

## Osjetljivost izdvojenih uzročnika mastitisa prema antimikrobnim tvarima

doi: 10.15567/mljekarstvo.2015.0301

Petra Leskovec<sup>1</sup>, Darija Bendelja Ljoljić<sup>2</sup>, Miroslav Benić<sup>3\*</sup>,  
Antun Kostelić<sup>4</sup>, Željko Cvetnić<sup>3</sup>, Neven Antunac<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Horvatova 11, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup>Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za mljekarstvo, Svetošimunska 25,  
10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup>Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, 10000 Zagreb

<sup>4</sup>Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za opće stočarstvo, Svetošimunska 25,  
10000 Zagreb, Hrvatska

Prispjelo - Received: 25.04.2014.

Prihvaćeno - Accepted: 01.06.2015.

### Sažetak

U suvremenoj govedarskoj proizvodnji veliki problem predstavlja mastitis, kako u ekonomskom tako i u dijagnostičkom smislu. Do izravnih ekonomskih gubitaka za proizvođača dolazi zbog smanjene mliječnosti, promijenjenog sastava mlijeka, troškova liječenja, gubitka jedne ili više četvrti vimena, karence i povećanog utroška rada. Najveće štete u proizvodnji mlijeka uzrokuju supkliničke (nevidljive) upale. Cilj ovoga rada bio je utvrditi osjetljivost pojedinih bakterijskih uzročnika mastitisa na antimikrobne tvari u pripravcima za liječenje mastitisa koji se koriste u Republici Hrvatskoj. Uzročnici mastitisa izdvojeni su na hranjivoj podlozi eskulin krvni agar te podvrgnuti testu osjetljivosti na 8 antimikrobnih tvari. Najveća osjetljivost sojeva bakterije *Staphylococcus aureus* utvrđena je prema amoksicilinu s klavulanskom kiselinom i cefoperazonu, dok je izrazita rezistencija zapažena prema penicilinu i ampicilinu (gotovo 100 %). Također, utvrđena je i relativno visoka učinkovitost ampicilina (96,1 %), amoksicilina s klavulanskom kiselinom (94,1%) i penicilina (92,8 %) na sojeve bakterije *Streptococcus uberis*, dok je najmanju osjetljivost bakterija imala prema streptomycinu. Kroz rezultate analiza vidljivo je da je sve veći broj bakterija razvio rezistentnost na određene antimikrobne tvari.

*Ključne riječi:* mastitis, mlijeko, bakterije, antibiogram, antibiotici

### Uvod

U suvremenoj govedarskoj proizvodnji najvažniji je proizvod higijenski kvalitetno mlijeko. Da bi mlijeko bilo higijenski ispravno ono mora sadržavati manje od 100.000 mikroorganizama/mL i manje od 400.000 somatskih stanica/mL. Ne smije sadržavati patogene mikroorganizme koji mogu uzrokovati bolesti kod ljudi, ne smije sadržavati ostatke lijekova i ne smije biti kontaminirano kemijskim tvarima niti toksinima mikroorganizama (Hadžiosmanović, 2001). Na higijensku kvalitetu mlijeka posredno i neposredno utječu zdravlje životinje, postupak prema životinji, krmiva korištena u hranidbi, postupci

tijekom mužnje, higijena mužnje, postupak s mlijekom neposredno nakon mužnje, temperatura i brzina hlađenja mlijeka, higijena staje i izmuzišta, funkcionalno-tehnička ispravnost i higijena muznog uređaja. Mastitis je najčešće oboljenje mliječne žlijezde a nastaje kao posljedica ulaska i štetnog djelovanja patogenih mikroorganizama u mliječnoj žlijezdi. Upala će biti izazvana ako je neki od navedenih čimbenika (nepravilna mužnja, stres) smanjio lokalnu otpornost mliječne žlijezde ili čitavog organizma. Do sada je poznato oko 150 različitih vrsta mikroorganizama koje su u stanju uzrokovati mastitis. Najčešći uzročnici mastitisa su bakterije *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus uberis* (Reksen i sur., 2006; Riekerink i

