confirmed by biochemical tests (Watts 1988).

Sensitivity test against *E. coli* was applied according to Kirby Bower disc diffusion method (Quinn et al. 1994) and the antibacterials used are the following: neomycin (30μg, Oxoid), sulfamethoxazole/trimethoprim (25μg, Oxoid), oxytetracycline (30μg, Oxoid), enrofloxacin (5μg, Bayer), cefoperazone (30μg, Oxoid), cefuroxime (30μg, Oxoid), gentamicin (10μg, Oxoid), ampicillin (10μg, Oxoid).

## RESULTS

The bacteria species, which were isolated from milk



μέθοδο Kirby Bauer disc diffusion (Quinn και συν. 1994) και οι αντιβακτηριακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω: νεομυκίνη (30μg, Oxoid), σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (25μg, Oxoid), οξυτετρακυκλίνη (30μg, Oxoid), ενροφλοξακίνη (5μg, Bayer), κεφοπεραζόνη (30μg, Oxoid), κεφουροξίμη (30μg, Oxoid), γενταμικίνη (10μg, Oxoid), αμπικιλίνη (10μg, Oxoid).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα είδη των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα του γάλακτος παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η *E. coli* απομονώθηκε στα περισσότερα δείγματα (49,3%) και στη συνέχεια ακολούθησαν οι πηκτάση, αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (22,5%), το *Corynebacterium* spp. (7,9%), η *Pseudomonas* spp. (2,9%), ο *Streptococcus* spp. (2,3%), ο *Proteus* spp. (1,6%), η *Klebsiella* spp. (0,7%) και ο *Staphylococcus aureus* (0,5%). Στο 8% των δειγμάτων απομονώθηκαν συνδυασμοί των παραπάνω αναφερθέντων ειδών βακτηρίων (μικτή καλλιέργεια) χωρίς την παρουσία της *E. coli*. Οι σταφυλόκοκκοι ήταν το δεύτερο πιο συχνό αίτιο κλινικής μαστίτιδας, καθώς απομονώθηκε από το 23% των δειγμάτων γάλακτος. Ο *Staphylococcus aureus* απομονώθηκε από μία μόνο εκτροφή (5 δείγματα γάλακτος), ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις οι πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι ήταν η αιτία της κλινικής μαστίτιδας. Σε 41 δείγματα (4,3%) η βακτηριολογική εξέταση ήταν αρνητική, δηλαδή δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

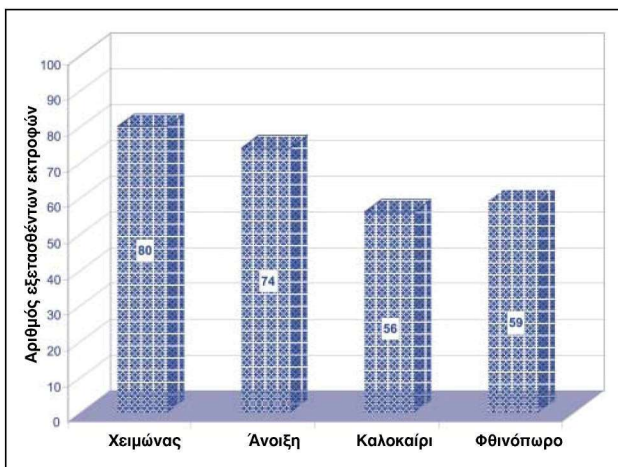
Από την εποχιακή κατανομή των 269 εκτροφών βοοειδών με συμπτώματα κλινικής μαστίτιδας, διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες εκτροφές εξετάστηκαν κατά τους χειμερινούς (n=80) και εαρινούς μήνες (n=74) (Διάγραμμα 1). Σύμφωνα με στατιστική ανάλυση (ANOVA) δε βρέθηκε σημαντική διαφορά ( $p > 0,05$ ) ως προς το μέσο αριθμό των εκτροφών που είχαν περιστατικά μαστίτιδας κάθε εποχή.

