

Antimikrobna osjetljivost uzročnika mastitisa krava s područja sjeverozapadne Hrvatske u razdoblju od 2014. do 2018. godine



T. Sukalić*, D. Đuričić, I. Pavljak, A. Končurat, Ž. Cvetnić, J. Grbavac,
B. Bačaneč, J. Jurmanović i M. Samardžija

Sažetak

U ovom su radu prikazani rezultati mikrobioloških pretraga sekreta vimena krava s različitim oblicima upala mliječnih žlijezda. Pretraženi su uzorci tijekom pet godina dostavljani u Laboratorij za dijagnostiku Veterinarskog zavoda Križevci, podrijetlom iz 7 županija sjeverozapadne Hrvatske. Uzorci su pretraženi konvencionalnim mikrobiološkim metodama u aerobnim uvjetima. Ukupno je obrađeno 1264 uzorka, a pozitivan rezultat ustrvđen je u 983 slučaja ili 77,76 % uzoraka. Pri tome je izdvojeno 967 sojeva bakterija; u 9 slučajeva izdvojene su kvasnice, a u 7 slučajeva alge. Osjetljivost prema antimikrobnim lijekovima određivana je disk-difuzijskom metodom. Od pozitivnih mikrobioloških nalaza 14,24 % izolata pripada vrsti *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a između njih je 60 % rezistentno na OX. Sojevi

S. aureus pokazali su najvišu osjetljivost prema AMC (91,4 %) te prema CEQ (90,7 %). Koagulaza–negativni stafilokoki (CNS) čine 19,23 % pozitivnih slučajeva, s najboljom osjetljivošću prema CEQ (84,6 %). *Streptococcus agalactiae* ustanovljen je u 3,36 % pozitivnih uzoraka, a pokazao je dobru osjetljivost prema CPZ i CEQ (87,9 %). Ostali streptokoki (po Lancefieldovoj grupe C, D i ostale) čine 39,47 % pozitivnih nalaza i pokazali su najbolju osjetljivost prema AMC (95,4 %) i CEQ (92,8 %). Od Gram-negativnih bakterija među pozitivnim uzorcima najčešće je zastupljena: *Escherichia coli* (9,46 %), a zatim rodovi *Pseudomonas*, *Enterobacter* i *Klebsiella* (3,46 %, 2,64 % i 0,1 % kako slijedi). Kvasnice (*Candida* spp.) i alge (*Prototheca* spp.) su izdvojene u manje od 1 % slučajeva. Rezultati pokazuju da je postotak stafilokoknih i

Dr. sc. Tomislav SUKALIĆ*, dr. med. vet., poslijedoktorand, (dopisni autor, e-mail: sukalic.vzk@veinst.hr), mr. sc. Ivica PAVLJAK, dr. med. vet., asistent, dr. sc. Ana KONČURAT, dr. med. vet., znanstvena suradnica, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., akademik, mr. sc. Branko BAČANEK, dr. med. vet., u mirovini, mr. sc. Jadranka JURMANOVIĆ, dr. med. vet., u mirovini, Hrvatski veterinarski institut – Veterinarski zavod Križevci, Hrvatska; dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., docent, Mount-trade, Garešnica, Hrvatska; dr. sc. Jozo GRBAVAC, dr. med. vet., izvanredni profesor, Agronomski i Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru, Bosna i Hercegovina; dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

streptokoknih mastitisa podjednak onima u dosadašnjim istraživanjima, no uočen je trend povećanja broja rezistentnih sojeva vrste *S. aureus*. Pouzdan mikrobiološki nalaz s antibiogramom je uz kliničku pretragu temelj kontrole mastitisa u našim uvjetima,

jer različite vrste mikroorganizma zahtijevaju različite pristupe u liječenju, kao što su izbor antibiotika, cijepjenje, zasušivanje četvrti ili kao zadnji izbor izlučenje životinje.

Ključne riječi: mastitis krava, uzročnici mastitisa, antimikrobna osjetljivost, mlijeko

Uvod

Upala mliječne žlijezde (mastitis) je najčešća bolest mliječnih krava koja ima štetne učinke na dobrobit oboljelih životinja te prouzroči znatne gospodarske gubitke. Veterinari i stočari desetljećima su istraživali učinkovite metode kojima bi se spriječila pojava bolesti, a liječenje je postajalo uspješnije otkrićem penicilina i sulfonamida. Prvi pokusi s intramamarnom aplikacijom penicilina započeli su još 1940. godine i već tada se pokazala bolja osjetljivost streptokoka prema antimikrobnim pripravcima, nego stafilokoka (Ruegg, 2017.). Mastitis se očituje fizikalnim i kemijskim promjenama sekreta i patološkim procesima u parenhimu, čime mlijeko postaje štetno po zdravlje i teladi i ljudi. Uzročnici su najčešće mikroorganizmi, u 95 % slučajeva bakterije (Makek, 1995.) kojih je do danas opisano više od 150 vrsta, a mnoge imaju i zoonotsko značenje. Pogodovni čimbenici za nastanak bolesti su higijena mužnje i higijenske prilike u staji, hranidba te opće zdravstveno stanje životinje. Mastitisi se dijele na kliničke i supkliničke. Dijagnoza kliničkih mastitisa postavlja se temeljem kliničke i mikrobiološke pretrage, dok je kod supkliničkih mastitisa dijagnoza moguća isključivo laboratorijskim pretragama (Radostits i sur., 2000., Quinn i sur., 2003., Benić i sur., 2018.). Infekcija je najčešće galaktogena, vrlo rijetko limfogena ili hematogena, a sluznica cisterne i mliječnih kanala može se u određenoj mjeri suprotstaviti mikroorganizmima. Obrana je celularna, uz imunološke procese fagocitoze leukocitima koji u fazi