\*Dopisni autor/Corresponding autor: e-mail: benic@veinst.hr

sur., 2008; Jurmanović i sur., 2012), dok se sporadično pojavljuju i drugi uzročnici poput *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. itd. Učestalost pojave infekcije varira kako između zemalja tako i unutar pojedine zemlje. Prema literaturnim podacima učestalost pojave infekcije uzrokovane bakterijom *S. aureus* varira od 2 % u Danskoj do čak 47 % u Norveškoj (Reksen i sur., 2006). Slična istraživanja provedena su i u Hrvatskoj te je tijekom osmogodišnjeg vremenskog razdoblja uočena manja učestalost pojave infekcije, svega 11-12 % (Jurmanović i sur., 2012). Pojedine metode kao npr. disk difuziona, diluciona metoda u agaru, metoda dilucije i mikrodilucije u bujonu, pogodne su za *in vitro* utvrđivanje osjetljivosti uzročnika mastitisa na pojedine antimikrobne tvari (Kalmus i sur., 2011). Veliki broj bakterija uzročnika mastitisa razvio je otpornost na pojedine lijekove, tako su npr. istraživanja provedena u Velikoj Britaniji pokazala visoku otpornost (56 %) soja bakterije *S. aureus* na penicilin (Bradley i sur., 2007).

Mastitis se može dijagnosticirati na 2 načina: metodama prilagođenim terenskim uvjetima te laboratorijskim metodama. Bakteriološku pretragu mlijeka i antibiogram preporučljivo je provesti u slučaju povišenog broja somatskih stanica. Izrada antibiograma je sastavni dio bakteriološke pretrage te je rezultat laboratorijskog testiranja osjetljivosti izoliranih bakterija na različite antibiotike. Izradi antibiograma prethodi izolacija i identifikacija uzročnika infekcije. Ova metoda je jednostavna, jeftina, brzo daje rezultate (već za 18-24 sata nakon izolacije i identifikacije bakterije) i omogućava ispitivanje osjetljivosti izolata na više antibiotika istovremeno. Antibiotici su farmakološki agensi koji mogu potpuno uništiti patogene mikroorganizme, zaustaviti njihov rast ili razmnožavanje bez značajnog oštećenja organizma domaćina. Antimikrobne tvari primjenjuju se u životinja u svrhu liječenja, sprečavanja pojave bolesti ili za ubrzanje rasta životinja (Šeol i sur., 2010).

Premda se u današnje vrijeme sve više koriste antibiotici, njihova primjena nije uvijek opravdana. Glavne pogreške su izbor nedjelotvornog antibiotika, krivo doziranje, davanje pogrešne kombinacije antibiotika, nastavak liječenja nakon pojave rezistentnosti. Pri odabiru antibiotika treba voditi računa o kliničkom djelovanju lijeka, toksičnosti za životinju, rizicima od nastanka mikrobnog rezistentnosti, utjecaju na fiziološku mikrofloru (Šeol i sur., 2010). Prisutnost rezidua antibiotika u mlijeku može uzrokovati velike ekonomske gubitke u mljekarskoj in-

dustriji (Samaržija i Antunac, 2002). Životinje koje boluju od mastitisa proizvode manje mlijeka, mlijeko ima slabija preradbeno svojstva a najizraženije promjene događaju se u udjelu i međusobnom odnosu proteinskih sastojaka. U mlijeku s povišenim brojem somatskih stanica smanjen je udio kazeina, za prerađivače mlijeka najvažnije proteinske komponente a povećan je udio sirutkinih proteina. Osim promjene kemijskog sastava mlijeka, mastitis dovodi i do drugih neželjenih osobina mlijeka ili proizvoda dobivenih od takvog mlijeka. Povećana aktivnost enzima u mlijeku iz oboljele mliječne žlijezde može dovesti i do promjene organoleptičkih osobina gotovih proizvoda kao i do lošije održivosti takvih proizvoda. Do izravnih ekonomskih gubitaka za proizvođača dolazi zbog odbacivanja higijenski neispravnog mlijeka za vrijeme karence, povećanja troškova proizvodnje zbog povećanog opsega rada s bolesnim životinjama, veterinarskih troškova, izdataka za lijekove. Najveći gubitak je u tome što se krave s mastitisom često moraju prijevremeno isključiti iz uzgoja.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti *in vitro* osjetljivost uzročnika mastitisa krava na antimikrobne tvari zastupljene u lijekovima za intramamarnu primjenu te ukazati na važnost pravilnog odabira lijeka za liječenje infekcija mliječne žlijezde kako bi liječenje mastitisa bilo što uspješnije.

