



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
Департман за ветеринарску медицину**



**Александар Софренић**

**Антибиотска резистенција**

***Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.***

**код крава са дијагностикованим маститисом**

**Дипломски рад**

**Нови Сад, 2021.**



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**  
Департман за ветеринарску медицину



**Кандидат:**

**Александар Софренић**

**Ментор:**

**доц. др Зорана Ковачевић**

**Антибиотска резистенција**

***Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* код**

**крава са дијагностикованим маститисом**

**Дипломски рад**

**Нови Сад, 2021.**

**КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ  
ДИПЛОМСКОГ РАДА**

---

***Др Зорана Ковачевић, доцент - Ментор***

*за ужу научну област Фармакологија и токсикологија*

*Пољопривредни факултет, Нови Сад*

*Департман за ветеринарску медицину*

---

***Др Драгица Стојановић, редовни професор - Председник комисије***

*за ужу научну област Фармакологија и токсикологија*

*Пољопривредни факултет, Нови Сад*

*Департман за ветеринарску медицину*

---

***Др Миодраг Радиновић, вандредни професор - III члан***

*за ужу научну област Болести животиња и хигијена анималних производа*

*Пољопривредни факултет, Нови Сад*

*Департман за ветеринарску медицину*

**Антибиотска резистенција**  
***Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.***  
**код крава са дијагностикованим маститисом**

**САЖЕТАК**

Маститиси, у савременом говедарству представљају један од најважнијих здравствених проблема код музних крава. Поред здравственог аспекта и утицаја на добробит животиња, маститиси доводе до значајних финансијских губитака на фарми кроз директне и индиректне трошкове. Ту спада трошак терапије и одбаченог млека због каренце као и трајно смањење производње млека или потпуни прекид лактације код тешких форми маститиса. Терапија маститиса спроводи се применом антибиотика. Превелика употреба антибиотика у терапији, резултирала је појавом антибиотске резистенције. Стога је циљ овог дипломског рада био да се диск дифузионом методом испита осетљивост бактеријских изолата који су доминатни узрочници маститиса (*Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.*) на најчешће прописиване антибиотике у терапији овог обољења (пеницилин, тетрациклин, стрептомицин и амоксицилин/клавуланска киселина). Од укупно 77 узорка, на бактериолошког узрочника маститиса је био позитиван 49 узорак (63.63%). Од изолованих бактеријских изолата најчесталији је био *Streptococcus spp.* са 17 позитивних налаза (22.07%), док је *Staphylococcus aureus* био изолован у 6 узорка (7.79%). Највећа резистенција сојева бактерија *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* уочена је на пеницилин (100%). Одређивање антимицробне осетљивости узрочника је темељ контроле маститиса, јер различите врсте изолованих микроорганизама захтевају и различиту терапију.

**Кључне речи:** маститис, антибиотици, антибиотска резистенција.

## **Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. in cows with diagnosed mastitis**

### **SUMMARY**

Mastitis in modern dairy farming is one of the most important health issues in dairy cows. Beside health aspect and apparent influence on the well-being of the animals, mastitis is one of the biggest financial issues for the cow farms, because of the costs of the therapy and rejected milk as well as reduced production of the milk or complete stop of the lactation in heavy forms of mastitis. Mastitis therapy is through the use of the antibiotics. Too many of antibiotics in the therapy and the prevention of mastitis has resulted in the bigger resistance for the antibiotics. Therefore, the aim of this thesis was to test the susceptibility of bacterial isolates that are the dominant causes of mastitis (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp.) to the most commonly prescribed antibiotics in the treatment of this disease (penicillin, tetracycline, streptomycin/amoxicillin). Out of a total of 77 samples, 49 samples (63.63%) were positive for the bacteriological cause of mastitis. Of the isolated bacterial isolates, the most common was *Streptococcus* spp. with 17 positive findings (22.07%), while *Staphylococcus aureus* was isolated in 6 samples (7.79%). Highest resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. was observed on penicillin (100%). Determining the antimicrobial susceptibility of the causative agent is the basis of mastitis control, because different types of isolated microorganisms require different treatment.

**Key words:** mastitis, antimicrobials, antimicrobial resistance

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1. МАСТИТИС.....	3
2.1.1. Етиологија маститиса.....	3
2.1.2. Епидемиологија маститиса.....	10
2.1.3. Патогенеза маститиса.....	12
2.1.4. Подела и клиничка слика маститиса.....	14
2.1.5. Терапија маститиса.....	18
2.2. Антибиотска резистенција.....	23
2.2.1. Значај.....	23
2.2.2. Узроци.....	23
2.2.3. Последице.....	23
3. ЦИЉ И ЗАДАТАК ДИПЛОМСКОГ РАДА.....	25
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ДИПЛОМСКОГ РАДА.....	26
4.1. САКУПЉАЊЕ УЗОРАКА МЛЕКА И ИЗОЛАЦИЈА УЗРОЧНИКА МАСТИТИСА.....	26
4.2. ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ ОСЕТЉИВОСТИ ИЗОЛАТА <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Streptococcus spp.</i> .....	27
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ.....	28
5.1. ИЗОЛАЦИЈА УЗРОЧНИКА МАСТИТИСА.....	28
5.2. АНТИМИКРОБНА ОСЕТЉИВОСТ УЗРОЧНИКА МАСТИТИСА.....	29
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	32
8. ЛИТЕРАТУРА.....	33

## 1. УВОД

Маститис представља запаљење млечне жлезде и без обзира на узрок одликују га физичке, хемијске и бактериолошке промене у млеку, као и патолошке промене паренхима вимена код крава. Велики број микробиолошких, физичких и хемијских фактора доприноси појави, ширењу и трајању маститиса у запату, што ово обољење чини врло комплексним. У односу на клиничко испољавање, маститис може бити изражен у клинички видљивој и супклиничкој форми.

Узрочници маститиса могу да потичу из окружења или се класификују као контагиозни узрочници. Инфективним узрочницима се сматрају организми који су адаптирани да живе унутар домаћина, нарочито у млечној жлезди. Могу да изазову супклинички маститис који се манифестује повећањем броја соматских ћелија у млеку из инфициране четврти и преносе се са краве на краву најчешће током muže. Поред тога, узрочници маститиса из окружења се налазе у објекту, на опреми или у простирци. То су опортунистички „освајачи“ млечне жлезде, који се након продирања у исту умножавају и проузрокују имунски одговор домаћина и брзо се елиминишу. Главни инфективни узрочници маститиса су *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus agalactiae*, док су узрочници из окружења *Streptococcus uberis* и представници из фамилије Enterobacteriaceae (*E. coli*).

Програм контроле маститиса првенствено зависи од тога да ли је у питању клиничка или супклиничка форма маститиса. Уколико је потребно спровести лечење маститиса неопходно је донети одлуку о томе да ли ће лек бити апликован парентерално или интрамамарно. Поред тога, важно је пре лечења тачно идентификовати оболело грло, као и поставити правилну етиолошку дијагнозу, али и податке о мерама које се је неопходно спроводити у циљу превенције маститиса. На основу историје болести стада може се установити који су узрочници маститиса у питању. Код крава са блажим симптомима маститиса у стаду са ниском преваленцијом сумња се на инфекцију патогенима из околине и обично се нормална секреција враћа након три до шест мужа. Код свих грла код којих се уочи абнормална секреција или системски поремећаји услед маститиса,

одмах се примењује антибиотска терапија. Међутим, услед прекомерне употребе антибиотика може доћи до појаве и ширења антибиотске резистенције.

Антибиотска резистенција представља глобални здравствени проблем као једна од најважнијих претњи за јавно здравље и безбедност хране. Као алармантни проблем 21. века у хуманој и ветеринарској медицини, процењено је да је као озбиљан друштвени и економски проблем одговорна за 25.000 смртних случајева годишње само у Европској Унији. Међутим, утврђено је да неодговарајућа и нерационална употреба антибиотика ствара повољне услове за појаву и ширење резистентних микроорганизама и утиче на појаву антибиотске резистенције. Утврђено је да у већини делова света појава резистенције на антибиотике бактеријских патогена представља претњу за популације животиња и људи, са потенцијалним ризиком преноса резистентних сојева бактерија са стоке у животну средину и у ланац исхране.



## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. МАСТИТИС

#### 2.1.1. Етиологија маститиса

Досадашња испитивања показала су да бактерије имају водећу улогу у етиологији инфективних маститиса, мада су из млечне жлезде крава са маститисом изоловане и друге врсте микроорганизама. Наиме, до сада је изоловано преко 130 различитих врста микроорганизама (бактерије, микоплазме, гљивице, хламидије, алге и вируси), али је ограничен број њихових врста обухваћен стандардним лабораторијским анализама узорака млека, на основу доказа о њиховој улози у изазивању маститиса.

Микроорганизми могу изазвати патолошки процес у млечној жлезди самостално, а могу са другим факторима довести до компликација у њиховом току (Миланов и Стојановић, 2010). Низ спољашњих и унутрашњих фактора у организму, односно у вимену, смањује отпорност ткива и ствара услове да се развије упала млечне жлезде код крава. У ове факторе спадају: генетика (наследни фактор), исхрана, климатски фактори и годишње доба, прехладе, повреде, грешке у измузавању (недовољна припрема животиње, непотпуна мужа, мужа на слепо, нередовна мужа, неправилан рад пулзатора, промене притиска у систему, истрошени прибор и др.), облик вимена и сиса, стадијум лактације, опште болести (посебно пуерпералне), болести коже и висока млечност (Јаковац и Машек, 1971).

Значајне разлике које постоје међу микоорганизмима у погледу значаја у етиологији маститиса проистичу из њихове способности преживљавања у спољашњој средини, колонизације сисног канала, адхеренције на епителне ћелије млечне жлезде (посебно сисног канала и цистерне) тако да се не испирају током муже крава, степена инвазивности, тј. способности даљег продора у паренхим вимена (стрептококе су мање инвазивне од стафилокока), преживљавања у организму (одбрана од фагоцитозе, резистенција на антибиотике) и продукције токсина.

У највећем броју случајева, инфекције вимена настају галактогено (преко сисног канала), ређе хематогеном или лимфогеном дисеминацијом узрочника са других места примарне инфекције у организму (Бобош и Видић, 2005).

Узрочници маститиса могу да потичу из окружења или се класификују као контагиозни (заразни, инфективни) узрочници (Blowey и Edmondson, 1995). Инфективним узрочницима се сматрају организми који су адаптирани да живе унутар домаћина, нарочито у млечној жлезди. Могу да изазову супклиничку форму маститиса који се манифестује повећањем броја соматских ћелија у млеку из инфициране четврти. Преносе се са краве на краву најчешће током муже (Radostits и сар., 1994).

Узрочници маститиса из окружења најчешће немају способност да преживе у млечној жлезди. Такви узрочници називају се опортунистички патогени. Они се након продирања умножавају у млечној жлезди, проузрокују имунски одговор домаћина и убрзо се елиминишу.

Контагиозни маститис изазивају *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и *Mycoplasma* spp. Контагиозни карактер имају и инфекције изазване са *Truoperella pyogenes* и *Corynebacterium bovis*, али и инфекције коагулаза негативним врстама из рода *Staphylococcus*.

Узрочници пореклом из животног окружења су бројне друге врсте бактерија рода *Streptococcus*, затим *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Bacillus cereus* неке друге врсте микроорганизама као што су гљивице (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) и алге рода *Prototheca* (Миланов и Стојановић, 2010).

Као један од најзначајнијих узрочника маститиса издваја се *Staphylococcus* spp. Основна карактеристика ових узрочника јесте продукција каталазе, што их разликује од стрептокока. На основу овог ензима *Staphylococcus* spp. може се поделити на коагулаза позитивне и коагулаза негативне.

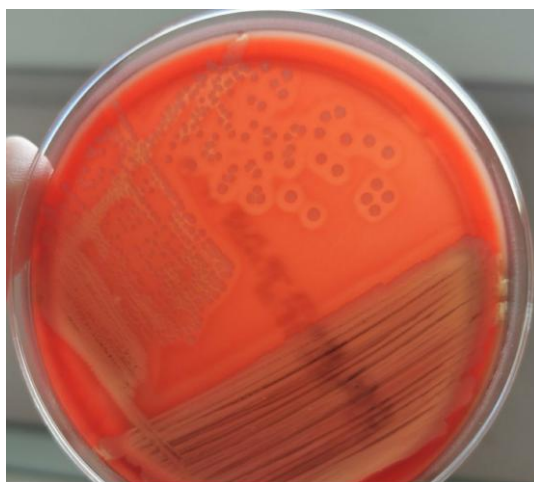
У Србији од коагулаза позитивних стафилокока *Staphylococcus aureus* представља најчешћу врсту узрочника маститиса говеда присутног у 88% случајева, а поред њега последњих година су доказани *Staphylococcus intermedius* и *Staphylococcus hyicus* (Рајић Савић и сар., 2014).

### 2.1.1.1. Значај *Staphylococcus aureus* као узрочника маститиса

*Staphylococcus aureus* је грам позитивна, факултативно анаеробна, аспорогена, непокретна бактерија величине 0,8 до 1 микрометара. Добро се размножава на чврстим хранљивим подлогама и образује правилне, округле колоније које су благо испупчене. Поред правилних S форми, могу се запазити и R и G колоније. Колоније су пигментисане у већини случајева златножутим пигментом, али неки сојеви могу да поседују и бели пигмент (Марковић, 1990; Quinn, 2002). Колоније су величине 3 до 5 милиметара и испољавају јасну зону хемолизе коју изазива алфа хемолизин. Оптимална температура за размножавање *Staphylococcus aureus* је 30-37°C. Могу се размножавати између 6-46°C и веома добро подносе промене рН вредности (од 4,2 до 9,3). Оптимална рН вредност је од 7 до 7,5. Узрочник се може размножавати и у раствору са 15% NaCl и 40% жучи (Марковић, 1990; Quinn, 2002).

*Staphylococcus aureus* је патоген који у данашње време изазива највеће проблеме и примарни је етиолошки агенс у већини земаља (Tollersrud и сар., 2000). Један је од најчешћих узрока супклиничке форме маститиса (20-60%). Често се јавља у спољашњој средини, није строго прилагођен ткиву вимена као *Streptococcus agalactiae*, па је потребан дужи временски период пре него што се стафилококе населе у неком запату и изазову масовно клиничко обољење. Способност *Staphylococcus aureus* да ствара биофилм *in vivo* сматра се главним фактором вируленције који утиче на његову патогенезу код маститиса. Присуство узрочника се може доказати најчешће на кожи сиса, нарочито на местима мањих повреда на врховима сиса, и то не само код животиња са оболелим вименом него и код здравих животиња. Поред наведеног, има дугачак период инкубације због чега инфицирано стадо дуго може бити без клиничких симптома. У неким стадима јунице могу бити инфициране и пре првог тељења. Пријемчиве су за слуз вимена и када продру у виме, везују се за протеин мембране масних капљица крављег млека и епителне ћелије млечне жлезде помоћу протеина ћелијског зида и то им омогућава да дубље продру у виме. Живе у фагоцитима у које доспевају фагоцитозом, те су и на тај начин заштићени. *Staphylococcus aureus* користи за размножавање у њима и помоћу њих такође продире дубље у паренхим.

Оштећење паренхима последично доводи до губитака у производњи млека. Врло га је тешко искоренити из стада али мере контроле које се састоје од дезинфекције сиса пре и после муже узимања узорак млека, употребе антибиотика у време засушења и контролом крава које улазе у стада може смањити стопу инфекције на прихватљив ниво.



Слика 1. *Staphylococcus aureus* на крвном агару

### 2.1.1.2. Значај *Streptococcus spp.* као узрочника маститиса

Стрептококни маститис изазивају три врсте бактерија: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus uberis*.

*Streptococcus uberis* је углавном одговоран за појаву супклиничких форми маститиса, док је за појаву клиничких форми маститиса одговоран у мањем броју случајева. Преношење са краве на краву може бити доминантан пут којим се овај патоген шири. Овај узрочник је углавном присутан у материјалу за простирку као што је слама. Такође, може да се нађе на телу животиње, спољашњој кожи вимена или на њушци. Првобитна инфекција се јавља између две муже, тако да дезинфекција, чишћење, уклањање стајњака помажу у контроли и превенција маститиса. Наиме, озбиљност упале млечне жлезде зависи од реакције имуног одговора домаћина, врсте патогена и специфичног соја.