Η συχνότητα (%) των απομονωθέντων ανθεκτικών στελεχών *E. coli* στις χρησιμοποιηθείσες αντιβακτηριακές ουσίες απεικονίζεται σε ιστόγραμμα (Διάγραμμα 2). Η αντιβιοαντοχή των στελεχών *E. coli* στην τετρακυκλίνη ήταν σταθερή 82% τα πρώτα τρία έτη και στη συνέχεια αυξήθηκε ως το 96%. Όσον αφορά στην ενροφλοξακίνη, η αντίστοιχη τιμή κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα συγκρινόμενη με τις τιμές για τις άλλες αντιβακτηριακές ουσίες, αλλά με ανοδική τάση, από 10% την πρώτη χρονιά μέχρι 31% κατά τα δύο τελευταία έτη της έρευνας. Η αντιβιοαντοχή των στελεχών στη γενταμικίνη κυμάνθηκε μεταξύ 58-80%. Η μεγαλύτερη τιμή εμφανίστηκε στα στελέχη του τρίτου έτους (80%). Για τις κεφαλοσπορίνες, κεφοπεραζόνη και κεφουροξίμη, οι τιμές ήταν μεταξύ 47-75%, με εξαίρεση το τελευταίο έτος, που παρατηρήθηκε αύξηση της αντιβιοαντοχής της κεφουροξίμης στο 90%. Η αντιβιοαντοχή της σουλφομεθοξαζόλης-τριμεθοπρίμης κυμάνθηκε μεταξύ 46-81%. Κατά τα πρώτα δύο έτη αυξήθηκε η αντιβιοαντοχή από το 46% στο 81%, ενώ τα τελευταία τρία χρόνια η μέση τιμή ήταν 69%. Η αντιβιοαντοχή των στελεχών *E. coli* στην αμπικιλίνη ήταν σταθε-

**Πίνακας 1.** Συχνότητα παθογόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν σε δείγματα γάλακτος από περιστατικά κλινικής μαστίτιδας αγελάδων

**Table 1.** Prevalence of pathogens isolated from cases of clinical bovine mastitis.

Είδη μικροοργανισμών	Αριθμός	Ποσοστό (%)
<i>E. coli</i>	469	49.3
<i>Coagulase-negative staphylococci</i>	214	22.5
<i>Corynebacterium</i> spp	75	7.9
<i>Pseudomonas</i> spp	28	2.9
<i>Streptococcus</i> spp	22	2.3
<i>Proteus</i> spp	15	1.6
<i>Klebsiella</i> spp	7	0.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0.5
Μικτές καλλιέργειες	76	8.0
Αρνητικά	41	4.3
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>952</b>	<b>100.0</b>