## Materijal i metode rada

Uzročnici mastitisa izdvojeni su iz uzoraka sekreta vimena od 550 krava, dostavljenih u Hrvatski veterinarski institut. Izdvajanje uzročnika obavljeno je na hranjivoj podlozi eskulin krvni agar (EK). Nacijepljene hranjive podloge inkubirane su u termostatu pri 37 °C tijekom 24 sata, a porasle kolonije identificirane su na temelju morfoloških (oblik, veličina i struktura kolonija) i fizioloških osobina (stvaranje pigmenta, izazivanje CAMP fenomena, razgradnja eskulina, sposobnost zgrušavanja plazme kunića, bojenje po Gramu). Kolonije bakterija poraslih na EK podlozi koje nije bilo moguće identificirati samo morfološki na eskulin krvnom agaru, precijepljene su na selektivne i diferencijalne podloge i to:

- kolonije koje su morfološki odgovarale stafilokokima na Baird-Parker agar,
- kolonije koje su morfološki odgovarale streptokokima na agar za ispitivanje CAMP fenomena te na kanamicin-eskulin azid agar, kada na EK podlozi nije bilo moguće razlikovati streptokoke od enterokoka,

- gram negativne bakterije na podlogu s trostrukim šećerom (TSI) i na MacConkey agar u slučaju kada na TSI podlozi nije bilo moguće odrediti rod ili vrstu,
- kvasce i plijesni na Sabouraud agar.

Kolonije kojima nije bilo moguće odrediti pripadnost gram-pozitivnima ili gram-negativnima, prije dodatnih testova za identifikaciju, podvrgnute su testovima (KOH i bojenje po Gramu) radi utvrđivanja pripadnosti. Determinacija je provedena u skladu s preporukama National mastitis council (1999). Ovako izdvojeni sojevi podvrgnuti su testu osjetljivosti na 8 antimikrobnih tvari u skladu s preporukama *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - third edition M31-A2*. Suspenzije bakterijskih kultura nacijspljene su na površinu hranjive ploče s Müller Hinton agarom i nakon sušenja površine, postavljeni su papirnati diskovi sa standardnom količinom antimikrobne tvari. Nakon inkubacije tijekom noći na 37 °C provedeno je mjerenje zone inhibicije porasta bakterijske kulture.

## Rezultati i rasprava

Mastitis je jedan od glavnih zdravstvenih problema u stadima muznih krava. Štete koje izaziva su višestruke, a pogađaju i proizvođače i prerađivače mlijeka. Sustav kontrole higijenske, odnosno zdravstvene ispravnosti mlijeka u Republici Hrvatskoj ustrojen je na način da na što manju razinu svede rizik pojave bolesti i patoloških stanja u potrošača mlijeka i mliječnih proizvoda.

Rezultati istraživanja su razvrstani prema osjetljivosti, odnosno, neosjetljivosti uzročnika mastitisa na određene antibiotike. U tablici 1 prikazana je osjetljivost bakterije *S. aureus* prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari.

Bakterije vrste *S. aureus*, u najvećem su broju uzoraka bile osjetljive na amoksicilin s klavulanskom kiselinom (79,3 %) i cefoperazon (75,1 %), dok na ampicilin i penicilin nisu bile osjetljive. U sličnim istraživanjima također je utvrđeno da je veliki udio pripadnika ove vrste izdvojenih iz sekreta vimena neosjetljiv na penicilin i ampicilin (Malinowski i sur., 2002; Kalmus i sur., 2011; Klimienè i sur., 2011) dok su Jurmanović i sur., (2012) utvrdili postotak sojeva (od 93,85 % do 95,65 %) osjetljivih na

Tablica 1. Osjetljivost bakterije *S. aureus* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksicilin + klavulanska kiselina	1198 (100 %)	951 (79,3 %)	5 (0,4 %)	242 (20,2 %)
Ampicilin	1198 (100 %)	2 (0,1 %)	2 (0,1 %)	1194 (99,6 %)
Kanamycin	1198 (100 %)	136 (11,3 %)	602 (50,2 %)	460 (38,3 %)
Neomicin	1198 (100 %)	276 (23 %)	662 (55,2 %)	260 (21,7 %)
Penicilin	1198 (100 %)	2 (0,1 %)	-	1196 (99,8 %)
Streptomycin	1198 (100 %)	117 (9,7 %)	563 (46,9 %)	518 (43,2 %)
Tetraciklin	1198 (100 %)	487 (40,6 %)	389 (32,4 %)	322 (26,8 %)
Cefoperazon	1198 (100 %)	900 (75,1 %)	277 (23,1 %)	21 (1,7 %)