upale čine 90 % svih somatskih stanica. Mlijeko zdravih krava sadrži 50000 do 100000 somatskih stanica u 1 mL i ne sadrži mikroorganizme, a testiranje mastitis reagensom pouzdana je metoda za otkrivanje supkliničkih mastitisa (Radostits i sur., 2000., Tomše-Đuranec i sur., 2008., Mačević i sur., 2016.).

U dijagnostici mastitisa, PCR tehnika identifikacije mikroorganizama ima široku primjenu, a uvode se i druge metode poput MALDI-TOF MS (Pieper i sur., 2012., El-Jakee i sur., 2013., Hiitiö i sur., 2015.). RT-PCR rutinski identificira 12 ili više najučestalijih bakterijskih vrsta i istovremeno identificira uzročnike koji imaju gen odgovoran za produkciju enzima β -laktamaze. Istraživanjima dinamike intramamarnih infekcija u laktaciji pokazalo se da glavnu ulogu imaju bakterije iz okoliša, ali je još uvijek manje poznato značenje i patogeneza algi, kvasaca i plijesni, koji se mogu naći u upalno promijenjenom vimenu, kao i mogućnosti njihovog liječenja (Quinn i sur., 1999., Malinovski i sur., 2002., Štepanić i sur., 2014., Ruegg, 2017., Cobo-Angel i sur., 2018.). Cvetnić i sur. (2016.a) kao najčešće izdvojene patogene bakterije navode *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Trueperella pyogenes* i *Corynebacterium bovis*. Uspjeh terapije mastitisa, osim o vrsti uzročnika ovisi o više čimbenika a to mogu biti: dužina trajanja infekcije, stupanj oštećenja tkiva i općenito kondicija životinje. Blaga i umjerena upala mliječne žlijezde liječe se lokalno, dok je kod težih upala potrebno primijeniti i parenteralnu terapiju uz analgetike, imunostimulatore, vitamine i

infuziju. Suhostajna terapija se provodi na temelju mikrobiološkog nalaza, intramamarnom primjenom antimikrobnih pripravaka, a za neke uzročnike i pred-suhostajnom petodnevnom parenteralnom aplikacijom prokain-penicilina, gentamicina, enrofloksacina ili florfenicola. Istraživanja provedena na *Prototheca* sp. upućuju na osjetljivost prema nistatinu i gentamicinu „*in vitro*“ (Malinovski i sur., 2002., Taponen i sur., 2003., Saini i sur., 2012., Wawron i sur., 2013., Stepanić i sur., 2014., Krömker i Leimbach, 2017.). Krave s atrofičnim četvrtima treba izlučiti iz stada, ali moguće ih je i ciljano trajno zasušiti na način da se primjenom 60 mL 2 % klorheksidina, 60 mL 3 % srebrnog nitrata ili 20 mL 5 % bakrenog sulfata izazove tzv. kemijski mastitis ili „slijepa četvrt“. Tim postupkom životinja ostaje u proizvodnji, a izvor infekcije se ukloni (Radostits i sur., 2000., Stepanić i sur., 2014.). U brojnim istraživanjima razvijane su antimastitis strategije, uvođenjem alternativnih lijekova poput zeolita klinoptilolita, ozona, propolisa, biljnih derivata, bakteriofaga, proteina karakterističnih za upale, laktoferina i srebrnih nanočestica (Gomes i Henriques, 2015., Bačić i sur., 2016., Jamaran i Zarif, 2016., Benić i sur., 2018., Đuričić i sur., 2020.). Unatoč svemu, pojava rezistentnih sojeva postala je globalni zdravstveni problem, a uporaba antibiotika pri liječe-

nju mastitisa još uvijek je neophodna. Naputcima OIE (2019.) i Smjernicama EU (2015.) traži se uspostavljanje Nacionalne strategije rješavanja antimikrobne rezistencije (Gomes i Henriques, 2016., Lömker i Leimbach, 2017.).