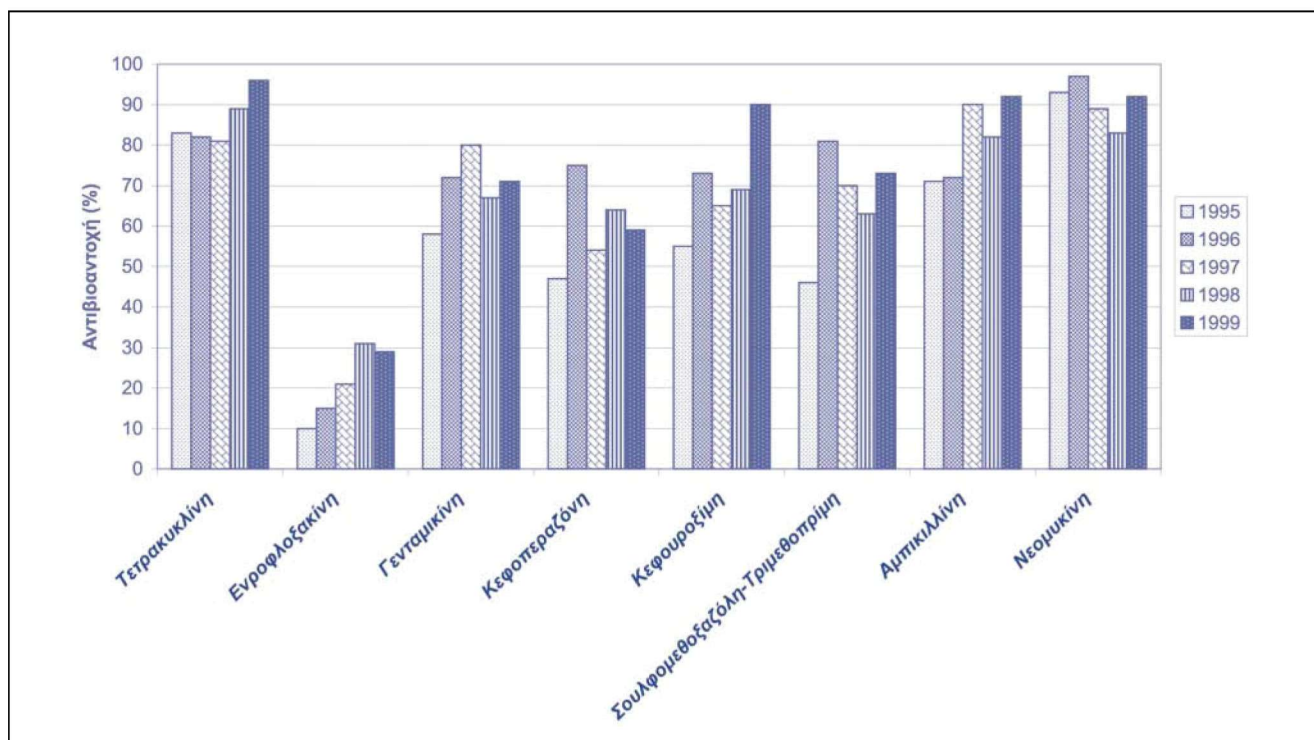
**Διάγραμμα 1.** Εποχιακή κατανομή εκτροφών βοοειδών με κλινική μαστίτιδα.

**Figure 1.** Seasonal distribution in farmed cattle with clinical mastitis.

samples, are represented in Table 1. *Escherichia coli* was isolated in the majority of samples (49.3%) followed by CNS (22.5%), *Corynebacterium* spp (7.9%), *Pseudomonas* spp (2.9%), *Streptococcus* spp (2.3%), *Proteus* spp (1.6%) and *Klebsiella* spp (0.7%), *Staphylococcus aureus* (0.5%).

Combination of the above pathogens (mixed cultures) without the presence of *E. coli* was isolated in 8% of milk samples. Staphylococci were the second common pathogen isolated from clinical mastitis in 23%. *Staphylococcus aureus* was isolated from one herd (five milk samples), whereas in the other cases the CNS was considered to be the causative agent of clinical mastitis. In 41 samples (4.3%) the bacteriological examination was negative, meaning that no bacteria could be isolated.





**Διάγραμμα 2.** Αντιβιοαντοχή των απομονωθέντων στελεχών *E. coli* (%) σε δείγματα γάλακτος από περιστατικά κλινικής μαστίτιδας αγελάδων για χρονικό διάστημα 5 διαδοχικών ετών.

**Figure 2.** Resistance of *E. coli* isolates (%) to antibacterial agents in milk samples from clinical bovine mastitis cases during 5 successive years.