Већина инфекција изазваних овим узрочником се јављају у периоду засушења. Denis и сар. (2006) су утврдили да су макрофаги крава у периоду засушења активнији него код крава које су у периоду лактације. Даказано је да су стопе опоравка веће код крава после првог и другог партуса у поређењу са старијим кржавама. Наиме, шест дана након успостављања инфекције, овај патоген почиње да оштећује алвеоларно ткиво и доводи до фиброзе. Овим се може објаснити зашто *Streptococcus uberis* слабије реагује на антибиотску терапију. Трајање случајева маститиса узрокованим овим патогеном варира у великој мери и не може се генерализовати. Утврђено је да је период инкубације је у распону од 16. до 46. дана.

*Streptococcus agalactiae* се сматра обавезним интрамамарним патогеном говеда који може дуго преживети у млечној жлезди, али врло мало изван ње. Према Luhs и сар. (2016) овог узрочника у стада говеда може пренети особље задужено за мужу. Показало се да сојеви *agalactiae* изоловани од крава са дијагностикованим маститисом и сојеви изоловани код људи имају 58% сличности. Патоген може преживети и опстати релативно дуго, неоткривен у вимену.

Овај патоген се не може размножавати или расти изван вимена, али могу кратко да опстану на рукама особља за мужу или на површини сиса. Ово може бити довољно за његово ширење на здраве краве током муже. Преваленција *Streptococcus agalactiae* показује да је ова бактерија значајан узрочник маститиса, посебно у стадима која имају лошу хигијену. Због побољшања програма контроле маститиса, у Европи и Северној Америци појава *Streptococcus agalactiae* је релативно ниска. Овај патоген добро реагује на терапију антибиотицима и може се искоренити из млечног стада dobrим мерама контроле маститиса.

*Streptococcus dysgalactiae* је патоген који се често налази изван млечне жлезде и чија учесталост код маститису варира од региона до региона. Иако су Fox и Gay (1993) приметили да статус *Streptococcus dysgalactiae* као заразни или еколошки узрочник маститиса може бити дискутабилан, његов значај као патогена маститиса је јасан. Khan и Khan (2006) истакли су да овај узрочник може свуда да се нађе: у млечној жлезди, бурагу, фецесу, простиркама и штали. Поред тога, овај патоген није изолован само из вимена, већ и из других делова тела животиња, укључујући њушку, крајнике и вагину.



Слика 4. *Streptococcus dysgalactiae* на крвном агару

*Streptococcus dysgalactiae* се може јавити током периода засушења у стадима, чак и када није било претходних случајева ове посебне врсте инфекције. Присуство овог патогена у стадима музних крава је озбиљно јер је упала, изазвана

овим агенсом обично акутна. Уегуham и сар. (2002) су навели да *Streptococcus dysgalactiae* потиче из околине животиња и да се у ретким случајевима може пренети преко вектора инсекта, као што су осе или муве. Патоген је способан да неутралише неспецифичан имунитет животиње лучењем ензима и токсина способних да превазиђу ову, иначе ефикасну одбрану.

### 2.1.2. Епидемиологија маститиса

На основу истраживања, у већини земаља преваленција маститиса у стадима млечних крава се креће око 50%. Преваленција маститиса код првотелки и високо стеоних јуница се креће од 30% до 50% (Constable и сар., 2017). Поред тога, просечна годишња инциденца клиничких маститиса, израчуната као број случајева на 100 крава, укључујући и период засушења, у појединим стадима се креће од 10% до 12%, али се у појединим стадима јавља и већа инциденца од 16% до 65% (Constable и сар., 2017).

Највећи ризик од појаве маститиса се јавља у раној лактацији, обично у првих 50 дана. Ризик за појаву маститиса се повећава са повећањем броја партуса. У стадима товних говеда преваленција се креће од 32% до 37%, што може негативно да се одрази на тежину товне телади (Constable и сар., 2017). Стопе смртних случајева варирају, што превасходно зависи од узрочника и имунолошког статуса јединке да се избори са инфекцијом. На пример, стафилококни маститис није смртоносан, али перакутни стафилококни маститис код свеже отелених крава може бити фаталан (Constable и сар., 2017).

Преваленција инфекције интрамамарним патогенима је различита у различитим државама. Првенствено то зависи од начина држања крава. Постоје одређене разлике уколико су краве држане на пашњаку или у затвореној штали, односно уколико је начин држања слободан или су краве на везовима. У Сједињеним Америчким Државама се као најчешћи узрок клиничких маститиса изолују колиформне бактерије, док су у Канади најчешће изоловане бактерије узрочници клиничког маститиса *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus uberis* и коагулаза негативне стафилококе (Riekerink, и сар., 2008). У Европи клинички маститис узрокован *Klebsiella spp.* се јавља ређе него маститис узрокован *E. coli*, док су у Сједињеним Америчким Државама подједнако важна оба узрочника, јер се као простирка користи пиљевина и струготина дрвета. У Норвешкој је најчешћи узрочник је *Staphylococcus aureus*, док је такође значајан и *Streptococcus dysgalactiae* (Constable и сар., 2017).



У Шведској најзначајнији патоген је *Staphylococcus aureus* који је изолован у 21,3% узорака, али су заступљени и *E. coli* (заступљена у 15,9% узорака), *Streptococcus dysgalactiae* (15,6%), *Streptococcus uberis* (11,1%) и *Klebsiella spp* (4,2% узорака) (Unnerstad и сар., 2009). Изолација *E. coli* је повећана у узорцима пореклом из штала са слободним системом држања, док је нижа у узорцима из штала са везаним системом (Unnerstad и сар., 2009). У Финској је такође преобладајући патоген *Staphylococcus aureus*. Поред овог узрочника изоловани су и коагулаза негативне стафилококе, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* и *E. coli* (Koivula и сар., 2007).

Најчешћи узрочници клиничког маститиса у Белгији су *Streptococcus uberis* и *E. coli* (Verbeke и сар., 2014). Ради поређења, на Новом Зеланду најчешћи патоген, узрочник клиничког маститиса је *Streptococcus uberis*, док је у Ирској најзначајнији *Staphylococcus aureus*, а затим и остали узрочници попут *Streptococcus uberis*, колиформне бактерије и бактерије из животне средине крава, као и коагулаза негативне стрептококе (Constable и сар., 2017). Преваленција инфекције изазване *Staphylococcus aureus*-ом, код крава се креће у интервалу од 7% до 40% али је у неким стадима већа. У истраживању које је спроведено у Данској на фармама млечних крава је откривено да је од 21% па чак до 70% крава инфицирано. Најчешћа изолована врста је био *Staphylococcus aureus*, и то у 10% узорака (Constable и сар., 2017).

### 2.1.3. Патогенеза маститиса

Свеобухватно разумевање патогенезе маститиса је кључ за развој одговарајућих метода којима би се ово обољење детектовало (Moon, 2007). Примарни узрок маститиса је широк спектар бактеријских сојева, међутим пријављене су и инциденције вирусног и гљивичног маститиса (Pyolara, 2003). У физиолошким условима, сисни канал је чврсто затворен мишићима сфинктера, спречавајући улазак патогена (Nettinga, 2008).

Млечни канал је обложен кератином, воштаним материјалом, који спречава миграцију бактерија. Међутим, ефикасност кератина је ограничена. Течност се акумулира у млечној жлезди како се порођај приближава, што доводи до повећаног притиска у млечној жлезди, а рањивост млечне жлезде је узрокована проширењем сисног канала и цурењем млечног секрета (Paulrud, 2005). Поред тога, током muže долази до испирања кератина, а такође долази и до дистензије сисног канала. Сфинктеру је потребно око два сата да се врати у физиолошки положај након muže. Када уђу у сису, бактерије такође морају да избегну ћелијске и хуморалне одбрамбене механизме вимена. У случају да се не елиминишу, почињу да се размножавају у млечној жлезди (Rainald и сар., 2006). Они ослобађају токсине и индукују леукоците и епителне ћелије да ослобађају хемоатрактанте, укључујући цитокине као што су фактор некрозе тумора, интерлеукини, еикозаноиди (као што су простагландини), радикали кисеоника и протеини акутне фазе (нпр. хаптоглобин). Ово привлачи циркулишуће ефекторске ћелије имуног система, углавном полиморфонуклеарне неутрофиле на место инфекције (Zhao, 2008).

