

DOI 10.7251/VETJSR2301059H

UDK 636.2:618.19-002

Originalni naučni rad

OSJETLJIVOST BAKTERIJSKIH SOJEVA IZOLOVANIH U SLUČAJEVIMA MASTITISA KRAVA NA ANTIBIOTIKE I ETERIČNA ULJA

Sajma HUREMOVIĆ*

Javna Ustanova Veterinarski zavod Tuzlanskog kantona, Tuzla, Bosna i Hercegovina

*Korespondentni autor: Sajma Huremović, sajma.huremovic@vetzavodtk.ba

Sažetak

Mastitis je upalna reakcija vimena koju uzrokuju mikroorganizmi odnosno hemijske ili mehaničke povrede. Bakterijske mastitise uzrokuje nekoliko vrsta bakterija, koji se dijele u dvije glavne grupe: kontagiozni mastitisi uzrokovani sa *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis* i mastitisi uzrokovani ubikvitarnim bakterijama *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ili *Proteus spp.* Trenutno se umjesto upotrebe antibiotika traže nove strategije za smanjenje ovog kliničkog zdravstvenog problema. Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje osjetljivosti bakterijskih sojeva uzročnika mastitisa na antibiotike i eterična ulja origana (*Origanum compactum*, *Origanum majorana*) i timijana (*Thymus serpyllum*). Tokom ispitivanja korišteni su uzorci sekreta vimena muznih krava sa područja Kalesije i Gradačca, dobiveni mašinskim i ručnim načinom. Ispitano je ukupno 200 uzoraka mliječnih krava u različitim periodima laktacije i starosti. Kontrola mastitisa obuhvatala je određivanje broja somatskih stanica u mlijeku Kalifornija mastitis testom, odnosno brojanje somatskih stanica na Fossomatik aparatu, nakon čega su svi uzorci sa povećanim brojem somatskih stanica mikrobiološki ispitani. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može se zaključiti da postoje opravdani razlozi zbog kojih treba razmotriti upotrebu eteričnih ulja kao alternativu upotrebe antibiotika u terapiji životinja oboljelih od mastitisa.

Ključne riječi: mastitis, patogeni, antibiotici, eterična ulja.

UVOD

Mastitis je upalna reakcija tkiva vimena najčešće mikrobne etiologije. Do infekcije dolazi kada infektivni agens kroz sisni otvor prodre u mliječnu žlijezdu, počne se

umnožavati i svojim štetnim metaboličkim proizvodima oštećivati tkivo vimena. Najčešći bakterijski uzročnici mastitisa su: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*), *Streptococcus uberis*, *Echerichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), Proteus vrste (Bannerman, 2004). Kao posljedica infekcije dolazi do izlučivanja uzročnika i njihovih toksina putem mlijeka, koje dalje predstavlja opasnost po zdravlje potrošača. U borbi protiv uzročnika mastitisa primjenjuju se različite strategije uključujući redovne kontrole zdravlja vimena, profilaktičku terapiju u periodu zasušenja, vakcinaciju kao i isključivanje iz proizvodnje oboljelih grla. Kod pojave mastitisa tokom laktacije često se primjenjuje antibiotska terapija. Dugotrajnim korišćenjem jednog antimikrobnog sredstva uništavaju se osjetljivi sojevi patogenih bakterija i vrši se selekcion pritisak koji favorizuje otporne sojeve mikroorganizma i vremenom se pojavljuje fenomen rezistencije. Bakterije ispoljavaju sve veću antimikrobnu rezistenciju što predstavlja jedan od najvećih javnozdravstvenih problema koji privlači savremenu naučnu javnost (Bačić, 2009). U antimikrobnoj terapiji mastitisa mogu se koristiti razne alternativne supstance koje se karakterišu antibakterijskim dejstvom, dovodeći do spriječavanja rasta i razmnožavanja ili uništavanja uzročnika. Kod infekcija vimena mogu se u preventivne i terapijske svrhe primjenjivati eterična ulja i/ili njihove aktivne komponente. Eterična ulja koja se mogu koristiti u terapiji mastitisa mogu poticati od biljaka kao što su: korijander (*Coriandrum sativum* L.), origano (*Origanum vulgare* L.), timijan (*Thymus vulgaris* L.), ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), cimet (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), žalfija (*Salvia officinalis* L.), majčina dušica (*Thymus serpyllum*) i karanfilić (*Eugenia caryophyllata* Thunb). Kao aktivne komponente ovih eteričnih ulja izolovani su, između ostalih karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol. Kombinirana terapija konvencionalnih antibiotika i eteričnih ulja trenutno uzima sve veći zamah i predstavlja potencijalni prostor za buduća istraživanja.