amoksicilin s klavulanskom kiselinom. O kakvim se razmjerima šteta radi uslijed smanjene proizvodnje mlijeka inficiranih krava, najbolje ilustrira podatak da krava s infekcijom mliječne žlijezde uzrokovanom bakterijom *S. aureus*, proizvodi oko 15 % manje mlijeka. Treba naglasiti da je upravo ovaj uzročnik najčešće izdvojeni uzročnik mastitisa u Hrvatskoj, ali i u većini drugih zemalja (Østeras i sur., 2006; Riekerink i sur., 2008; Jurmanović i sur., 2012). U istraživanju provedenom u Njemačkoj utvrđeno je kako prevalencija sojeva bakterije *S. aureus* raste s dobi i stadijem laktacije (Tenhagen i sur., 2006). Wilson i sur., (1997) ističu kako je *S. aureus* dominantan uzročnik mastitisa te da je odgovoran pojavi 47 % kliničkih oblika mastitisa. U dosadašnjim istraživanjima osjetljivosti stafilokoka prema antibioticima provedenim u Hrvatskoj, najučinkovitije tvari bile su cefoperazon i kombinacija amoksicilina s klavulanskom kiselinom, a učinkovitost je bila 97 %, odnosno 100 % (Jurmanović i sur., 2012). Iz prikazanih rezultata ovog istraživanja vidljivo je da su pripadnici vrste *S. aureus* u znatno manjoj mjeri osjetljivi na aktivne tvari koje su do sada bile vrlo učinkovite. Zabrinjavajuća je činjenica da je postotak osjetljivih sojeva ovog uzročnika prema do sada vrlo djelotvornim aktivnim tvarima poput navedenih

pao na 79 %, odnosno 75 %. Od ranije je poznata neosjetljivost stafilokoka na ostale beta-laktamske antibiotike kao što je penicilin. Tako Kalmus i sur., (2011) iznose kako su izolati bakterije *S. aureus* imali visoku razinu otpornosti na penicilin (61,4%) i ampicilin (59,5 %). U istraživanju Benića i sur., (2003) svega je 15 % pretraženih sojeva bilo osjetljivo prema peniculinu, dok je ovim istraživanjem utvrđeno da su gotovo svi sojevi ove bakterije bili rezistentni na penicilin. Visok stupanj rezistencije stafilokoka prema peniculinu zabilježen je i u istraživanjima drugih autora. Tako Teale i David (1999) navode da je gotovo polovina pretraženih sojeva bakterije *S. aureus* bila rezistentna na penicilin i ampicilin dok Erskine i sur., (2002) i Güller i sur., (2005) ističu visoku otpornost (50,4 %; 63,3 %) sojeva bakterije *S. aureus* u slučajevima kliničkog mastitisa u SAD-u odnosno u Turskoj. Osjetljivost bakterije *Streptococcus agalactiae* prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari prikazana je u tablici 2.

Izolati bakterije *S. agalactiae* u najvećem broju uzoraka bili su osjetljivi na amoksicilin s klavulanskom kiselinom (86,2 %) i cefoperazon (87 %), dok je 98,3 % izdvojenih bilo neosjetljivo prema kanamicinu, neomicinu, peniculinu i streptomycinu.

Tablica 2. Osjetljivost bakterije *S. agalactiae* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksicilin + klavulanska kiselina	124 (100 %)	107 (86,2 %)	3 (2,4 %)	14 (11,2 %)
Ampicilin	124 (100 %)	4 (3,2 %)	-	120 (96,7 %)
Kanamicin	124 (100 %)	1 (0,8 %)	1 (0,8 %)	122 (98,3 %)
Neomicin	124 (100 %)	1 (0,8 %)	1 (0,8 %)	122 (98,3 %)
Penicilin	124 (100 %)	2 (1,6 %)	-	122 (98,3 %)
Streptomycin	124 (100 %)	1 (0,8 %)	-	122 (98,3 %)
Tetraciklin	124 (100 %)	-	3 (2,4 %)	121 (97,5 %)
Cefoperazon	124 (100 %)	108 (87 %)	14 (11,2 %)	2 (1,6 %)

Usporedbom rezultata koji se odnose na osjetljivost bakterije *S. agalactiae* prema amoksicilinu s klavulanskom kiselinom i prema cefoperazonu, ukazuje na porast rezistencije prema navedenim tvarima. U ovom istraživanju postotak osjetljivih sojeva prema navedenim tvarima iznosi 86 %, odnosno 87 % dok su Benić i sur., (2003) utvrdili 100 % odnosno 99 %. Kalmus i sur., (2011) također navode visoku razinu osjetljivosti svih streptokoka prema penicilinu i ampicilinu osim jednog izolata *S. uberis*. U tablici 3 prikazana je osjetljivost bakterije *Streptococcus dysgalactiae* prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari.