Полиморфонуклеарни неутрофили делују тако што уништавају бактерије које инвадирају преко система зависних од кисеоника и система независних од кисеоника (Kalorey и сар., 2008). Уништавање већине полиморфонуклеарних неутрофила одвија се апоптозом, када се њихов задатак испуни. Након тога макрофаги гутају преостале полиморфонуклеарне неутрофиле (Рааре, 2003). Мртве и одлучене епителне ћелије млечне жлезде, поред мртвих леукоцита, излучују се у млеко што доводи до високог броја соматских ћелија у млеку.

Када инфекција траје, долази до унутрашњег отока у епителу млечне жлезде. Алвеоле млечне жлезде постају оштећене и почињу да губе анатомски интегритет. Крвно-млечна баријера је пробијена, што доводи до тога да компоненте екстрацелуларне течности, као што су хлорид натријум, водоник, калијум и јони хидроксида, улазе у жлезду и мешају се са млеком.

Када дође до великог оштећења крвно-млечне баријере, крв се може открити у млеку. То доводи до видљивих промена на вимену као што су појачан спољашњи оток и црвенило млечне жлезде. Промене се такође дешавају у млеку, укључујући повећану проводљивост, повећану рН вредност, повећан садржај воде и присуство видљивих угрушака и пахуљица (Zhao, 2008).

#### 2.1.4. Подела и клиничка слика маститиса

Према клиничком току, маститис се може поделити на:

- перакутни,
- акутни,
- субакутни и
- хронични.

Маститис се на основу форме болести може поделити на:

- супклинички и
- клинички.

На основу клиничко-патолошке слике тока обољења, маститиси се деле на:

- катаралне (запаљењем су захваћени сисни канал и цистерна),
- интерстицијалне (захваћено је везивно ткиво млечне жлезде) и
- паренхиматозне (маститисом је захваћен жлездани део вимена).

Перакутни маститис се манифестује брзом појавом запаљенске реакције, болова и системских симптома који резултирају тешко болесном кравом у кратком временском периоду.

Акутни маститис је врло брз инфламаторни одговор који карактеришу системски клинички знаци који укључују повишену температуру, анорексију, шок, као и локалне инфламаторне промене у млечној жлезди и млеку.

Субакутни маститис је најчешће виђени облик клиничког маститиса који се карактерише са неколико локалних знакова благог запаљења вимена и видљивих промена у млеку као што су мали угрушци.

Хронични маститис је дугорочно понављајући случај маститиса који може показати мало клиничких симптома између поновљених повремених појава болести где су видљиви знаци и може нестати током неколико месеци. Хронични маститис често доводи до иреверзибилног оштећења вимена због поновљених појава упале, а често се ове краве бивају одстрањене из запата (Blowey и Edmondson, 2010).

Супклинички маститис је суптилан и теже га је испратити, где крава делује здраво и виме не показује знаке упале, а млеко је непромењено. Упркос томе, микроорганизми и соматске ћелија које се боре против инфекција присутни су у великом броју у млеку (Acevedo и Hernández, 2008). Током овог запаљенског процеса, узорци млека показали су брз пораст броја соматских ћелија, које карактерише повећани број неутрофила у секрету (Blowey и Edmondson, 2010).

Пораст броја соматских ћелија у млеку није увек последица запаљенског процеса већ на пораст утичу бројни фактори као што су физиолошко-фармаколошки (стадијум лактације, раса, ветеринарски лекови) и стресни фактори (промена исхране, транспорт, услови држања, начин муже и техничка исправност машина за мужу) (Катић, 1984; Heeschen, 1995; Катић, 1995). Међутим најзначајније повећање броја соматских ћелија изазвано је запаљенским процесом, па се број соматских ћелија у млеку из појединих четврти вимена крава, већ више од четрдесет година користи за оцену здравственог стања млечне жлезде. Број соматских ћелија у збирном млеку крава ветеринару и сточару указује на величину проблема који представљају субклинички маститиси у запату музних крава а технологу показују квалитет сировог млека за прераду (Катић и Мијачевић, 2006).

Субклинички маститис се сматра најважнијим из много разлога, један од њих је и то да је 15 до 40 пута чешћи од клиничког маститиса, углавном претходи клиничком облику, стога, ако желимо да контролишемо клинички облик, морамо започети са контролом субклиничког, пошто је дуготрајнији, тешко га је открити, смањује производњу млека, негативно утиче на квалитет млека и изазива инфекцију код других животиња у стаду (Pinzon, 1989).

Клинички маститис се карактерише видљивим променама код животиње. Промене се јављају и у самој млечној жлезди где долази до отока, темперираности, бола и индурације. Долази и до промена у млеку. Оно се може променити у конзистенцији и боји, када се у млеку примећује присуство крпца, трагова гноја, крви или боја млека одговара боји пива, а дијагноза се поставља палпацијом и прегледом првих млазева млека (Bramley, 1991). Клинички маститис треба користити само као смерницу, пошто различити патогени могу изазвати хронични, супклинички, субакутни, акутни и перакутни облик болести, а клиничка диференцијација је отежавајућа.

Епизоде клиничког маститиса су категоризоване према њиховој тежини и трајању. Према озбиљности, маститис се карактерише као перакутни облик који се карактерише јаком упалом са отоком и болом у захваћеној четврти. Овај облик брзо прелази у системско обољење које се неретко завршава угинућем. Акутни облик карактерише се основним знацима запаљења, али нема системске инфекције. Субакутни маститис се карактерише као благо запаљење са променама у млеку.

Клинички маститис проузрокован са *Staphylococcus aureus* може варирати од благог тока до перакутног где се јавља гангрена и озбиљан поремећај општег стања. У неким запатима маститис проузрокован са *Staphylococcus aureus* се шири брзо и захвата висок проценат музних грла, док у другим запатима инфекција се шири споро, стагнира и ограничена је само на одређена грла, што пре свега зависи од фактора вируленције доминантног клона *Staphylococcus aureus* (Sommerhäuser и сар., 2003). Разлог за велику распрострањеност интрамамарних инфекција изазваних *Staphylococcus aureus* је повезан са карактеристикама ове бактерије као и генералног неразумевања епидемиологије заразе која води до неефикасних мера контроле (Zecconi, 2010).

Када се запази абнормална секреција млека, треба узети специјалне шоље покривене металном мрежицом или крпом, најбоље са црним, сјајним дном. Помоћу њих се детектују угрушци, хрпице или гној пореклом из инфициране четврти вимена. Млеко се измуза према тамној плочици и врше се поређења четврти вимена. Први млазови се измузају на под. Промена боје у току лактације настаје услед присуства крви или воденасти секрет који указује на хронични маститис. Један од значајних проблема се јавља када се угрушци или гној појаве у измузању првих млазова, а након тога краве луче млеко нормалног изгледа. Угрушци или крпице у млеку, заједно са дисколорацијом су врло значајне, јер обично указују на озбиљан степен упале, чак и ако се нађу у траговима. Крпице на крају може могу индиковати туберкулозу вимена крава.

У периоду засушења, нормално се код крава секрет мења из нормалне према бистрој, воденастој течности, а затим се лучи течност боје и конзистенције меда и на крају колострум, последњих неколико дана пред телење. Уколико се примете неке промене које одступају од наведених промена, треба посумљати на инфекцију.

Абнормалности млечне жлезде се најбоље откривају адспекцијом и палпацијом. Палпација је од највеће вредности када се врши одмах након muže, односно када је виме празно. Код већине облика маститиса уочене су абнормалности у пределу млечне цистерне, али се понекад мора палпирати цела четврт, поготово код сумње на туберкулозу. Сисе се прегледају на постојање лезија коже, посебно око краја сиса.

Палпација и преглед вимена су усмерени према детекцији фиброзе, отока услед запаљења и атрофије млечне жлезде. Фиброза млечне жлезде се јавља у различитим облицима, односно јавља се као дифузно повећање везивног ткива, дајући приликом палпације чвршћи осећај. Локална фиброза се може јавити на појединачној четврти, а величина варира од зрна грашка до величине песнице. У тежим случајевима долази до развоја гангрене или апсцеса у млечној жлезди. Пажљивом палпацијом је могуће открити да је у атрофичној четврти смањена маса секреторног ткива млечне жлезде.

Системска инфекција настаје као компликација упорних маститиса. У клиничкој слици овог облика се јављају симптоми попут токсемије, пирексије, тахипноје, хипомотилитета бурага, депресије, лежања и анорексије које могу бити присутне зависно од врсте и тежине инфекције (Кетр и сар., 2008).