Cilj istraživanja je utvrđivanje osjetljivosti bakterijskih sojeva uzročnika mastitisa na neke vrste antibiotika i eterična ulja origana (*Origanum compactum*, *Origanum majorana*) i timijana (*Thymus serpyllum*). Radi ostvarivanja cilja istraživanja postavljani su sljedeći zadaci:

- izolacija i identifikacija uzročnika supkliničkih mastitisa krava primjenom konvencionalnih bakterioloških tehnika,
 - određivanje broja somatskih stanica,
 - utvrđivanje osjetljivosti izolovanih sojeva uzročnika mastitisa prema antibioticima,
-

- испитивање antibakterijskog efekta eteričnih ulja *Origanum compactum*, *Origanum majorana* i *Thymus serpyllum* na izolovane sojeve uzročnike mastitisa,
- utvrđivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija za eterična ulja i njihovo sinergističko djelovanje.

MATERIJALI I METODE

U istraživanju su korišteni uzorci sekreta vimena muznih krava sa područja Kalesije i Gradačca, dobijeni mašinskim načinom muže. Analizirani su uzorci mlijeka uzetih od 200 mliječnih grla (po 100 uzoraka sa svakog područja).

Izolacija i identifikacija bakterijskih sojeva uzročnika mastitisa izvršena je u bakteriološkom laboratoriju Javna ustanova „Veterinarski zavod Tuzlanskog kantona“, a ispitivanje osjetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike i eterična ulja u mikrobiološkom laboratoriju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Tuzli.

Uzorci mlijeka za mikrobiološka ispitivanja uzeti su aseptično, prije redovne muže. Najprije je vime oprano mlakom vodom i sapunicom, naročito papile, i obrisano čistom krpom. Dezinfekcija vrhova papila je vršena vatom natopljenom 70% etanolom, principom „k sebi“. Prvo su dezinfikovane dalje četvrti, pa onda bliže da bi se izbegla kontaminacija već dezinfikovanih papila. Iz svake četvrti vimena istisnuta su tri mlaza mlijeka, prije nego što se pristupilo uzorkovanju. Nakon dezinfekcije, izvršeno je izmuzanje svake četvrti posebno u sterilne plastične bočice zapremine 50 ml (Slika 1). Nakon uzorkovanja, uzorci mlijeka su stavljani u ručni frižider (temperatura 4°C) i transportovani u laboratoriju na bakteriološki pregled.



Slika 1 Uzorci sekreta vimena iz oboljelih četvrti za bakteriološku analizu

Kontrola mastitisa obuhvatala je određivanje broja somatskih stanica u mlijeku Kalifornija mastitis testom (KMT) (White i sur., 2005), a zatim brojanje somatskih stanica na Fossomatik aparatu, nakon čega su svi uzročnici sa povećanim brojem somatskih stanica mikrobiološki ispitani.