Svrha je ovog istraživanja bila prikazati rezultate mikrobioloških pretraga sekreta vimena krava prikupljenih tijekom 5 godina s područja sjeverozapadne Hrvatske, usporediti rezultate antimikrobne osjetljivosti s dosadašnjim istraživanjima te procijeniti pojavnost rezistentnih bakterijskih sojeva. Rezultati će se moći iskoristiti pri liječenju perakutnih i akutnih mastitisa te smatramo da će ovo istraživanje doprinijeti upoznavanju etiologije mastitisa i još jednom istaknuti važnost mastitisa i primjene ciljane antimikrobne terapije.

Materijali i metode

Uzorci sekreta vimena pretraženi u ovom istraživanju dostavljeni su u Laboratorij za dijagnostiku Veterinarskog zavoda Križevci, u razdoblju od 2014. do 2018. godine od strane terenskih veterinaru ili vlasnika životinja, u sterilnim epruvetama. Ukupno je pretraženo 1264 uzorka s područja šest županija i grada Zagreba. Broj i teritorijalni raspored obrađenih uzoraka prikazan je u tabeli 1.

Tabela 1. Uzorci sekreta vimena obrađeni u istraživanju

Županija	2014.	2015.	2016.	2017.	2018.	Ukupno
Bjelovarsko-bilogorska	56	57	192	86	70	461
Koprivničko-križevačka	199	172	137	145	95	748
Međimurska	9					9
Varaždinska	3	2		1		6
Virovitičko-podravska	4			3		7
Zagrebačka	5	6	7	3	4	25
Grad Zagreb	3	5				8
Ukupno	279	242	336	238	169	1264

Uzorcima su po zaprimanju pretraženi Zagrebačkim mastitis reagensom (Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska) te su po procjeni reakcije nacijepljeni na prikladne hranjive

podloge. U svrhu izdvajanja patogenih bakterija korištene su konvencionalne bakteriološke metode (Quinn i sur., 2003.). Kao osnovna podloga korišteni su krvni agar ili Columbia agar („Merck“)

Tabela 2. Antimikrobni pripravci korišteni u istraživanju

ANTIMIKROBNI LIJEK	OZNAKA	SADRŽAJ DISKA (KONCENTRACIJA)	PROIZVOĐAČ
Penicilin	P	6 µg/10IJ	OXOID
Oksacilin	OX	1 µg	OXOID
Amoksisilin/Klavulanska kiselina	AMC	20/10 µg	BIO-RAD
Cefaleksin	CFX	30 µg	BIO-RAD
Cefoperazon	CPZ	30 µg	OXOID
Cefquinom	CEQ	30 µg	OXOID
Enrofloksacin	ENF	5 µg	OXOID
Sulfametoksazol/Trimetoprim	SXT	25/75 µg	MAST DIAGNOSTICS
Oksitetraciklin	OT	30 µg	MAST DIAGNOSTICS
Gentamicin	GM	15 µg	OXOID
linkomicin/neomicin	LN	30 µg	OXOID

Tabela 3. Mikroorganizmi izdvojeni iz uzoraka u istraživanju

Vrsta uzročnika	Oznaka/kratice	Broj izdvojenih	% izdvojenih
<i>Streptococcus</i> spp.	SCS	388	30,69
<i>Staphylococcus</i> spp. (CNS)	CNS	189	14,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	SAU	140	11,07
<i>Escherichia coli</i>	ESC	93	7,35
<i>Bacillus</i> spp.	BAC	35	2,76
<i>Pseudomonas</i> spp.	PSE	34	2,69
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SCA	33	2,61
<i>Enterobacter</i> spp.	ENB	26	2,05
<i>Micrococcus</i> spp.	MCC	15	1,18
<i>Corynebacterium</i> spp.	COR	13	1,02
<i>Candida</i> spp.	CAN	9	0,71
<i>Prototheca</i> spp.	PRT	7	0,55
<i>Klebsiella</i> spp.	KLE	1	0,08
Ukupno pozitivno		983	77,76
Negativno / mješovita mikroflora		281	22,24
Ukupno pretraženo		1264	