Код крава са клиничким маститисом долази до повећања растојања између скочних зглобова, одражавајући промену става као реакцију на болни процес у вимену. Дневни унос хране се смањује за приближно 1,2 kg током 5 дана пре него што је откривен клинички маститис, затим слабије долазе до места на ком се хране и једу спорије. Краве са клиничким маститисом обично дуже времена стоје.

### 2.1.5. Терапија маститиса

Имајући у виду значај маститиса, како са гледишта здравља животиња, тако и са економског аспекта говедарске производње, Програм мера здравствене заштите животиња у Републици Србији (Сл. гласник РС 21/12, 2020) обавезује ветеринарску службу Републике Србије да прати, открива, сузбија и контролише инфективно запаљење млечне жлезде, изазвано стафилококом или стрептококом.

Поступак терапије маститиса и исход лечења зависе од форме запаљења вимена, степена алтерације ткива и на крају од времена почетка терапије и примене адекватног препарата или адекватног поступка (Радиновић и сар., 2019). У идеалним условима, употреба антимикуробних лекова би требало да буде последица постављања поуздане дијагнозе болести и присутних патогена, након чега би требало одредити најделотворнији лек поштујући принципе рационалне фармакотерапије. Ово последње обухвата и лабораторијско одређивање антибиотске осетљивости специфичних патогена, узимајући у обзир факторе као што су фармакокинетичка и фармакодинамска својства лека (Стојановић и сар., 2018). Познато је да антимикуробна терапија представља кључну компоненту у контроли маститиса у систему производње млека (Erskine и сар., 2003; Oliver и сар., 2011) при чему се у терапији овог обољења примењују следеће групе антимикуробних лекова: пеницилини, сулфонамиди, хинолони и аминогликозидни антибиотици (Радиновић и сар., 2019). Бета-лактамски антибиотици се широко користе код крава за лечење, али и превенцију маститиса. Превентивна терапија се рутински користи након завршетка лактационог периода. Бета-лактамски антибиотици, као што су клоксацилин, ампицилин, цефалонијум или цефквином (четврта генерација цефалоспорина), се апликују локално у сваки сисни канал пред засушење, што обезбеђује заштиту у периоду када крава не даје млеко чиме се смањује ризик од маститиса у следећој лактацији (Sommerhäuser и сар., 2003).

Прекомерна примена антимикуробних лекова довела је до све веће резистенције бактерија на поједине антибиотике. Прва резистенција према пеницилину забележена је 1947. године у случају *Staphylococcus aureus* и то само



четири године након започињања индустријске производње овог антибиотика. Да би проблем резистенције на пеницилин био превазиђен, 1959. године регистрован је метицилин, синтетски пеницилин отпоран на деловање пеницилиназе. Шездесетих година двадесетог века се јавља проблем резистенције и на метицилин (Patricia, 1961). У ветеринарској медицини прва изолација метицилин-резистентне *Staphylococcus aureus* је била 1972. године у Белгији из млека краве оболеле од маститиса (Devriesei cap., 1972).

У претходних шездесет година једно од најинтезивнијих области научних истраживања представљало је испитивање појаве и раширености резистенције бактерија према антибиотцима (Prescotti cap., 2002; Manian, 2003). *Staphylococcus aureus* је високо патоген и способан је да брзо развије мултиплу резистенцију на антибиотике помоћу бројних механизма (Prescotti cap., 2002; Manian, 2003). Доказано је да је резистенција на антимицробне лекове чешћа код *Staphylococcus aureus* него код других стафилокока. Висок ниво резистенције на  $\beta$  лактамске антибиотике настаје услед присуства *tes* гена који кодира синтезу пеницилин везујућег протеина (Turlej и cap., 2011).

Рационална примена антибиотика код фармских животиња је један од битних предуслова за постизање одрживости и исплативости производње. Познато је да терапија маститиса укључује употребу антибиотика која укључује и ризик за настанак и ширење антимицробне резистенције (Gomes и Henriques, 2016; Kromker и Leimbach, 2017). Наиме, неадекватна примена антибиотика повлачи читав низ нежељених последица за саму животињу, повећава антимицробну резистенцију и повећава трошкове терапије (Ковачевић и Радиновић, 2020). Исто тако може имати негативне последице за здравље људи. Тренутне смернице Светске здравствене организације препоручују да се ограничи употреба антибиотика у сточарским, а посебно на органским фармама. Зато је потребно развити алтернативне, природне и сигурне методе за контролу инфекција.

### 2.1.5.1. Терапија маститиса проузрокованог *Staphylococcus aureus*

Стопа излечења крава оболелих од маститиса узрокованог *Staphylococcus aureus*-ом, применом интрамамарне или парентералне апликације лекова, значајно је нижа од задовољавајућег, нарочито код крава у лактацији. Стопе излечења ретко прелазе 50%, а честе су питању и доживотне инфекције. Сматра се да постоје три фактора која доприносе ниским стопама излечења. То су недовољна пенетрација антимикуробног лека, формирање L-облика *Staphylococcus aureus* и продукција  $\beta$ -лактамазе. Способност бактерије да преживи у фагоцитима онемогућава адекватан продор антибиотика. Такође може се догодити инактивација антимикуробних састојака у млеку и серуму, као и формирање L-облика *Staphylococcus aureus* -а.

Антимикуробна резистенција се углавном најчешће јавља у регионима у којима су преобладајући сојеви који продукују  $\beta$ -лактамазу. Наведени ензим узрокује резистенцију на пеницилин G, ампицилин и амоксицилин (Sakwinska и сар., 2011). На основу ових података потребно је познавање локалних епидемиолошких фактора при лечењу, када нису доступни подаци о осетљивости културе на антибиотике. Клоксацилин и нафцилин су ефикасни против грам-позитивних бактерија, али им је мања ефикасност против стафилокока које не продукују  $\beta$ -лактамазу. Додатком клавуланске киселине у амоксицилин, као и клоксацилин додат ампицилину добија се формулација која је ефикасна против сојева који производе  $\beta$ -лактамазу. Овакви спојеви се налазе у класичним интрамамарним формулацијама. Цефалоспорини прве и треће генерације као и еритромицин имају добру ефикасност против сојева који производе  $\beta$ -лактамазу. Цефапирин коришћен у терапији засушених крава дат јуницама, доводи до ефикасног лечења инфицираних четврти и спречавања нових инфекција у првој лактацији. Интрамамарно апликован клоксацилин са ампицилином пожељан је у иницијалној терапији крава са маститисом узрокованим *Staphylococcus aureus*-ом (Consable и сар., 2017).

Антимикуробна терапија супклиничког маститиса у периоду лактације није економски исплатива због одбацивања млека третираних крава. Терапија крава на

крају лактације и почетком засушења је ефикаснија и успешна у 40 до 70% случајева (Consable и сар., 2017).

Лечење клиничких случајева маститиса изазваног *Staphylococcus aureus*-ом интрамамарном апликацијом антимикробног лека представља чест начин лечења. Међутим, опоравак крава након излечења не значи да је узрочник елиминисан. Генерално, стопа излечења превасходно зависи од трајања инфекције, броја четврти које су захваћене, као и да ли сој бактерије производи  $\beta$ -лактамазу, примењеног лека и дужине терапије.

Тренутне препоруке за осигурање најбоље стопе излечења су комбинација интрамамарног и парентералног начина примене лека или само интрамамарне примене у трајању 4 до 8 дана. Као лек избора сматра се пеницилин G за сојеве осетљиве на пеницилин. Интрамамарно примењен пирлимицин такође има добру клиничку ефикасност када се примењује као продужена терапија у трајању од 8 дана (Barlow и сар., 2013). У истраживању које је обухватило 184 случаја супклиничког маститиса у Њујорку, комерцијално доступне формулације нису биле значајно ефикасније у односу на контролне случајеве где није спроведена терапија. Бактериолошко излечење је износило 43%, са следећим стопама: еритромицин (65%), пеницилин (65%), клоксацилин (47%), амоксицилин (43%) и цефапирин (43%) (Constable и сар., 2017). У мултицентричном, рандомизираним клиничком испитивању у Европи, продужени интрамамарни третман цефкиномом побољшао је степен клиничког излечења крава у лактацији са 60% (апликација лека 3 пута на дванаест часова) на 84% (додатне три апликације у размаку од 24 часа), док стопа бактеријског излечења није промењена (Swinkels и сар., 2013).