Pripadnici vrste *S. dysgalactiae* su u najvećem broju uzoraka (91,5 %) bili osjetljivi na amoksicilin s klavulanskom kiselinom, dok je najveća neosjetljivost (96,3 %) izražena prema streptomycinu. Također, Østerås i sur., (2006), navode da 36,1 % pripadnika ove vrste izdvojenih iz sekreta vimena rezistentan na penicilin G, 19,9 % na streptomycin i 2,6 % na tetraciklin dok Hendriksen i sur., (2008) navode kako je u većini zemalja obuhvaćenim istraživanjem, utvrđen vrlo visok stupanj rezistencije prema tetraciklinu. Kalmus i sur., (2011) utvrdili su da je od ukupno 90 % izolata bakterije *S. dysgalac-*

*tiae* 19,8 % klasificirano sa srednjom osjetljivošću i 32,2 % s neosjetljivošću na tetraciklin. U tablici 4 prikazana je osjetljivost bakterije *S. uberis* prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari.

Relativno visoka učinkovitost pojedinih antimikrobnih tvari može se zapaziti prema ostalim streptokokima i srodnim bakterijama (enterokoki). Tako je na primjer 96,1 % pretraženih sojeva bakterije *S. uberis* osjetljivo na ampicilin, a slične vrijednosti su uočene i za ostale beta-laktamske antibiotike kao što je penicilin. Ampicilin i amoksicilin s klavulanskom kiselinom najdjelotvornije su tvari i kada je riječ o enterokokima, što je sukladno rezultatima istraživanja Tenhagen i sur., (2006). Najmanju osjetljivost bakterija je imala prema streptomycinu (97,4 %). Hendriksen i sur., (2008) navode kako se mastitis u goveda uzrokovan bakterijom *S. uberis* može liječiti upotrebom penicilina dok se korištenje tetraciklina ne preporuča zbog stvorene otpornosti na tu antimikrobnu tvar. U radu Kalmus i sur., (2011) od ukupno 151 izolata bakterije *S. uberis*, 7,3 % je klasificirano sa srednjom osjetljivošću i 14,3 % s otpornošću na tetraciklin. U tablici 5 prikazana je osjetljivost bakterije *Enterococcus* spp. prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari.

Tablica 3. Osjetljivost bakterije *S. dysgalactiae* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksicilin + klavulanska kiselina	166 (100 %)	152 (91,5 %)	1 (0,6 %)	13 (7,8 %)
Ampicilin	166 (100 %)	13 (7,8 %)	-	153 (92,1 %)
Kanamycin	166 (100 %)	3 (1,8 %)	12 (7,2 %)	151 (90,9 %)
Neomicin	166 (100 %)	-	11 (6,6 %)	155 (93,3 %)
Penicilin	166 (100 %)	8 (4,8 %)	-	158 (95,1 %)
Streptomycin	166 (100 %)	2 (1,2 %)	4 (2,4 %)	160 (96,3 %)
Tetraciklin	166 (100 %)	3 (1,8 %)	17 (10,2 %)	146 (87,9 %)
Cefoperazon	166 (100 %)	148 (89,1 %)	16 (9,6 %)	2 (1,2 %)

Tablica 4. Osjetljivost bakterije *S. uberis* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksisilin + klavulanska kiselina	154 (100 %)	145 (94,1 %)	-	9 (5,8 %)
Ampicilin	154 (100 %)	148 (96,1 %)	-	6 (3,8 %)
Kanamycin	154 (100 %)	1 (0,6 %)	9 (5,8 %)	144 (93,5 %)
Neomicin	154 (100 %)	2 (1,2 %)	4 (2,5 %)	148 (96,1 %)
Penicilin	154 (100 %)	143 (92,8 %)	-	11 (7,1 %)
Streptomycin	154 (100 %)	3 (1,9 %)	1 (0,6 %)	150 (97,4 %)
Tetraciklin	154 (100 %)	11 (7,1 %)	19 (12,3 %)	124 (80,5 %)
Cefoperazon	154 (100 %)	132 (85,7 %)	20 (12,9 %)	2 (1,2 %)

Tablica 5. Osjetljivost bakterija roda *Enterococcus* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksisilin + klavulanska kiselina	170 (100 %)	146 (85,8 %)	3 (1,7 %)	21 (12,3 %)
Ampicilin	170 (100 %)	158 (92,9 %)	-	12 (7 %)
Kanamycin	170 (100 %)	7 (4,1 %)	26 (15,2 %)	137 (80,5 %)
Neomicin	170 (100 %)	10 (5,8 %)	20 (11,7 %)	140 (82,3 %)
Penicilin	170 (100 %)	150 (88,2 %)	-	20 (11,7 %)
Streptomycin	170 (100 %)	30 (17,6 %)	5 (2,9 %)	135 (79,4 %)
Tetraciklin	170 (100 %)	3 (1,7 %)	17 (10 %)	150 (88,2 %)
Cefoperazon	170 (100 %)	95 (55,8 %)	63 (37 %)	12 (7 %)