ρή κατά τα πρώτα δύο έτη (71-72%), ενώ στη συνέχεια αυξήθηκε φθάνοντας στο 92%. Τέλος, η νεομυκίνη αποδείχθηκε το αντιβακτηριακό στο οποίο τα περισσότερα απομονωθέντα στελέχη *E. coli* (83-97%) ήταν ανθεκτικά κατά την εξεταζόμενη πενταετία. Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι την τελευταία χρονιά εμφανίστηκαν τα πλέον ανθεκτικά στελέχη *E. coli*. Το 6% (3/49) των απομονωθέντων στελεχών της τελευταίας χρονιάς ήταν ανθεκτικά και στις 8 αντιβακτηριακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα της έρευνας προκύπτει ότι η *E. coli* ήταν το συχνότερο παθογόνο αίτιο κλινικής μαστίτιδας των αγελάδων, όπως εξάλλου συμβαίνει και σε άλλες χώρες (Schukken και συν. 1989, Wilesmith και συν. 1986). Στη Μ. Βρετανία (Barrow και Hill 1989), σε 470 δείγματα γάλακτος από κλινική μαστίτιδα η *E. coli* απομονώθηκε στο 90% των δειγμάτων, ενώ στην Ολλανδία από 1103 τυχαία δείγματα η *E. coli* απομονώθηκε στο 16,9% και θεωρήθηκε, επίσης, ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας κλινικής μαστίτιδας (Milteneburg και συν. 1996). Μολονότι η *E. coli* κατά τους Steras και συν. (1994) δε θεωρείται ισχυρός λοιμογόνος παράγοντας, εντούτοις φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη συχνότητα προσβολής του μαστού των αγελάδων. Ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον των ζωοστασίων, με αποτέλεσμα να μολύνεται ο μαστικός αδένας, εξαι-

The seasonal variation of 269 dairy herds showed that 80 of them were obtained during winter, whereas 74 in summer (Figure 1). According to the statistical analysis (ANOVA), no significant difference was observed ( $p > 0.05$ ) regarding the mean number of herds examined each season.

The prevalence (%) of 8 antibacterial-resistant isolates of *E. coli* is shown in Figure 2. Approximately 82% of *E. coli* isolates were resistant to tetracycline in the first three years of the survey and consequently the proportion increased to 96%. Concerning enrofloxacin, the resistance ranged in low levels in comparison with the other antibacterials, but with a rising trend from 10% during the first year until 31%, which occurred in the last two years of this survey. A variation of 58% to 80% of *E. coli* isolates were resistant to gentamicin. The higher proportion appeared in the last year (80%). The mean percentages of cephalosporines (cefoperazone and cefuroxime) varied from 47 to 75%, with the exception of cefuroxime-resistant isolates, where an increase to 90% was observed during the last year. The proportion of resistant-strains to sulphomethoxazole-trimethoprim varied between 46 to 81%. In the first two years the proportion increased from 46% to 81%, whereas the last three years the mean value was 69%. Antibioresistance of *E. coli* strains to ampicillin was stable in the first two years (71-72%), whereas it increased reaching 92% the last three