Због постојаности инфекције у стаду, веома је важно изабрати антимикробно средство на основу антибиограма, будући да постоје сојеви осетљиви на  $\beta$ -лактамазу код којих се мора применити посебан терапијски протокол.

Стопа излечења за сојеве осетљиве на пеницилин комбинованом терапијом износила је 76%, у односу на излечење сојева који производе  $\beta$ -лактамазу где је примењен комбиновани третман клавуланском киселином, а стопа излечења је износила 29% (Tarone и сар., 2003).

### 2.1.5.2. Терапија маститиса проузрокованог *Streptococcus spp.*

Осетљивост стрептокока из животне средине у *in vitro* условима је велика. Већина изолата *Streptococcus uberis* и *Streptococcus dysgalactiae* су осетљиви на деловање пеницилина, амоксицилина, новобиоцина и цефепима апликованих интрамамарно. Велики проценат показује осетљивост на тетрациклине док је степен осетљивости на аминогликозиде низак. Могу се јавити спонтана излечења али постоје и случајеви када се мора применити продужена терапија животиња. Парентерално лечење се ретко примењује. Продужена терапија у трајању 5 до 8 дана, интрамамарном применом цефтиофура, пирлимицина или пенетамат-хидрида, дихидрострептомицин-сулфата и фраметицин-сулфата на свака 24 часа, повећава стопу бактериолошког излечења крава са експериментално изазваним маститисом узрокованим *Streptococcus uberis*-ом (Constable и сар., 2017).

У истраживању које је обухватило 1148 случајева маститиса у Њујорку, комерцијално доступни препарати су били ефикасни у односу на контролну групу. Наиме, бактериолошко излечење је имало следеће стопе излечења: код третмана амоксицилином 90%, пеницилином 82% и клоксацилином 79% (Constable и сар., 2017). Мелоксикам дат кравама на Новом Зеланду са благим симптомима клиничког маститиса, смањује број соматских ћелија после терапије и смањује број крава искључених из даље производње са 28% на 16% (Mc Dougal и сар., 2009).

## **2.2. Антибиотска резистенција**

### **2.2.1. Значај**

Антибиотска резистенција представља глобални здравствени проблем као једна од најважнијих претњи за јавно здравље и безбедност хране. Као алармантни проблем 21. века у хуманој и ветеринарској медицини, процењено је да је као озбиљан друштвени и економски проблем одговорна за 25.000 смртних случајева годишње само у Европској Унији (EY) (ECDC, 2009).

### **2.2.2. Узроци**

Неодговарајућа и нерационална употреба антибиотика ствара повољне услове за појаву и ширење резистентних микроорганизама и директно утиче на појаву антибиотске резистенције (Aarestrup и сар., 2008). Утврђено је да у већини делова света појава резистенције на антибиотике бактеријских патогена представља претњу за популације животиња и људи, са потенцијалним ризиком преноса резистентних сојева бактерија са стоке у животну средину и у ланац исхране (Kramer и сар., 2017). Број нових антибактеријских лекова из године у годину је све мањи, иако се особине нових антибактеријских лекова поправљају малим изменама познатих молекула. Број микроорганизама резистентних на антибиотике је све већи (Cunha, 2000).

### **2.2.3. Последице**

Услед ширења АМР и значаја за одржање глобалног јавног здравља како људи тако и животиња у оквиру многих регулаторних тела широм Европе и света постоје утврђени системи праћења потрошње антимикуробних лекова у хуманој и ветеринарској медицини са акцентом на праћење појаве и ширења АМР.

Када је у питању употреба антимикробних лекова у ветеринарској медицини само у 90 земаља постоји уређен систем праћења употребе ових лекова од 130 земаља које су прошле евалуацију од стране ОИЕ (World Organisation on Animal Health). До данас, још увек не постоји хармонизовани систем надзора над употребом и протоком антимикробних средстава широм света.

Пошто су људи, животиње и животна средина тесно повезани, важно је узети у обзир појаву и ширење АМР из перспективе "One Health" концепта, што представља оквир за интердисциплинарни приступ решавању овог огромног изазова. Овај концепт је настао са циљем истицања значаја везе између здравља људи и животиња и преноса болести са животиња на људе и обрнуто, обухватајући и животну средину као везу између њих и потенцијални извор резистентних микроорганизама (Robinson и сар., 2016).

### 3. ЦИЉ И ЗАДАТАК ДИПЛОМСКОГ РАДА

Циљ дипломског рада је био да се диск дифузионом методом испита осетљивост бактеријских изолата који су доминатни узрочници маститиса код крава на најчешће прописиване антибиотике у терапији овог обољења.

Задатак дипломског рада је да се одреди осетљивост *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* као бактеријских изолата који представљају једне од најуобичајнијих узрочника маститиса на антибиотике као што су пеницилин, тетрациклин, стрептомицин и амоксицилин/клавуланска киселина

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ДИПЛОМСКОГ РАДА

### 4.1. САКУПЉАЊЕ УЗОРАКА МЛЕКА И ИЗОЛАЦИЈА УЗРОЧНИКА МАСТИТИСА

Истраживање је спроведено на четири фарме Холштајн-фризијске расе говеда. Фарме су имале различит број животиња, од 20 до 300 крава. Узимани су узорци млека од животиња са дијагностикованим клиничким и супклиничким маститисом. Све животиње биле су у фази лактације, без других здравствених проблема, осим маститиса. Све животиње су биле у лактацији, без клиничких симптома промене општег стања уз дијагностиковану субклиничку или клиничку форму маститиса. Клинички маститис дијагностикован је клиничким прегледом, а супклинички је дијагностикован анализом узорака млека применом калифорнија маститис теста. За бактериолошка испитивања узимани су узорци млека током јутарње муже уз претходну дезинфекцију врха сисе, пре стављања апарата за мужу и након прања вимена и измуза првих млазева млека. Узорци су прикупљани у стерилним епруветама које су означаване идентификационим бројем краве и потом чувани на 4°C.

Узорци за бактериолошка испитивања обрађивани су у лабораторији "Ин витро Лаб" у Шапцу. Узорци од тачно 0,01 милилитара су засејани на 2%-тном крвном агару помоћу платинумске езе. Након засејавања узорци су инкубирани 48 сати на 37°C. Присуство раста микроорганизама, њихова величина, облик, боја и распоред нараслих колонија, а посебно присуство хемоллизе узети су у обзир током читавања резултата.



## 4.2. ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ ОСЕТЉИВОСТИ ИЗОЛАТА *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.*

Испитивање осетљивости изолованих бактерија које представљају једне од најчешћих узрочника маститиса је урађена *in vitro* применом Kirby–Bauer дифузионе методе, на Mueller-Hinton агару.

Тестирање осетљивости на антибиотике спроведено је коришћењем комерцијално доступних антибиотских дискова (Bioanalyse) у следећим концентрацијама: ампицилин (10g); стрептомицин (10g); гентамицин (10g); триметоприм/сулфаметоксазол (1,25/23,75g); енрофлоксацин (5g); и цефтриаксон (30g). Изолати и референтни сојеви су инокулирани на хранљивој подлози одвојено и инкубирани аеробно на 37°C. После инкубације, бактеријска суспензија је вортексирана и разблажена еквивалентно замућењу 0,5 McF (McFarland). Суспензија бактерија је затим инокулисана на површину *Mueller-Hinton agara* раст. Антибиотски дискови су постављени на површину агара и аеробно инкубирани на 37°C током 16 часова. Инхибицијске зоне за различите изолате су мерене и протумачене као осетљив, интермедијаран или резистентан на основу препорука Института за клиничке лабораторијске стандарде.

## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

### 5.1. ИЗОЛАЦИЈА УЗРОЧНИКА МАСТИТИСА

Од укупно 77 испитаних узорака млека у 49 је доказано присуство бактерија, узročника маститиса што представља 63,3% узорака. Од изолованих бактеријских изолата најчесталији је био *Streptococcus* spp. Који је доказан у 17 узорака док је *Staphylococcus aureus* био доказан у 6 узорака. Резултати заступљености бактеријских изолата у узорцима млека код крава са дијагностикованим маститисом су приказани у Графику 1.