Broj somatskih stanica (BSS) pokazatelj je higijenske kvalitete mlijeka i opći je indikator zdravstvenog stanja vimena. BSS direktno pokazuje stanje zdravlja mliječne žlijezde. Somatske stanice u mlijeku su porijeklom iz vimena i krvi, a najčešće su to leukociti. Za kravlje mlijeko utvrđena je gornja granica od 400.000 somatskih stanica (SS)/ml, iznad koje dolazi do pojave supkliničkog mastitisa. U mlijeku zdravih četvrti, broj somatskih stanica je manji od 200.000 u ml, a čine ih epitelne stanice i leukociti (polimorfonuklearni neutrofil, limfociti, makrofagi). Uredbom o načinu uzimanja uzoraka, razvrstavanju i obračunu cijene mlijeka (Propis, 1994) definisano je da prerađivači mlijeka mogu otkupljivati samo mlijeko koje zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom o sirovom mlijeku (Propis, 2011) i proračunom geometrijske sredine. Uzorci sa geometrijskom sredinom 400.000 BSS/ml se stavljaju van klase. Za izolaciju *S. aureus* iz uzoraka sekreta vimena krava služi krvni agar, jer omogućava porast najučestalijih bakterijskih uzročnika u aerobnim uvjetima inkubiranja. Za rutinsko zasijavanje sekreta vimena na krvni agar koriste se jednokratne plastične eze volumena 0.01 ml. Za veće volumene mogu se koristiti štapići za obriske ili pipete. Zasijane podloge inkubiraju se 24 do 48 sati pri 37°C u obrnutom položaju. Nakon inkubacije od 24 sata na krvnom agaru porastu kolonije koje su okrugle, glatke, sjajne površine, ravnih ivica, blago konveksne, pigmentisane, bijele ili krem boje, ponekad žute pa i narandžaste, promjera 1-2 mm i mogu pokazivati hemolizu. Ako nema poraslih kolonija, inkubacija zasijanog uzoraka produžava se još 24 sata. Na mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu, sa kulture porasle na krvnom agaru, vidljive su Gram pozitivne koke karakterističnog rasporeda u vidu grozdova. Karakteristične beta hemolitične kolonije sa krvnog agara precjepljuju se na selektivnu podlogu Baird-Parker agar (BPA) na kojima stafilokoke stvaraju kolonije koje su crne, konveksne i sjajne, promjera 1-1,5 mm. Bakterije iz roda *Staphylococcus* produciraju enzim katalazu, odnosno katalaza su pozitivni. Dokazivanje produkcije ovog enzima vrši se s 3-5% H₂O₂. Vrste roda *Staphylococcus* se diferenciraju prema sposobnosti da koagulišu plazmu pomoću enzima koagulaze. *S. aureus* je koagulaza pozitivan, dok su druge vrste roda *Staphylococcus* koagulaza negativne. Vezana koagulaza se određuje testom na pločici, a slobodna koagulaza testom u epruveti. Kao pozitivna i negativna kontrola korišteni su certificirani referentni sojevi (pozitivna kontrola *Staphylococcus aureus* WDCM 00034, negativna kontrola *Staphylococcus epidermidis* WDCM 00036). Pozitivan rezultat je vidljivo stvaranje grudvica unutar 10 sekundi, a kod

negativnog rezultata nema vidljivog stvaranja grudvica. Izolacija i identifikacija *Streptococcus* i *Streptococcus agalactiae* rađena je na način da se uzorak sekreta vimena inkubira na krvnoj podlozi 24 sata na 37°C, a nakon inkubacije na pločama je vidljiv porast karakterističnih kolonija. Kolonije su sitne, sivkaste ili prozračne, konveksne i kompaktne (potpune, cjelovite, zaokružene). Neki sojevi zahtijevaju za rast prisustvo ugljen dioksida. Na krvnom agaru streptokoki pokazuju hemolizu. Kolonije *Enterococcus* spp. mogu imati zonu α hemolize ili biti bez hemolize, sivkaste su, sjajne i nisu kompaktne. Kolonije koje morfološki odgovaraju streptokokima se precjepljuju na selektivnu podlogu eskulin azid agar i inkubiraju 24 sata na 37°C. Na mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu sa kulture porasle na krvnom agaru pronađeni su Gram pozitivni koki, okrugli ili ovoidni, dijametra 0,6-1 μm , raspoređeni u parovima i lancima različite dužine. Za dokazivanje *Str. agalactiae* se koristi CAMP test. Ovim testom se otkriva prisustvo CAMP faktora (Christie, Atkins and Munch Peterson) – ekstracelularni proteina koji pojačava beta hemolizu *S. aureus*. Pozitivan je kod *Str. agalactiae*. Test se izvodi povlačenjem stafilokokne kulture uzduž krvnog agara sa 10% ovčije krvi, a zatim okomito na nju zasijava se ispitivani soj streptokoka u vidu crte počevši od kraja ploče do blizu stafilokokne crte. Za izvođenje ovog testa potreban je soj *S. aureus* sa dvostrukom zonom hemolize. Nakon inkubacije na 35-37°C tokom 24 sata posmatra se da li je u blizini stafilokokne crte došlo do kopljastog pojačanja hemolize streptokoka (Maksimović i Rifatbegović, 2015). Dalja identifikacija zasnivala se na analizi potvrdnog testa za prisustvo intestinalnih enterokoka razgradnjom eskulina. Jedna tipična kolonija se subkultivirala na žuč eskulin agar i inkubirala na 44°C tokom 48 sata. Identifikacija izolata do nivoa vrste zasnivala se na bojenjem preparata po Gramu, negativnom testu katalaze i biohemijskom testu razgradnje šećera (sorbitola i arabinoze). Sterilnom ezom jedna kolonija prenesena je u epruvete u kojima su se nalazili navedeni šećeri, a potom su epruvete stavljane na inkubaciju preko noći na temperaturi od 37°C. Pozitivna reakcija se očitavala u vidu promjene boje šećera iz ružičaste u crvenu, uz uočljivo замуćenje, što je glavni identifikacioni faktor kojim je moguće razlikovati dvije vrste, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. *Enterococcus faecalis* ima mogućnost razgradnje sorbitola, ali ne razgrađuje arabinozu, dok *Enterococcus faecium* razgrađuje arabinozu, ali ne razgrađuje sorbitol. Izolacija i identifikacija *E. coli* iz uzoraka sekreta vimena također je izvođena na način da se uzorak zasijava i inkubira na krvnoj podlozi 24 sata na 37°C, a nakon inkubacije na pločama je porast velikih, glatkih, sjajnih i okruglih kolonija. Karakteristične kolonije se presijavaju na MacConkey agar. Na MacConkey agaru kolonije mijenjaju boju u ružičastu uslijed fermentacije laktoze. Identifikacijom mikroskopskim preparatom bojenim po