Tablica 6. Osjetljivost bakterije *E. coli* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksicilin + klavulanska kiselina	173 (100 %)	95 (54,9 %)	22 (12,7 %)	56 (32,3 %)
Ampicilin	173 (100 %)	53 (30,6 %)	26 (15 %)	94 (54,3 %)
Kanamycin	173 (100 %)	15 (8,6 %)	89 (51,4 %)	69 (39,8 %)
Neomicin	173 (100 %)	82 (47,3 %)	67 (38,7 %)	24 (13,8 %)
Penicilin	173 (100 %)	-	-	173 (100 %)
Streptomycin	173 (100 %)	68 (39,3 %)	58 (33,5 %)	47 (27,1 %)
Tetraciklin	173 (100 %)	56 (32,3 %)	41 (23,6 %)	76 (43,9 %)
Cefoperazon	173 (100 %)	164 (94,7 %)	6 (3,4 %)	3 (1,7 %)

Tablica 7. Osjetljivost bakterije *Klebsiella* spp. na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksicilin + klavulanska kiselina	66 (100 %)	22 (33,3 %)	12 (18,1 %)	32 (48,4 %)
Ampicilin	66 (100 %)	9 (13,6 %)	4 (21,2 %)	43 (65,1 %)
Kanamycin	66 (100 %)	20 (30,3 %)	26 (39,3 %)	20 (30,3 %)
Neomicin	66 (100 %)	37 (56 %)	25 (37,8 %)	4 (6 %)
Penicilin	66 (100 %)	-	-	66 (100 %)
Streptomycin	66 (100 %)	28 (42,4 %)	16 (24,2 %)	22 (33,3 %)
Tetraciklin	66 (100 %)	20 (30,3 %)	14 (21,2 %)	32 (48,4 %)
Cefoperazon	66 (100 %)	61 (92,4 %)	4 (6 %)	1 (1,5 %)



Tablica 8. Osjetljivost bakterija roda *Enterobacter* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksisilin + klavulanska kiselina	30 (100 %)	8 (26,6 %)	5 (16,6 %)	17 (56,6 %)
Ampicilin	30 (100 %)	9 (30 %)	5 (16,6 %)	16 (53,3 %)
Kanamycin	30 (100 %)	8 (26,6 %)	16 (55,1 %)	6 (20 %)
Neomicin	30 (100 %)	16 (53,5 %)	12 (40 %)	2 (6,6 %)
Penicilin	30 (100 %)	-	-	30 (100 %)
Streptomycin	30 (100 %)	11 (36,6 %)	10 (33,3 %)	9 (30 %)
Tetraciklin	30 (100 %)	8 (26,6 %)	4 (13,3 %)	18 (60 %)
Cefoperazon	30 (100 %)	28 (93,3 %)	2 (6,6 %)	-

Tablica 9. Osjetljivost bakterija roda *Pseudomonas* na antimikrobne tvari

Antimikrobna tvar	n	Osjetljiv	Srednje osjetljiv	Neosjetljiv
Amoksisilin + klavulanska kiselina	113 (100 %)	15 (13,2 %)	1 (0,8 %)	97 (85,8 %)
Ampicilin	113 (100 %)	-	1 (0,8 %)	112 (99,1 %)
Kanamycin	113 (100 %)	1 (0,8 %)	2 (1,7 %)	110 (97,3 %)
Neomicin	113 (100 %)	51 (45,1 %)	35 (30,9 %)	27 (23,8 %)
Penicilin	113 (100 %)	-	-	113 (100 %)
Streptomycin	113 (100 %)	18 (15,9 %)	31 (27,4 %)	64 (56,6 %)
Tetraciklin	113 (100 %)	-	2 (1,7 %)	111 (98,2 %)
Cefoperazon	113 (100 %)	109 (96,4 %)	4 (3,5 %)	-



Bakterije *Enterococcus* spp. su u najvećem broju uzoraka bile osjetljive prema ampicilinu (92,9 %), dok su neosjetljive bile prema tetraciklinu (88,2 %). Pitkälä i sur., (2004) ističu da su enterokoki osjetljivi na penicilin i ampicilin dok su Tenhagen i sur., (2006) utvrdili da enterokoki nisu otporni na ampicilin kada je prisutan u koncentraciji do 8 mg/L. Osjetljivost bakterije *E. coli* na djelovanje pojedinih antimikrobnih tvari prikazana je u tablici 6.