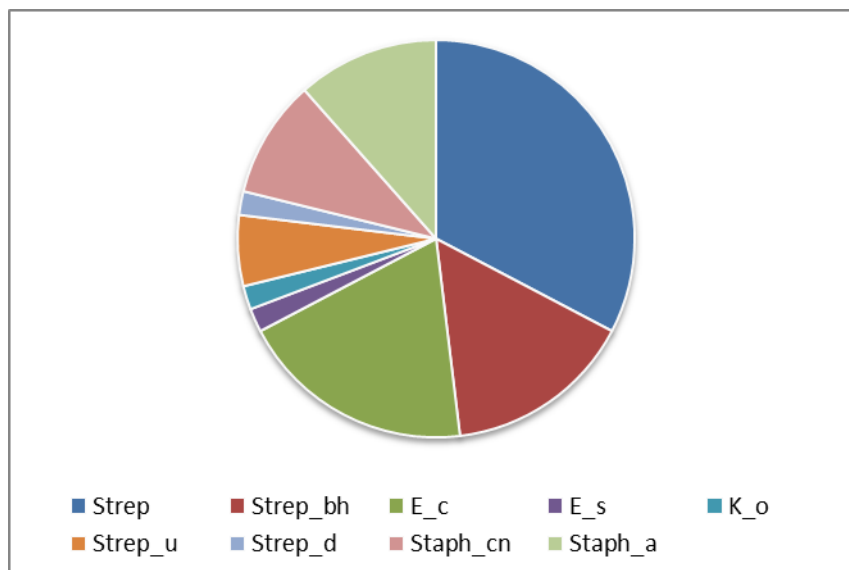


График 1. Заступљеност (%) бактеријских изолата у узорцима млека

Strep - *Streptococcus* spp., Strep\_bh - *Streptococcus* spp.  $\beta$  hemolyticus, E\_c - *E. coli*, E\_s - *Enterobacter sakazakii*, K\_o - *Klebsiella oxytoca*, Strep\_u - *Streptococcus uberis*, Strep\_d - *Streptococcus dysgalactiae*, Staph\_cn - *Staphylococcus* spp. coagulase negative, Staph\_a - *Staphylococcus aureus*

## 5.2. АНТИМИКРОБНА ОСЕТЉИВОСТ УЗРОЧНИКА МАСТИТИСА

Резултати истраживања су показали да су сви испитивани бактеријски изолати показали резистентност на пеницилин (100%), док су изолати *Streptococcus sp.* показали значајну резистентност ка стрептомицину (68.75%) и тетрациклину (87,5%). *Staphylococcus aureus* је показао високу осетљивост на стрептомицин (100%) и тетрациклин (83,33%).

Врста антибиотика		<i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (%)	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (%)
<b>PEN</b>	<b>R</b>	100	100
	<b>S</b>	0	0
	<b>I</b>	0	0
<b>STR</b>	<b>R</b>	68,75	0
	<b>S</b>	31,25	100
	<b>I</b>	0	0
<b>TET</b>	<b>R</b>	87,5	16,67
	<b>S</b>	12,5	83,33
	<b>I</b>	0	0
<b>AMC</b>	<b>R</b>	18,75	0
	<b>S</b>	81,25	100
	<b>I</b>	0	0

Табела 1. Антимикробна осетљивост изолата *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* на најчешће прописиване антибиотике у терапији маститиса

**PEN** - пеницилин, **TET** - тетрациклин, **STR** - стрептомицин и **AMC** - амоксицилин/клавуланска киселина; **R** - резистентан, **S** - сензитиван, **I** - интермедијаран.

Терапија антибиотцима се редовно користи у контроли маститиса код крава. Међутим, неуспех бактериолошког лечења представља чест случај, док појава антимикробне резистенције представља све већи проблем у ветеринарској медицини (Erskine и сар., 2002; Pieterse и сар., 2010; Voireau и сар., 2018). Програм контроле маститиса предвиђа употребу антибиотика, попут пеницилина, ампицилина, тетрациклина, гентамицина итд. (Cheng и Nan, 2020), који се могу апликовати системски или интрамамарно (Радиновић и сар., 2018; Cheng и Nan,

2020). За избор одговарајуће терапије битно је одредити узрочника (Радиновић и сар., 2018; Рүөрälä, 2009).

Циљно место деловања антибиотика може зависити од узрочника: познато је да стрептококе остају млечној цистерни, али *Staphylococcus aureus* продире у ткиво вимена и захвата жлездани паренхим (Рүөрälä, 2009). Примена антибиотика дугог дејства није погодна за терапију маститиса током лактације због дугог трајања каренце на млеко (Cheng и Nan, 2009). Први избор за лечење маститиса узрокованог стрептококама и стафилококама осетљивим на пеницилин су  $\beta$ -лактамски антибиотици, посебно пеницилин. Антимикробни лекови широког спектра, као што су трећа или четврта генерација цефалоспорина, нису препоручени за терапију маститиса јер могу повећати појаву резистенције на  $\beta$ -лактаме широког спектра (Рүөрälä, 2009).

Резултати лечења инфекција проузрокованих са *S. aureus* током периода лактације обично нису задовољавајући јер овај патоген може применити неке механизме као заштиту од имуног одговора, попут стварања микро-апсцеса и инвазије у фагоцитне ћелије домаћина (Van der Auwera и сар., 1988). Као резултат тога, већина инфекција *Staphylococcus aureus* повезана је са хроничном инфекцијом и ниским стопама излечења током лактације. Неколико студија је показало да употреба антимикробних лекова није значајно смањила ни трајање инфекције ни тежину клиничких знакова (Рүөрälä и сар., 1998, Рүөрälä и сар., 1994). Међутим, системска примена антимикробних средстава се препоручује за смањење ризика од бактеријемие у тешким случајевима (Рүөрälä, 2009).

Највећа осетљивост сојева бактерија *Staphylococcus aureus* уочена је на амоксицилин са клавуланском киселином. Овај податак је у складу са наводима Могоија и сар. (2006), који препоручују примену комбинације ова два антибиотика у циљу сузбијања супклиничких форми маститиса изазваних овим узрочником (Могои и сар., 2006). Микроорганизми стварају резистенцију према антимикробним препаратима и она може бити природна и изазвана, као и вертикална и хоризонтална. Најчешћи пример стечене резистенције постоји код бактерије *Staphylococcus aureus*. Почетком педесетих година појавила се резистенција *Staphylococcus aureus* на пеницилин (Вакањац и сар., 2015). И у нашем истраживању је забележена висока резистенција на пеницилин (100%), што је у складу са резултатима истраживањима Лесковец и сар. (2015).

Антимикробна резистенција на пеницилине могла би бити последица опсежне употребе дуги низ година. Резистенцију различитих микроорганизама на пеницилин потврдиле су и друге студије (Лесовец и сар., 2015; Chandrasekaran и сар., 2014). Наиме, најчешће прописивани антибиотици у терапији маститиса у нашој земљи су пеницилин, стрептомицин, гентамицин, цефалексин, сулфонамиди и енрофлоксацин (Радиновић и сар., 2019; Вакањац и сар., 2013; Анђелковић и сар., 2017). Утврђено је да су сви изоловани узрочници маститиса били резистентни на пеницилин обзиром да он представља један од најчешће прописиваних антибиотика у терапији маститиса у нашој земљи. Наиме, у терапији маститиса често изостаје етиолошко излечење, а антимикробна резистенција се сматра једним од разлога ниске стопе излечења. Резултати у оквиру овог дипломског рада су показали високу стопу резистенције стафилококних и стрептококних узрочника маститиса према антибиотцима који се највише прописују у терапији маститиса, што указује на озбиљност проблема који у будућности може да доведе до немогућности адекватног лечења животиња и људи са антибиотцима.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата добијених током испитивања могу се извести следећи закључци:

- Највећа осетљивост сојева бактерија *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* уочена је на амоксицилин са клавуланском киселином;
- Највећа резистенција сојева бактерија *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* уочена је на пеницилин (100%);
- Одређивање антимикуробне осетљивости узрочника је основ контроле маститиса, јер различите врсте изолованих микроорганиза захтевају и различиту терапију;
- Употреба антибиотика за лечење и превенцију маститиса крива треба да буде на основу антибиограма и према упутству за примењени лек како би се успорио настанак и ширење антимикуробне резистенције.