Gramu vidljive su Gram negativne bakterije oblika pravih štapića, raspoređene pojedinačno ili u parovima. Za dalju identifikaciju korišten je API 20 E test (BioMérieux, 2002) koji je standardizirani sistem identifikacije *Enterobacteriaceae* i drugih Gram negativnih bakterija. API 20 E traka sastoji se od 20 mikro epruveta koje sadrže dehidrirane supstrate. Ovi testovi su inokulirani bakterijskom suspenzijom koja rekonstituira medij. Tokom inkubacije dolazi do promjene u boji koje se otkrivaju spontano ili dodatkom reagensa. Reakcije se iščitavaju u skladu s priloženom tabelom, a identifikacija se vrši pozivanjem na Analitički indeks profila ili pomoću softvera za identifikaciju. Test oksidaze se mora izvesti u skladu s uputama proizvođača. Rezultat treba zabilježiti na rezultatskom listu jer je to sastavni dio završnog profila (Schuster, 1997). Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike i eterična ulja vršeno je na tri bakterijska izolata, a koristila se Disk difuziona metoda prema CLSI M02-A11 standardu (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012) uz upotrebu antibiogram diskova (Conda pronadisa, Micro & Molecular Biology, Spain): Amoxicillin/clavulanic acid 30 μ g, Amoxicillin 30 μ g, Cephalexin 30 μ g, Doxycycline 30 μ g, Enrofloxacin 10 μ g, Gentamicin 30 μ g, Lincomycin 30 μ g, Oxytetracycline 30 μ g, Penicillin 10 μ g, Trimethoprim/sulphamethoxazol 25 μ g. Interpretacija kategorija vršila se prema istom standardu (CLSI, 2014). Disk difuziona metoda zbog svoje se jednostavnosti već dugi niz godina rutinski koristi za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. Inokulum se priprema razblaživanjem 18-24-satne čiste bakterijske kulture. Ezom se pikira 4-5 kolonija i prenese u 5 ml fiziološkog rastvora. Suspenzija se vorteksira, a potom se gustina suspenzije (turbiditet) podešava poređenjem sa 0,5 McFarland standardom. Inokulum se zasijava brisom, ezom ili staklenim štapićem ravnomjerno na površinu podloge (Bauer, 1966). Poslije zasijavanja inokuluma poželjno je da podloga stoji 10-15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se površina osušila. Postavljanje diskova izvodi se dispenzerom ili sterilnom pincetom. Razmak između diskova je najmanje 3 cm, a rastojanje od ivice posude najmanje 1cm. Na ploču prečnika 10 cm nanosi se maksimalno 6 diskova. Zasijane podloge sa postavljenim diskovima antibiotika se inkubiraju na odgovarajućoj temperaturi u aerobnim, mikroaerofilnim ili anaerobnim uslovima, zavisno od vrste bakterija koje se ispituju, a ploče su okrenute poklopcem na gore. Budući da debljina i sastav hranjive podloge mogu uticati na rezultate, postupak se izvodi u skladu s načelima koja ujednačuju metodologiju izvođenja. Nakon inkubacije na 37°C tokom 24 sata, mjeračem sa milimetarskom podjelom se mjeri prečnik zone inhibicije rasta ispitivanog bakterijskog soja za pojedine antibiotike. Prema CLSI M02-A11 standardu, na osnovu izmjerenih vrijednosti prečnika zone inhibicije rasta, vrši se procjena stepena osjetljivosti i svrstavanje u jednu od tri kategorije: S (sensitive) – osjetljiva