Među izdvojenim sojevima bakterije *E. coli*, 94,7 % bilo je osjetljivo na cefoperazon. Slične podatke o osjetljivosti bakterije *E. coli* navode Kalmus i sur., (2011) ali uz nešto izraženiju osjetljivost na ampicilin (68 %). U tablici 7 prikazana je osjetljivost bakterije *Klebsiella* spp. prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari.

Bakterija *Klebsiella* spp. u najvećem je broju slučajeva bila osjetljiva na cefoperazon (92,4 %), dok na penicilin nije bila osjetljiva. Bengtsson i sur., (2009) navode da je većina izolata bakterije *Klebsiella* spp. otporna na ampicilin dok je svega 7,1 % otporno na tetraciklin. U tablici 8 prikazana je osjetljivost bakterije *Enterobacter* spp. prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari.

Bakterije *Enterobacter* spp. su u najvećem broju uzoraka bile osjetljive prema cefoperazonu (93,3 %), dok su neosjetljive bile prema penicilinu. U tablici 9 prikazana je osjetljivost bakterije *Pseudomonas* spp. prema pojedinim vrstama antimikrobnih tvari.

Bakterije roda *Pseudomonas* najveću su osjetljivost imale prema cefoperazonu (96,4 %) i neomicinu (45,1 %). Gram-negativni uzročnici iz skupine enterobakterija (*Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) najosjetljiviji su prema cefoperazonu. Udio osjetljivih sojeva, uključujući i pripadnike roda *Pseudomonas*, prema cefoperazonu premašuje 90 %, izuzev pripadnika roda *Proteus* koji su nešto manje osjetljivi (80 %). Spomenuta skupina bakterija u većini slučajeva uzrokuje kliničke oblike mastitisa. Stoga se nameće zaključak da lijekove koji sadrže cefoperazon ili srodne aktivne tvari treba upotrebljavati isključivo za liječenje kliničkih mastitisa kada zbog nagle pojave znakova bolesti treba brzo reagirati. I u takvim slučajevima preporuča se uzeti uzorak za mikrobiološku pretragu, ali prije aplikacije samog lijeka. Na taj način veterinar je u stanju brže reagirati i pravilno propisati terapiju ukoliko se u istom uzgoju pojave slični slučajevi.

## Zaključak

Najveća osjetljivost sojeva bakterije *S. aureus* utvrđena je prema amoksicilinu s klavulanskom kiselinom i cefoperazonu, dok je izrazita rezistencija bila prema penicilinu i ampicilinu (gotovo 100 %). Također, utvrđena je i relativno visoka učinkovitost (preko 90 %) ampicilina, amoksicilina s klavulanskom kiselinom i penicilina na sojeve bakterije *S. uberis*, dok su sojevi iste bakterije bili najmanje osjetljivi prema streptomycinu. Sojevi bakterije *E. coli*, *Klebsiella* spp. i roda *Pseudomonas*, 100 % su rezistentni na penicilin a najosjetljiviji na cefoperazon. Izolati bakterija *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae* u najvećem broju uzoraka bili su osjetljivi na amoksicilin s klavulanskom kiselinom i cefoperazon dok je preko 90 % izdvojenih bilo osjetljivo prema kanamicinu, neomicinu, penicilinu i streptomycinu. Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti da za liječenje stafilokoknih i streptokoknih infekcija vimena postoji širok izbor lijekova s aktivnim tvarima na koje su bakterije osjetljive. U budućnosti, liječenje mastitisa polučiti će pozitivne rezultate pravilnom dijagnozom te odabirom ciljane terapije temeljene na izdavanju uzročnika i antibiogramu.

## *Sensitivity of selected mastitis pathogens to antimicrobial agents*

### Abstract

Mastitis represents a big problem in modern cattle production, both in economic terms and in terms of diagnostic. Direct economic losses for the manufacturers occur due to reduction of milk production, changed composition of the milk, medical expenses, loss of one or more quarters of the udder, the withdrawal period and higher expenditure of labor. The greatest damages in dairy production are caused by subclinical (invisible) inflammation. The aim of this study was to determine the sensitivity of some bacterial mastitis pathogens to antimicrobial agents in the compositions for the treatment of mastitis that are used in the Republic of Croatia. Pathogens which causes mastitis were isolated on esculin blood agar culture medium and subjected to a sensitivity analysis on eight antimicrobials. Highest sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains was determined to amoxicillin with clavulanic acid and cefoperazone, while the distinct resistance

was observed to penicillin and ampicillin (almost 100 %). Also it has been determined a relatively high efficiency of ampicillin (96.1 %), amoxicillin with clavulanic acid (94.1 %) and penicillin (92.8 %) on the strains of *Streptococcus uberis*, while the lowest sensitivity, bacteria have had on streptomycin. According to results of the analysis, it is evident that a growing number of bacteria developed resistance to certain antimicrobial agents.