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P: Resistance of Bacteria of the Food Chain: Epidemiology and Control Strategies, *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008, 6(5): 733-750.
2. Anđelković J, Radonjić V: Usage of intramammary antimicrobial veterinary medicinal products in the republic of Serbia from 2011 to 2014, *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2017, 18(1): 27-31.
3. Barlow JW, Zadoks NR, Schukken HY: Effect of lactation therapy on *Staphylococcus aureus* transmission dynamics in two commercial dairy herds, *BMC Veterinary Research*, 2013, 9: 28.
4. Бобош С, Видић Б: Млечна жлезда преживара (морфологија, патологија, терапија), Нови Сад: Мала књига, 2005.
5. Blowey RW, Edmondson PW. Mastitis control in dairy herds. Ipswich, Farming Press 1995; p. 29.
6. Boireau C, Cazeau G, Jarrige N, Calavas D, Madec JY, Leblond A, Haenni M, Gay É.: Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016, *Journal of dairy science*, 2018, 101(10): 9451-9462.
7. Chandrasekaran D, Venkatesan P, Tirumurugaan KG, Nambi AP, Thirunavukkarasu PS, Kumanan K, Vairamuthu S, Ramesh S: Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows, *Veterinary World*, 2014, 7, 6.
8. Cheng WN, Han SG: Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2020, 33(11): 1699-1713.
9. Constable DP, Hinchcliff WK, Done HS, Grünberg W: *Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, 11th edition, St. Louis, Missouri, 2017.
10. Cunha BA: Antibiotic resistance: a historical perspective, *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 2000, 21(1): 3-8.
11. Denis M, Parlane NA, Lacy-Hulbert SJ, Summers EL, Buddle BM, Wedlock DN: Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows, *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 114(1-2): 111–120.

12. Erskine RJ, Wagner S, De Graves FJ: Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2003, 19(1): 109–138.
13. Fox LK, Gay JM: Contagious mastitis, *Vet Clin N Am Food Anim Pract*, 1993, 9(3): 475–487.
14. Hettinga K: Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites, *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(10): 3834-3839.
15. European Centre for Disease Prevention and Control, 2009, The bacterial challenge: time to react. Dostupno na: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf)
16. Јаковац М, Машек З: Поремећена секреција вимена. *Мљекарство*, 1971, 21: 104-8.
17. Kalorey D, Kurkurey N, Warke S, Barbudde S: Evaluation of indirect and avidin-biotin enzyme linked immunosorbent assays for detection of anti-listeriolysin O antibodies in bovine milk samples, *Zoonoses Public Health*, 2007, 54(8): 301-306.
18. Kemp MH, Nolan MA, Cripps JP, Fitzpatrick LJ: Animal based measurements of the severity of mastitis in dairy cows, *Veterinary Record*, 2008; 163(3): 175-179.
19. Khan MZ, Khan A: Basic facts of mastitis in dairy animals: Review, *Pak Vet J*, 2006, 26(4): 204–208.
20. Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S, Mäntysaari AE: Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A*, 2007, 57(2): 89-96.
21. Kramer T, Jansen LE, Lipman LJA, Smit LAM, Heederik JJD, Dorado-García A: Farmers' knowledge and expectations of antimicrobial use and resistance are strongly related to usage in Dutch livestock sectors, *Prev Vet Med*, 2017, 147: 142-148.
22. Lyhs U, Kulkas L, Katholm J, Waller KP, Saha K, Tomusk RJ, Zadoks RN: *Streptococcus agalactiae* serotype IV in humans and cattle, northern Europe, *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(12): 2097–2103.
23. Mc Dougall S, Bryan AM, Tiddy MR: Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis, *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(9): 4421.
24. Миланов Д, Стојановић Д: О узрочницима маститиса крава. Зборник радова Научног симпозијума „Обољења млечне жлезде“; Дивчибаре, 2010, 93-101.
25. Moon J: Application of a new portable microscopic somatic cell counter with disposable plastic chip for milk analysis, *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(5): 2253-2259.



26. Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Villa R, Boettcher P, Carli S: Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy, *J Dairy Sci*, 2006, 89(8): 2973-6.
27. Oliver SP, Murinda SE, Jayarao B: Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review, *Foodborne Pathog Dis*, 2011, 8(3): 337–355.
28. Owens EW, Watts LJ, Boddie LR, Nickerson CS: Antibiotic Treatment of Mastitis: Comparison of Intramammary and Intramammary Plus Intramuscular Therapies, *Journal of Dairy Science*, 71(11): 1988.
29. Paape M: The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk, *Veterinary Research*, 2003, 34(5): 597-627.
30. Pieterse R, Todorov SD: Bacteriocins: exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment, *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41(3): 542-562.
31. Програм мера здравствене заштите животиња у Републици Србији, службени гласник РС, бр. 21/12, 2020.
32. Pyorala S: Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis, *Veterinary Research*, 2003, 34(5): 565-578.
33. Pyorala S, Kaartinen L, Kack H, Rainio V: Efficacy of two therapy regimens for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows, *J Dairy Sci*, 1994, 77(2): 453-61.
34. Pyorala SH, Pyorala EO: Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995), *J Am Vet Med Assoc*, 1998, 212(3): 407-12.
35. Pyörälä C: Treatment of mastitis during lactation, *Irish Veterinary Journal*, 2009, 62(4): 1-5.
36. Quinn PJ: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Cornwall, UK: Blackwell Science Ltd. MPG books Ltd, 2002.
37. Радиновић М, Давидов И, Ковачевић З, Стојановић Д, Галфи А, Ердџан М: Основни принципи терапије маститиса крава, *Ветеринарски журнал Републике Српске*, 2019, 19(1):105-109.
38. Рајић Савић Н, Катић В, Велебит Б: Characteristics of coagulase positive staphylococci isolated from milk in cases of subclinical mastitis, *Acta veterinaria*, 2014, 64:115-123.

39. Radostits OM., Leslie KE., Fetrow J.: Herd Health: Food Animal Production Medicine. Philadelphia, PA., Saunders, 1994, p.233.
40. Rainard P, Shultze C, Riollet D: Innate immunity of the bovine mammary gland, Veterinary Research, 2006, 37(3): 369-400.
41. Riekerink RGMO, Barkema WH, Kelton FD, Scholl TD: Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms, Journal of Dairy Science, 2008, 91(4):1366-1377.
42. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, Hay SI, Jiwakanon GJ, Kakkar M, Kariuki S, Laxminarayan R, Lubroth J, Magnusson U, Thi Ngoc P, Van Boeckel TP, Woolhouse MEJ: Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2016, 110(7): 377-380.
43. Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A, Moreillon P: *Staphylococcus aureus* Host Range and Human-Bovine Host Shift, Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(17): 5908-5915.
44. Sommehäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K: The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme, Veterinary microbiology, 2003, 96: 91-102.
45. Стојановић Д, Ковачевић З, Радиновић М, Жугић Г: Основни принципи рационалне употребе антибиотика код преживара, Зборник предавања једнодневног семинара Здравствена заштита и репродукција фармских животиња, Нови Сад, 2018, 134-142.
46. Swinkels JM, Cox P, Schukken HY, Lam MGJT: Efficacy of extended cefquinome treatment of clinical *Staphylococcus aureus* mastitis, Journal of Dairy Science, 2013, 96(8): 4983-4992.
47. Taponen S, Jantunen A, Pyörälä E, Pyörälä S: Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Acta Veterinaria Scandica, 2003, 44(1-2): 53-62.
48. Unnerstad HE, Lindberg A, Waller Persson K, Ekman T, Artursson K, Ost-Nilsson M, Bengtsson B: Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors; Veterinary Microbiology, 2009, 137(1-2): 90-97.
49. Vakanjac S, Pavlović V, Magaš V, Pavlović M, Đurić M, Maletić M, Sočo I: Investigations of efficacy of intramammary applied antimicrobials and glucocorticosteroides in the treatment of subclinical and clinical mastitis in cows, Veterinarski glasnik, 2013, 67(1-2): 15-27.
50. Van der Auwera P, Matsumoto T, Husson M: Intraphagocytic penetration of antibiotics, J Antimicrob Chemother, 1988, 22(2): 185-92.

51. Verbeke J, Piepers S, Supré K, Vlieghe De S: Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene, *Journal of Dairy Science*. 2014, 97(11): 6926-6934.
52. Yeruham I, Schimmer A, Brami Y: Epidemiological and bacteriological aspects of mastitis associated with yellow-jacket wasps (*Vespula germanica*) in dairy cattle herd, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2002, 49(10): 461–463.
53. Zhao X, Lacasse P: Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of Animal Science*, 2008, 86: 57-65.