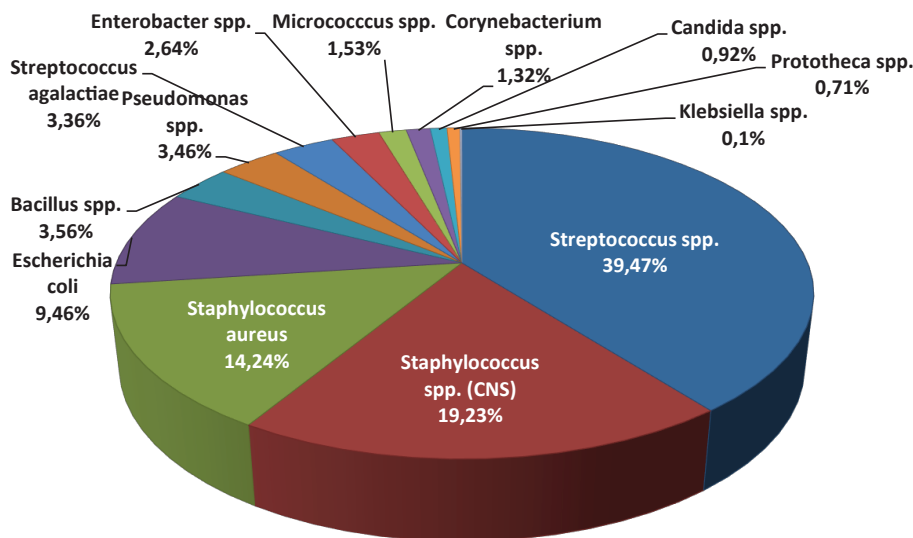
s 5 % defibrinirane ovčje krvi, kako bi se ustanovile morfološke karakteristike i hemolitičke osobine pojedinih izolata. Kulture su inkubirane aerobno na 37 °C/24-48 sati. U svrhu izdvajanja kvasnica korišten je Sabouraud maltoza agar („Merck“; suplement kloramfenikol 50 mg/L) uz aerobnu kultivaciju na 30 °C/2-7 dana. Porasle kolonije mikroorganizama identificirane su u skladu sa standardnim preporukama opisanim u Laboratory handbook on bovine mastitis (NMC, 1999.), a po potrebi je korišten i „Vitek-2“ ID sustav („BioMerieux“). Osjetljivost izdvojenih sojeva prema antimikrobnim lijekovima provedena je disk-difuzijskom metodom na Mueller-Hinton agaru, direktnom suspenzijom kolonija uz 0,5 McFarland, prema standardu *Clinical and Laboratory Standards Institute M02-A12* (CLSI, 2015.), a testirani diskovi prikazani su u tabeli 2. Zone inhibicije za antimikrobne pripravke procijenjene su sukladno dodatku za antimikrobno testiranje M100-S25 (CLSI, 2015.).

Rezultati i rasprava

Mikrobiološkim pretragama iz dostavljenih 1264 uzoraka sekreta vimena izdvojeno je 13 različitih vrsta mikroorganizama, a pozitivan rezultat pretrage dobiven je u 983 ili 77,76 % slučajeva. U 22,24 % slučajeva rezultat pretrage bio je negativan ili je izdvojena mješovita mikroflora (Tabela 3).

Između pozitivnih uzoraka (Grafikon 1) najčešće su zastupljeni streptokoki, u ukupno 42,83 % uzoraka, od čega *Streptococcus* spp. (grupa C, D i ostali) čini 39,47 %, a *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) 3,36 % pozitivnih. Slijede stafilokoki koji su izdvojeni u 33,47 % slučajeva; koagulaza-negativni *Staphylococcus* spp. u 19,23 % i *S. aureus* u 14,24 %. Od ostalih uzročnika mastitisa, značajnije je zastupljena *Escherichia coli* (*E. coli*) koja čini 9,46 % pozitivnih uzoraka, dok su ostali ustanovljeni u nižim postotcima.

Izdvojene bakterijske kulture testirane su na antimikrobnu osjetljivost, a rezultati su prikazani u tabeli 4.



Pozitivni uzorci: n=983

Grafikon 1. Odnos izdvojenih mikroorganizama među pozitivnim uzorcima

Tabela 4. Prikaz antimikrobne osjetljivosti izdvojenih bakterijskih sojeva, prema vrstama

Uzročnik	Antimikrobni pripravak										
	P	OX	AMC	CXN	CPZ	CEQ	ENR	SXT	OT	GM	LN
	Osjetljivost u %										
SAU	48,6	40	91,4	71,4	84,3	90,7	88,6	54,3	37,8	NT	68,6
CNS	49,7	35,9	83,1	58,7	79,9	84,6	82	46,6	20,1	NT	49,2
MCC	40	46,7	93,3	80,0	86,7	100	53,3	33,3	33,3	NT	73,3
SCA	63,6	42,4	84,8	60,6	87,9	87,9	63,6	36,4	21,2	NT	66,7
SCS	59,8	43,3	95,4	72,7	87,4	92,8	64,4	48,5	33,7	NT	51,8
BAC	22,9	5,7	25,7	17,1	31,4	14,3	94,3	42,9	22,9	NT	57,1
ESC	NT	NT	50,5	22,6	72	75,3	80,6	30,1	21,5	17,2	29
ENB	NT	NT	61,5	15,4	84,6	84,6	92,3	19,2	NT	30,8	38,5
PSE	NT	NT	NT	NT	88,2	85,3	79,4	5,9	NT	44,1	26,5
KLE	NT	NT	100	100	100	100	100	NT	NT	100	100
COR	92,3	76,9	100	100	100	84,6	69,2	23,1	30,8	NT	30,8
PRT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	42,8	NT

Kratice antimikrobnih pripravaka navedene u tabela 2. Kratice uzročnika mastitisa navedene u tabeli 3. NT – nije testirano

Iz tabele 4 vidljivo je da su rezistentni sojevi ustvrđeni kod većine izdvojenih bakterijskih vrsta, a Gram-negativne bakterije (uz izuzetak *Klebsiella* spp.) u pravilu pokazuju veću rezistenciju od Gram-pozitivnih bakterija.