τίας των πλημμελών συνθηκών υγιεινής. Η μόλυνση από *E. coli* δεν αντιμετωπίζεται με τα συμβατικά σχήματα καταπολέμησης, όπως η απολύμανση των θηλών του μαστού και η χορήγηση αντιβιοτικών κατά την ξηρά περίοδο. Πιστεύεται ότι είναι πιο αποτελεσματικός ο έλεγχος των μαστίτιδων από *E. coli*, όταν στηρίζεται στην υγιεινή πριν την άμελξη, με τη χρήση άφθονου νερού και την καλή πλύση των θηλών και του μαστού πριν την εφαρμογή της αμελκτικής μηχανής (Eberhart 1984).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι σημαντικά αίτια κλινικής και υποκλινικής μαστίτιδας (Quinn et al. 1994). Οι Ηλιάδης και συν. (1997) αναφέρουν ότι οι πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι ενοχοποιούνται κυρίως για την πρόκληση υποκλινικής μαστίτιδας. Από τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας επιβεβαιώνεται η άποψη ότι η κλινική μαστίτιδα από πηκτάση-αρνητικούς σταφυλόκοκκους είναι συχνή (22,5% των δειγμάτων). Η συχνότητα της στρεπτοκοκκικής μαστίτιδας (2,3% των δειγμάτων γάλακτος) πιθανόν να είναι στην πραγματικότητα μεγαλύτερη, αλλά οι στρεπτόκοκκοι προκαλούν ήπιας μορφής μαστίτιδα που αναγνωρίζεται εύκολα και ανταποκρίνεται στη θεραπευτική αγωγή κατά την άσκηση της κτηνιατρικής κλινικής πράξης (Schalm και συν. 1971). Επιπλέον, η μείωση της συχνότητας στρεπτοκοκκικής μαστίτιδας παρατηρείται διεθνώς (Wang και συν. 1999). Η αυξημένη παρουσία των μικτών μολύνσεων υποδηλώνει τη μέτρια υγιονομική κατάσταση που επικρατεί σε πολλές εκτροφές βοοειδών. Το ποσοστό των δειγμάτων που ήταν αρνητικά στις καλλιέργειες, παρόλο που προέρχονταν από περιστατικά κλινικών μαστίτιδων έφτασε στο 4,3%. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται υψηλότερα ποσοστά που κυμαίνονται από 18% (Pearson και Mackie 1979) μέχρι 38% (Daniel και συν. 1982). Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε σημαντικό βαθμό στην αδυναμία των θρεπτικών υποστρωμάτων να ανιχνεύσουν τους Gram θετικούς μικροοργανισμούς. Στις περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας από *Staphylococcus aureus* εκτιμάται ότι με μία μόνο καλλιέργεια η ευαισθησία της μεθόδου δεν υπερβαίνει το 75% (Sears και συν. 1990). Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και με άλλους Gram θετικούς μικροοργανισμούς, όπως ο *Streptococcus uberis*, όχι όμως και ο *Streptococcus agalactiae* (Smith και συν. 1985, Chamings 1984). Ακόμα, είναι δυνατόν το αρνητικό αποτέλεσμα να οφείλεται στην προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών, που δεν αναφέρεται από το ιστορικό, αλλά και στην αδυναμία των συμβατικών μικροβιολογικών μεθόδων να ανιχνεύουν πολύ μικρούς αριθμούς βακτηρίων στο δείγμα που εξετάζεται (White και Montgomery 1987).

Η εποχική έξαρση των μαστίτιδων, που παρατηρείται σε άλλες χώρες (Schukken και συν. 1989, Gonzalez και συν. 1990) κατά τους χειμερινούς μήνες, ιδίως όταν επικρατεί υγρασία, οπότε οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο περιβάλλον, δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά στη δική μας έρευνα.

Η ανθεκτικότητα των αντιβακτηριακών που χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση της μαστίτιδας από την *E.*

years. Finally, neomycin proved to be the antibiotic, in which the majority of the *E. coli* strains (83-97%) was resistant during the survey. It is important to notify that, during the last year, multi-resistant mutants to *E. coli* appeared. 6% (3/49) of the isolated strains of the last year were resistant in all the antibacterials used in this survey.

## DISCUSSION

It is concluded from the results of this survey that *E. coli* was the predominant isolated pathogen from cases of clinical mastitis. The same results were referred in Holland (Schukken et al. 1989) and Great Britain (Wilesmith et al. 1986). In Great Britain, *E. coli* was isolated in 90% of 470 mastitic milk samples (Barrow and Hill 1989), whereas in Holland the pathogen was isolated in 16.9% of 1103 milk samples selected in random and was considered to be the causative agent of clinical mastitis (Miltenburg et al. 1996).

*Escherichia coli* seems to play an important role in the incidence of clinical bovine mastitis, although Steras et al (1994) considers that *E. coli* is not a high pathogenic factor. The microorganism is usually found in large numbers in the farms' environment and infection can be transmitted by environmental contamination of the udder, due to poor hygienic conditions. The *E. coli* infection rate is not reduced by conventional mastitis control schemes that employ germicidal teat dips and antibiotic therapy of dry cows. Control of *E. coli* mastitis based on premilking hygiene, including sparing use water and careful drying of teats and udder before applying the milking machine, is believed to be more effective (Eberhart 1984).