**Key words:** mastitis, milk, bacteria, antibiogram, antibiotics

## Literatura

- Bengtsson, B., Unnerstad, H.E., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., Persson Waller, K. (2009): Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows, *Veterinary Microbiology* 136, 142-149. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.024
- Benić, M., Lojkić, M., Majnarić, D., Mihaljević, Ž. (2003): *In vitro* osjetljivost uzročnika mastitisa na antimikrobne tvari. *Zbornik radova*. IV srednjoeuropski bujatrički kongres, Lovran, 23.-27.04., 125-130.
- Bradley A.J., Leach, K.A., Green, L.E., Green, M.J. (2007): Survey of the incidence and aetiology on dairy farms in England and Wales, *Veterinary Research* 160, 253-257.
- Erskine, R.J., Walker, R.D., Bolin, C.A., Bartlett, P.C., White, D.G. (2002): Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period, *Journal of Dairy Science* 85, 1111-1118. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74172-6
- Güller, L., Ok, Ü., Gündüz, K., Gülcü, Y., Hadimli, H.H. (2005): Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Turkey, *Journal of Dairy Science* 88, 3149-3154. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72998-2
- Hadžiosmanović, M. (2001): Ocjena higijenske kakvoće mlijeka. U: *Mastitisi*. Garmond, 1-90. Zagreb.
- Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schoeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K., Berghold, C., Myllyniemi, A.L., Wasyl, D., Sunde, M., Aarestrup, F.M. (2008): Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004, *Acta Veterinaria Scandinavica* 50, 28. doi: 10.1186/1751-0147-50-28
- Jurmanović, J., Bačaneč, B., Pavljak, I., Sukalić, T., Jaki, V., Majnarić, D., Končurat, A., Sokolović, J. (2012): Susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections to different antimicrobial agents, *Medical Sciences* 37, 105-111.
- Kalmus, P., Aasmäe, B., Kärssin, A., Orro, T., Kask, K. (2011): Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia, *Acta Veterinaria Scandinavica* 53 (4), 1-7. doi: 10.1186/1751-0147-53-4
- Klimienė, I., Ružauskas, M., Špakauskas, V., Mockeliūnas, R., Pereckienė, A., Butrimaitė-Ambrozevičienė, Č. (2011): Prevalence of gram positive bacteria in cow mastitis and their susceptibility to beta-lactam antibiotics, *Veterinary Medicine and Zootechnics* 56 (78), 65-72.
- Malinowski, E., Kłossowska, A., Kaczmarski, M., Lassa, H., Kuźma, K. (2002): Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 46, 289-294.
- Reksen, O., Sølvørød, L., Branscum, A.J., Østeras, O. (2006): Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle, *Journal of Dairy Science* 89, 2928-2937. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72565-6
- Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F., Scholl, D.T. (2008): Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms, *Journal of Dairy Science* 91, 1366-1377. doi: 10.3168/jds.2007-0757
- Østeras, O., Sølvørød, L., Reksent, O. (2006): Milk culture results in large Norwegian survey - effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering, *Journal of Dairy Science* 89, 1010-1023. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1
- Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - third edition M31-A2. (2008): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Mylly, V., Honkanen-Buzalski, T. (2004): Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance, *Journal of Dairy Science* 87, 2433-2441. doi: dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73366-4
- Samaržija, D., Antunac, N. (2002): Važnost dokazivanja prisutnosti antibiotičkih ostataka u mlijeku, *Mljekarstvo* 52 (1), 61-70.
- Šeol, B., Matanović, K., Terzić, S. (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Medicinska naklada, 45-49. Zagreb.
- Teale, C.J., David, G.P. (1999): Antibiotic resistance in mastitis bacteria. Proceedings of the British Mastitis Conference, 24-29.
- Tenhagen, B.A., Köster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W. (2006): Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany, *Journal of Dairy Science* 89 (7), 2542-2551. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X
- Wilson, D.J., Gonzales, R.N., Das, H.H. (1997): Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production, *Journal of Dairy Science* 80, 2592-2598. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76215-5