Udio pozitivnih nalaza ustvrđenih u našem istraživanju (77,76 %) odgovara istraživanjima provedenim u Kanadi i skandinavskim zemljama (Makovec i Ruegg, 2003., Pitkälä i sur., 2004.), dok su više pozitivnih uzoraka (85,7 %) ustvrđili u Finskoj Hiitiö i sur. (2015.), a manje u Njemačkoj Tenhagen i sur. (2006.). Najčešće izdvajani uzročnici u ovom istraživanju bili su streptokoki grupe C, D i ostali (388 sojeva ili 39,47 %), što je približno rezultatu od 44,7 % koji objavljuju Cvetnić i sur. (2016.b). Makovec i Ruegg (2003.) okolišne streptokoke izdvojili su iz 20,1 % uzoraka. Rezultat od 3,36 % pozitivnih na *S. agalactiae*, gotovo je identičan rezultatu od 3,0 % kojeg su objavili Makovec i

Ruegg (2003.). Svennesen i sur. (2018.) ustvrđili su *S. agalactiae* u 7,4 % pozitivnih uzoraka, što je više nego dvostruko od našeg istraživanja, a višestruko manje (0,4%) ustvrđili su Cvetnić i sur. (2016.b) te Hiitiö i sur., (2015.) (0,34 %). Najviši postotak uzoraka pozitivnih pozitivnih nalaza na *S. agalactiae* (17,39 %) ustvrđio je Burović (2020.). *S. aureus* izdvojen je iz 140 uzoraka (14,24 %), što je slično izvješćima drugih autora. Tako su 15,5 % pozitivnih na *S. aureus* ustanovili Cvetnić i sur. (2016.b), 17,7% Mekovec i Ruegg (2003.), 10,2 % Pitkälä i sur. (2004.) te 8,1 % Svennesen i sur. (2018.) u Danskoj. Najveći postotak pozitivnih na *S. aureus* ustvrđili su Burović (2020.) i Hiitiö i sur. (2015.), kako slijedi 21,74% i 24,8%. Patogenost *S. aureus* i uloga u patogenezi mastitisa uvelike ovise o prisutnosti *icaA* i *icaD* gena koji kontroliraju produkciju sluzi i mogućnost stvaranja biofilma (Saidi i sur., 2021.). Koagulaza negativni stafilocoki (CNS) zastupljeni

su u našem istraživanju s 19,24 % među pozitivnim uzorcima, što je približno jednako rezultatu od 17,5 % kojeg su dobili Makovec i Ruegg (2003.). Višu zastupljenost CNS (21,7 %) prikazali su El-Jakee i sur. (2013.) u istraživanju provedenom u Egiptu, a manju (9,1 %) Tenhagen i sur. (2006.) u Njemačkoj te 5,3 % Cvetnić i sur. (2016.b) u Hrvatskoj.

Mastitisi niske pojavnosti s prevalencijom manjom od 10 % pojavljuju se u svim fazama laktacije i u suhostaju. *Klebsiella* spp. nađena je u 0,1 % naših uzoraka, a više izolata od nas (1,2%) imali su Makovec i Ruegg (2003.). Vrstu *Candida* spp. izdvojili smo iz 0,9 % uzoraka, dok su tu vrstu Cvetnić i sur. (2016.b) ustvrdili u 3,3 % uzoraka. U Kanadi je prevalencija za *Prototheca* spp. 5,1 % (Pieper i sur., 2012.), za razliku od naših nalaza, gdje je *Prototheca* spp. zastupljena sa svega 0,7 %. Prema navodima Stepanić i sur. (2014.), *Prototheca* spp. se u novije vrijeme sve češće izdvaja tijekom rutinskih pretraga. Đuričić i sur. (2020.) izdvojili su *Prototheca* spp. i kvasnice u istom postotku (1,16 %).

Promatrajući rezultate antibiograma za pojedine vrste mikroorganizama prikazane u tabeli 4, vidljivo je da je najviše sojeva vrste *S. aureus* osjetljivo prema AMC (91,4 %). Od cefalosporina osjetljiviji su prema CEQ (90,7 %) nego prema CPZ (84,3 %), a visoku osjetljivost pokazali su još prema ENR (88,6 %). Manje od 50 % sojeva *S. aureus* pokazalo je osjetljivost prema P (48,6 %) i OX (40,0 %), a najnižu osjetljivost pokazali su prema OTC (37,8 %). U našim ranijim radovima (Jurmanović i sur., 2012.) osjetljivost prema OX bila je od 66,7 % u 2007. do 88,6 % u 2010. godini, što ukazuje na trend povećanja OX-rezistentnih sojeva *S. aureus* u Hrvatskoj, između dva istraživanja u razdoblju od 10 godina. Rezistencija prema OX u svijetu je prosječno 50 %. U Kanadi se kreće od 7 % do 63 % (Saini i sur., 2012.), u Finskoj 52,1 % (Pitkälä i sur., 2004.) do 67 % (Taponen i sur., 2003.), a u Turskoj

55,9 % (Turutoglu i sur., 2006.), što je sukladno rezultatima ovog istraživanja. Jurmanović i sur. (2012.) nadalje navode osjetljivost *S. aureus* prema CPZ 100 % u 2007. godini, a prema AMC 95,7%, dok su Benić i sur. (2003.) ustvrdili za vrstu *S. aureus* 100 % osjetljivost prema AMC i 95 % prema CPZ.