Staphylococci are important agents responsible for clinical and subclinical mastitis (Quinn et al. 1994). Iliadis et al (1997) claims that CNS are incriminated as causative agents of clinical mastitis. The results of this survey confirmed the aspect that clinical mastitis, due to CNS, is frequent (22.5% of samples). The prevalence of streptococcal mastitis (2.3%) is possibly higher, causing mild mastitis easily recognizable and cured in current veterinary practice (Schalm et al. 1971). Furthermore, a decline in the incidence of clinical mastitis due to streptococci is observed all over the world (Wang et al. 1999). The increased presence of mixed cultures implies the poor sanitary level of dairy farms. Negative samples reached the 4.3%, even though they originated from clinical mastitis. In the bibliography, large numbers of clinical cases of bovine mastitis, in which no etiological agent could be demonstrated on culture, are reported; these percentages varied from 18% (Pearson and Mackie 1979) to 38% (Daniel et al. 1982). The fact is mainly attributed to the inability of media to detect Gram positive microorganisms. In cases of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, it is estimated that a single culture has a test sensitivity of only 75% (Sears et al. 1990). The same phenomenon was observed with the other Gram positive bacteria, like *Streptococcus uberis* and *Streptococci* spp other than *Streptococcus agalactiae* (Smith et al. 1985,



*coli* αποσχολεύει όλες τις κτηνοτροφικά αναπτυγμένες χώρες (Wegt και Bleckmann 1977, Bishop και συν. 1980, Verheijden και van Miert 1985, Wilson και Gilbert 1986, Wilson και συν. 1986, Barrow και Hill 1989, Hartmann 1990). Στην παρούσα έρευνα η αντιβιοαντοχή των στελεχών της *E. coli* ήταν ιδιαίτερα υψηλή, με αποτέλεσμα να μειώνεται επικίνδυνα το περιθώριο χρησιμοποίησης των αντιβακτηριακών κατά των μαστίτιδων. Ταυτόχρονα, όμως, εγείρεται το πρόβλημα της κατάχρησης των αντιβακτηριακών και της εφαρμογής των κανόνων της κτηνιατρικής δεοντολογίας στην αγελαδοτροφία.

Η συχνότητα (%) των απομονωθέντων ανθεκτικών στελεχών *E. coli* ποικίλλει, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο αντιβακτηριακό ή το συνδυασμό αυτών. Το μέγεθος του προβλήματος της ανθεκτικότητας της *E. coli* φαίνεται και από το γεγονός της εμφάνισης πολυανθεκτικών στελεχών, κατά την τελευταία χρονιά της έρευνας, προερχόμενα από διαφορετικές περιοχές. Ταυτόχρονα, όμως, υπάρχουν σημαντικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία, επειδή διασπείρονται στελέχη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβακτηριακά. Η μετάδοση της ανθεκτικότητας σε άλλα εντεροβακτηριοειδή γίνεται μέσω πλασμιδίων ανθεκτικότητας. Η παρουσία των πλασμιδίων αποδείχθηκε από τους Barrow και Hill (1989), οι οποίοι ανέφεραν ότι η πλειονότητα των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από κλινική μαστίτιδα έφερε τουλάχιστον ένα ή περισσότερα πλασμίδια ανθεκτικότητας.

Από τα αποτελέσματα της έρευνας προκύπτει ότι 1) η *E. coli* κυριαρχεί ως αίτιο κλινικής μαστίτιδας αγελάδων στην Ελλάδα, 2) η αντιβιοανθεκτικότητα των στελεχών *E. coli* αποτελεί πλέον σημαντικό πρόβλημα για την καταπολέμηση της μαστίτιδας των αγελάδων και τέλος 3) είναι σαφές ότι εγείρεται το πρόβλημα της κατάχρησης των αντιβιοτικών και της εφαρμογής των κανόνων της κτηνιατρικής δεοντολογίας στην αγελαδοτροφία. Επιπλέον, προτείνεται ότι η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής με τη σωστή διαχείριση των αγελάδων πριν την άμεγξη μειώνει τον κίνδυνο περιβαλλοντικής μόλυνσης από *E. coli*. Η χορήγηση αντιβιοτικών είναι υπευθυνότητα του κτηνιάτρου μέσα στο πλαίσιο των παθογόνων βακτηρίων που εμπλέκονται, της επιδημιολογίας, της οδού χορήγησης, της δοκιμής ευαισθησίας, της φαρμακοκινητικής του παθογόνου παράγοντα και της πρόγνωσης της νόσου, που έχουν ως στόχο ένα καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα και τη μείωση της πιθανότητας για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιβακτηριακά. □