Najveći broj sojeva CNS bio je osjetljiv prema CEQ (84,6 %), dok je prema P 46,6 % osjetljivih sojeva. Slične rezultate objavljuju i drugi autori (Erskine i sur., 2002., Pitkälä i sur., 2004., Turutoglu i sur., 2006.). Najslabiju osjetljivost, CNS su pokazali prema OT (20,1 %).

Streptococcus spp. pokazao je visoku osjetljivost prema AMC te CEQ i CPZ, kako slijedi 95,4 %, 92,8 % i 87,4 %, dok je za *S. agalactiae* ustvrđena istovjetna osjetljivost prema CEQ i CPZ (87,9 %) i tek nešto niža prema AMC (84,8 %).

Najviše osjetljivih sojeva *E. coli* (80,6 %) bilo je prema ENR; prema cefalosporinima su pokazali osjetljivost 72 %-75,3 %, a prema AMC 50,5 %. Drugi autori u Hrvatskoj i svijetu objavljuju slične rezultate (Erskine i sur., 2002., Makovec i Ruegg, 2003., Hiitiö i sur., 2015., Cvetnić i sur., 2016.b). Naše istraživanje potvrdilo je navode o osjetljivosti *Prothoteca* spp. prema GM, no ona je svega 42,8 %.

Zaključak

Pouzdana mikrobiološki nalaz s određivanjem antimikrobne osjetljivosti je uz kliničku pretragu temelj kontrole mastitisa, jer različite vrste izdvojenih mikroorganizma zahtijevaju i različitu strategiju terapije, od izbora antibiotika, načina liječenja i cijepljenja, do odluka o eventualnom zasušivanju četvrti ili izlučenju životinje.

Naši rezultati pokazuju da je broj stafilokoknih i streptokoknih mastitisa sličan rezultatima drugih autora, ali i da postoji trend povećanja broja rezistentnih sojeva vrste *S. aureus*. Rezistentni

sojevi ustvrđeni su i kod većine ostalih izdvojenih bakterijskih vrsta; od Gram-pozitivnih najviše kod *Bacillus* spp., a od Gram-negativnih bakterija kod vrste *E. coli*. Navedene činjenice ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja i povećanu pozornost, a ponajprije s javnozdravstvenog i ekonomskog gledišta.

Literatura

- BAČIĆ, I., N. MAČEŠIĆ, L. RADIN, J. ALADROVIĆ, K. MATANOVIĆ, T. MAŠEK, D. BROZIĆ, M. BENIĆ, B. RADIĆ, J. ŠURAN, M. EFENDIĆ, J. DAUD, A. KOSTELIĆ i G. BAČIĆ (2016): Preliminarni rezultati aplikacije intramamarnе otopine propolisa (3% i 5%) u svrhu liječenja mastitisa na farmi mliječnih krava Krndija. Zbornik 6. Hrvatski veterinarski kongres, Opatija 2016., str. 551-558.
- BENIĆ, M., M. LOJKIĆ, D. MAJNARIĆ i Ž. MIHALJEVIĆ (2003): In vitro osjetljivost uzročnika mastitisa na antimikrobne tvari. Zbornik radova IV srednjoeuropski bujatrički kongres, Lovran, pp. 125-130.
- BENIĆ, M., N. MAČEŠIĆ, L. CVETNIĆ, B. HABRUN, Ž. CVETNIĆ, R. TURK, D. ĐURIČIĆ, M. LOJKIĆ, V. DOBRANIĆ, H. VALPOTIĆ, J. GRIZELJ, D. GRAČNER, J. GRBAVAC and M. SAMARDŽIJA (2018): Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control – a review. *Vet. arhiv* 88, 535-557.
- BUROVIĆ, J. (2020): Isolation of bovine clinical mastitis bacterial pathogens and their antimicrobial susceptibility in the Zenica region in 2017. *Vet. stn.* 51, 47-52. (In Croatian).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015): M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Twelfth Edition.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015): M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement.
- COBO - ANGEL, C., A. S. JARAMILLO-JARAMILLO, L. M. LASSO-ROJAS, S. B. AGUILAR-MARIN, J. SANCHEZ, J. C. RODRIGUEZ-LECOMPTE, A. CEBALLOS-MARQUEZ and R. N. ZADOKS (2018): *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds. *Plos One* 13(12): e0208990. DOI: 10.1371/journal.pone.0208990.
- CVETNIĆ, L., M. SAMARDŽIJA, B. HABRUN, G. KOMPES and M. BENIĆ (2016a): Microbiological monitoring of mastitis pathogens in the control of udder health in dairy cows. *Slov. Vet. Res.* 53, 131-140.
- CVETNIĆ, L., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, M. STEPANIĆ i M. SAMARDŽIJA (2016b): Najčešći uzročnici mastitisa u krava i koza u Republici Hrvatskoj. *Vet. stn.* 47, 109-116.
- ĐURIČIĆ, D., T. SUKALIĆ, F. MARKOVIĆ, P. KOČILA, I. ŽURA ŽAJA, S. MENČIK, T. DOBRANIĆ, M. BENIĆ and M. SAMARDŽIJA (2020): Effects of Dietary Vibroactivated Clinoptilolite Supplementation on the Intramammary Microbiological Findings in Dairy Cows. *Animals* 10, 202; doi:10.3390/ani10020202
- EL-JAKEE, J. K., E. A. NOHA, A. GOMAA, M. D. EL-HARIRI, H. M. GALAL, S. A. OMAR and A. SAMIR (2013): Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 1, 74-78.
- ERSKINE, R. J., R. D. WALKER, C. A. BOLIN, P. C. BARTLETT and D. G. WHITE (2002): Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens during a Seven-Year Period. *J. Dairy Sci.* 85, 1111-1118.
- GOMES, F. and M. HENRIQUES (2016): Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Curr. Microbiol.* 72, 377-382.
- HIITIO, H., R. RIVA, T. AUTIO, T. POHJANVIRTA, J. HOLOPAINEN, S. PYÖRÄLÄ and S. PELKONEN (2015): Performance of a real-Time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *J. Dairy Res.* 82, 200-208.
- JAMARAN, S. and B. H. ZARIF (2016): Synergistic Effect of Silver Nanoparticles with Neomycin or Gentamicin Antibiotics on Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus*. *Open Journal of Ecology* 6, 452-459.
- JURMANOVIĆ, J., B. BAČANEK, I. PAVLJAK, T. SUKALIĆ, V. JAKI, D. MAJNARIĆ, A. KONČURAT i J. SOKOLOVIĆ (2012): Osjetljivost na antimikrobne tvari sojeva *Staphylococcus aureus* izdvojenih iz mlijeka krava s upalom mliječne žlijezde. *Rad HAZU* 37, 105-111.
- KRÖMKER, V. and S. LEIMBACH (2017): Mastitis treatment - Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 52 (suppl. 3): 21-29.
- MAČEŠIĆ, N., G. BAČIĆ, K. BOŽIČEVIĆ, M. BENIĆ, T. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. LOJKIĆ, M. EFENDIĆ, I. BAČAIĆ and M. PAVLAK (2016): Assessment of the Zagreb mastitis test in diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet. arhiv* 86, 475-485.
- MAKEK, Z. (1995): Osvrt na dijagnostiku, terapiju i preventivu upala mliječne žlijezde u krava. *Mljekarstvo* 45, 275-282.
- MAKOVEC, J. A. and P. L. RUEGG (2003): Results of Milk Samples Submitted for Microbiological Examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 86, 3466-3472.