Chamings 1984). Furthermore, the negative result is probably due to the presence of antibacterial agents which weren't recorded in the herd clinical history or to the inability of conventional microbiological methods to detect low numbers of pathogens in the sample (White and Montgomery 1987).

The seasonal variation of mastitis, which was observed in other countries (Schukken et al. 1989, Gonzalez et al. 1990) during the winter, when the humidity and the climate conditions favor the growth of microorganisms in the environment, it was not confirmed in our study.

The resistance of antibacterial agents that is used in the treatment of *E. coli* mastitis occupies all developed cattle-raising countries (Wegt and Bleckmann 1977, Bishop et al 1980, Verheijden and van Miert 1985, Wilson and Gilbert 1986, Wilson et al 1986, Barrow and Hill 1989, Hartmann 1990). In the present study, the antibioresistance was clearly higher in comparison with other investigations, so that the margin of antibacterials used against mastitis has dangerously decreased. Simultaneously, the problem of overuse and prolonged administration of antibiotics and the application of rules in current veterinary medicine arises.

The prevalence (%) of isolated resistant-*E. coli* varies, depending on the used antibacterials or the combination of these. Additionally, the problem of resistant-*E. coli* isolates has appeared to be difficult, because of the presence of poly-multi-resistant mutants, during the last year of the survey, which originated from different regions. Simultaneously, however, the public health is threatened, because of the distribution of antibacterial-resistant strains. The transmission of resistance in other enterobacteria becomes via resistant-plasmids. The presence of plasmids was proved by Barrow and Hill (1989). They reported that the majority of *E. coli* strains, isolated by clinical mastitis cases, brought at least one or more of resistant plasmids.

It was concluded that 1) *E. coli* dominates as a causative agent of clinical mastitis in cattle in Greece, 2) antibioresistant *E. coli* strains constitute an important problem for the control of cows mastitis and finally 3) it is explicit that the problem of indiscriminated use of therapeutic agents and application of rules of veterinary deontology in cattle herds is raised. Additionally, it is suggested that the improvement of hygienic conditions with good premilking management reduce the danger of *E. coli* environmental infection. The administration of antibiotics is the responsibility of the veterinarian, under the frame of the pathogenic bacteria involved, the epidemiological history, the route of administration, the sensitivity test, the pharmacokinetics of the agent and the prognosis of the disease, targeting in a better therapeutic result and minimising the likelihood of developing antibacterial resistance. □