21. MALINOVSKI, E., H. LASSA and A. KLOSSOWSKA (2002): Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. Bull. Vet. Inst. Pulawy 46, 295-299.
22. NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1999): Laboratory handbook on bovine mastitis, NMC Inc., Madison, WI 53704-6797, USA, Revised edition.
23. Official Journal of the European Union (2015): Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. Commission notice 2015/C 299/04. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/2015_prudent_use_guidelines_en.pdf
24. OIE (2019): Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. In: Terrestrial Animal Health Code. Chapter 6.10. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_antibio_use.pdf
25. PIEPER, L., A. GODKIN, U. ROESLER, A. POLLEICHTNER, D. SLAVIC, K. E. LESLIE and D. F. KELTON (2012): Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. J. Dairy Sci. 95, 5635-5644.
26. PITKÄLÄ, A., M. HAVERI, S. PYÖRÄLÄ, V. MYLLYS and T. HONAKANEN-BUZALSKI (2004): Bovine Mastitis in Finland 2001 - Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. J. Dairy Sci. 87, 2433-2441.
27. QUINN, P. J., B. K. MARKEY, M. E. CARTER, W. J. DONNELLY and F. C. LEONARD (2003): Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 4th ed., pp. 465-475.
28. QUINN, P. J., M. E. CARTER, B. MARKEY and G. R. CARTER (1999): Clinical Veterinary Microbiology. 3rd ed., pp. 95-103; pp. 327-344.
29. RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD and K. W. HINCHCLIFF (2000): A Textbook of Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses, 9th ed., pp. 603-700.
30. RUEGG, P. L. (2017): A 100-Year Review: Mastitis detection, management and prevention. J. Dairy Sci. 100, 10381-10397.
31. SAIDI, R., Z. CANTEKIN, N. MIMOUNE, Y. ERGUN, H. SOLMAZ, D. KHELEF and R. KAIDI (2021): Investigation of the presence slime production, *VanA* gene and antiseptic resistance genes in *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Algeria. Vet. stn. 52, 57-63.
32. SAINI, V., J. T. McCLURE, D. T. SCHOLL, T. J. DEVRIES and H. W. BARKEMA (2012): Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. J. Dairy Sci. 95, 1921-1929.
33. STEPANIĆ, M., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES i M. PERKOVIĆ (2014): Uzročnici mastitisa niske pojavnosti. Vet. stn. 45, 41-47.
34. SVENNESEN, L., S. S. NIELSEN, Y. S. MAHMMOD, V. KRÖMKER, K. PEDERSEN and I. C. KLAAS (2018): Association between teat skin colonization and intramammary infection with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in herds with automatic milking systems. J. Dairy Sci. 102, 629-639.
35. TAPONEN, S., A. JANTUNEN, E. PYÖRÄLÄ and S. PYÖRÄLÄ (2003): Efficacy of Targeted 5-day Combined Parenteral and Intramammary treatment of Clinical Mastitis Caused by Penicillin-Susceptible or Penicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Acta Vet. Scand. 44, 53-62.
36. TENHAGEN, B. A., G. KÖSER, J. WALLMANN and W. HEUWIESER (2006): Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89, 2542-2551.
37. TOMŠE-ĐURANEC V., N. KRNJAK, I. TUMPEJ, A. DAKIĆ, V. PINTIĆ, D. ČUKLIĆ, T. JELEN, N. PINTIĆ-PUKEC, M. BORČIĆ, D. STRUČIĆ, D. BLAŽEK, T. HORVAT, I. GRGIČIN i Z. ĐURIČIĆ (2008): Vodič dobre higijenske prakse u proizvodnji mlijeka. Nakladnik Koprivničko-križevačka županija, Projekt EU i Program Phare CBC/Interreg III A.
38. TURUTOGLU, H., S. ERCELIK and D. OZTURK (2006): Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. Bull. Vet. Inst. Pulawy 50, 41-45.
39. WAWRON, W., M. BOCHNIARZ, T. PIECH, J. WYSOCKI and M. KOCIK (2013): Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. Bull. Vet. Inst. Pulawy 57, 485-488.

Antimicrobial susceptibility of bovine mastitis pathogens from northwestern Croatia in the period 2014 to 2018

Tomislav SUKALIĆ, DVM, PhD, postdoctorand, Ivica PAVLJAK, DVM, MSc, Assistant, Ana KONČURAT, DVM, PhD, Scientific Associate, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Branko BAČANEK, DVM, MSc, retired, Jadranka JURMANOVIĆ, DVM, MSc, retired, Croatian Veterinary Institute - Regional Department Križevci, Croatia; Dražen ĐURIČIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Mount-trade, Garešnica, Croatia; Jozo GRBAVAC, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Agriculture and Food biotechnology University of Mostar, Bosnia and Herzegovina; Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

This paper summarises the results of microbiological testing of milk samples from cows suffering from mammary gland inflammation. The examined samples were delivered to the Diagnostic Laboratory of the Križevci Veterinary Institute over a 5-year period, originating from seven counties in northwestern Croatia. Samples were screened by conventional microbiological methods under aerobic conditions. A total of 1264 samples were processed, and a positive result was found in 983 cases (77.76%). In total, 967 strains of bacteria were isolated, while nine samples contained yeast and seven contained algae. Susceptibility to antimicrobial drugs was determined by the disk diffusion method. Among the positive microbiological findings, 14.24% of the isolates belonged to the species *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), and 60% of these were oxacillin-resistant. *S. aureus* strains showed the highest susceptibility to AMC (91.4%) and CEQ (90.7%). Coagulase-negative staphylococci (CNS) accounted for 19.23% of positive cases, with the highest sensitivity to CEQ (84.6%). *Streptococcus agalactiae* was found in 3.36% of positive samples and showed

good susceptibility to CPZ and CEQ (87.9%). Other streptococci (according to Lancefield group C, D and others) accounted for 39.47% of positive findings. They showed the highest sensitivity to AMC (95.4%), and CEQ (92.8%). Among the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* (9.46%) was the most common finding, followed by the genera *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Klebsiella* (3.46%, 2.64% and 0.1%, respectively). Yeasts (*Candida* spp.) and algae (*Prototheca* spp.) were isolated in less than 1% of cases. The results show that the percentage of staphylococcal and streptococcal mastitis is similar to previous reports, though an increasing trend in the number of resistant strains of *S. aureus* was noted. A reliable microbiological finding with an antimicrobial susceptibility test, accompanied with clinical examination is the foundation of mastitis control in our conditions, as different types of microorganisms require different treatment approaches, such as antibiotic selection, vaccination, various drying-off practices, or exclusion of the animal as a last choice.

Key words: bovine mastitis; pathogens; antimicrobial susceptibility; milk