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Barrow PA, Hill AW (1989) The virulence characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. *Vet Microbiol*, 20:35-48
- Bishop JR, Bodine AB, Janzen JJ (1980) Sensitivities to antibiotics and seasonal occurrence of mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 63:1134-1137
- Boulton MG, Ross GW (1977) Resistance of cephalosporin-benzylpenicillin combinations to destruction by beta-lactamases associated with bovine mastitis. *J Comp Pathol*, 87:145-149
- Carter GR, Chengappa MM (1991) Antimicrobial drugs. In: *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 4th ed, Lea & Febiger, : 91-94
- Chengappa MM (1990) Antimicrobial agents and susceptibility testing. In: *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*. 5th ed, Academic Press, : 479-492
- Chamings RJ (1984) The effect of not treating mild cases of clinical mastitis in a dairy herd. *Vet Rec*, 115:499-500
- Daniel RC, O'Boyle D, Marek MS, Frost AJ (1982) A survey of clinical mastitis in South-East Queensland dairy herds. *Aust Vet J*, 58:143-147
- Eberhart RJ (1984) Coliform mastitis *Vet Clin North Am Large Anim Pract*, 6:287-300
- Gonzalez RN, Jasper DE, Kronlund NC, Farver TB, Cullor JS, Bushnell RB, Dellinger JD (1990) Clinical mastitis in two California dairy herds participating in contagious mastitis control programs. *J Dairy Sci*, 73:648-660
- Hartmann H (1990) Rates of resistance of mastitis pathogens from cows in Switzerland. *Schweiz arch Tierheilkd*, 132:325-329
- Hill AW (1994) *Escherichia coli* mastitis. In: CL Gyles, *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*,
- Honkansen-Buzalski T, Myllys V, Pyorala S (1994) Bovine clinical mastitis due to coagulase negative *Staphylococci* and their susceptibility to antimicrobials. *J Vet Med B*, 41:344-350
- Iliadis N, Petridou Ev, Foukos A (1997) Clinical and subclinical bovine mastitis in area of Kilkis. *Bul Hel Vet Med Soc*, 48:32-36
- Kremer WD, Lohuis JA, Schukken YH (1989) *Escherichia coli* mastitis in cattle.III. Antibacterial therapy. *Tijdschr Diergeneeskde*, 114:939-948
- Linton AH, Howe K, Sojka WJ, Wray C (1979) A note on the range of *Escherichia coli* O-serotypes causing clinical bovine mastitis and their antibiotic resistance spectra. *J Appl Bacteriol*, 46:585-590
- Miltenburg JD, de Lange D, Crauwels APP, Bongers JH, Tielen MJM, Schukken YH, Elbers ARW (1996) Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Vet Rec*, 139:204-207
- Pearson JK, Mackie DP (1979) Factors associated with the occurrence, cause and outcome of clinical mastitis in dairy cattle. *Vet Rec*, 105:456-463
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (1994) Mastitis. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, : 327-344
- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC (1971) *Bovine Mastitis*. Lea and Febiger, Philadelphia
- Schukken YH, Grommers FJ, Geer D van de, Brand A (1989) Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell counts in bulk milk. *Vet Rec*, 125:60-63
- Steras O, Aursj J, Gronnings Aeter Gjøl G, Jorstad A (1994) Effect of dry-cow therapy on subclinical mastitis - an evaluation of long-acting and short-acting intramammary J *Vet Med B*, 41:529-540
- Sears PM, Smith BS, English PB, Herer PS, Gonzalez RN (1990) Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci*, 73:2785-2789
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS (1985) Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J Dairy Sci*, 68:402-417
- Verheijden JH, van Miert AS (1985) Therapeutic aspects of *coli* mastitis in ruminants. *Vet Med Nauki*, 22:40-47
- Wang SM, Peighton MA, Capstick JA, Geiraty (1999) Epidemiological typing of bovine streptococci by pulse field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect* 123: 317-324
- Watts JL (1988) Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 16:41-66
- Weigt U, Bleckmann E (1977) Sensitivity tests and therapy of mastitis. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 84:234-235
- White ME, Montgomery ME (1987) The resemblance of clinical attributes between mastitic cows with no growth on bacterial milk cultures and those with gram-positive bacteria cultured. *Can J Vet Res*, 51:181-184
- Wilesmith JW, Frances PG, Wilson CD (1986) Incidence of clinical mastitis in a cohort of British dairy herds. *Vet Rec*, 118:199-204
- Wilson CD, Agger N, Gilbert GA, Thomasson CA, Tolling ST (1986) Field trials with cefoperazone in the treatment of bovine clinical mastitis. *Vet Rec*, 118:17-19
- Wilson CD, Gilbert GA (1986) Pharmacokinetics of cefoperazone in the cow by the intramammary route and its effect on mastitis pathogens in vitro. *Vet Rec*, 118:607-609
- Ziv G (1976) Activity of four cephalosporin antibiotics in vitro against bovine udder pathogens and pathogenic bacteria isolated from newborn calves. *Antimicrob Agents Chemother*, 9:418-421