- infekcija izazvana osjetljivim sojem liječi se uobičajenim (optimalnim) terapijskim dozama.; I- (intermediate) – umjereno osjetljiva - infekcija izazvana umjereno osjetljivim sojem liječi se višim terapijskim dozama antibiotika; R-(resistant) – otporna - infekcija izazvana rezistentnim sojem ne može se liječiti ispitivanim antibioticima. Za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti bakterija na tri eterična ulja *Thymus serpyllum*, *Origanum majorana* i *Origanum compactum* (Fadli, 2012) korišteno je po 10 izolata koagulaza negativnih stafilokoka (KNS), *Enterococcus faecalis* i *E. coli*. Bakterije su kultivirane na Baird-Parker agar, Slanetz Bartley agar i MacConkey agaru preko noći, za dobijanje pojedinačnih kolonija. Zatim su kolonije suspendovane u 0,9% sterilnoj fiziološkoj otopini da bi se postigla zamućenost jednaka 0,5 McFarlandovom standardu (10^8 CFU/ml). Nakon toga Mueller Hinton agar je inokuliran bakterijskom suspenzijom. Na svaku ploču nanoseno je 50 μ l za svako eterično ulje u bunarčice promjera 6mm. Ploče su inkubirane 24 sata na 35°C. Interpretacija rezultata provedena je mjerenjem promjera zona inhibicije u milimetrima. Kriteriji za procjenu antimikrobne osjetljivosti eteričnih ulja predviđaju da zona inhibicije manja od 10 mm ukazuje na neosjetljivost i otpornost bakterija na eterično ulje, 10 do 15 mm ukazuje na slabo antimikrobno djelovanje ulja, 16 do 20 mm na umjereno antimikrobno djelovanje i zona od 20 mm na naglašeno antimikrobno djelovanje. Mikrodilucioni test u bujonu (MIC) i određivanje minimalne baktericidne koncentracije antimikrobnih supstanci (MBC) vršilo se prema standardu (Lambert, 2001). MBC se izvodio nakon određivanja MIC vrijednosti, presijavanjem bakterija iz bazenčića mikrotitracione ploče na Mueller Hinton agar i to kako iz bazenčića MIC vrijednosti tako i iz bazenčića četiri naredne više koncentracije. Difuzioni test se koristio i za određivanje antimikrobnog efekta eteričnih ulja origana i timusa na bakterijske izolate (Choi i sur., 2012). Mikrodilucionom metodom se određivala minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) koja predstavlja najnižu testiranu koncentraciju eteričnog ulja na kojoj nema vidljivog rasta. Ova metoda se izvodi na mikrotitar pločama koje sadrže 96 bunarčića korištenjem MH bujona, bakterijske suspenzije i različitih koncentracija eteričnog ulja. Očitavanje minimalne inhibitorne koncentracije omogućila je upotreba indikatorske supstance 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC solucija) koja uslijed jasne promjene boje, izazvane promjenom pH vrijednosti tokom rasta kulture, olakšava očitavanje dobijenih rezultata. Sinergistički efekat između eteričnih ulja na bakterijske izolate uzročnike mastitisa krava određivao se checkerboard metodom. Ovom metodom određuje se interakcija i jačina dvije ispitivane supstance kada se koriste istovremeno, odnosno potencijalna moć dva eterična ulja kao i eteričnih ulja i antibiotika u usporedbi sa njihovim pojedinačnim učinkom. Dakle, ovom metodom određuje se interakcija i jačina dvije testne

supstance (A i B) kada se koriste istovremeno, što se izražava kao FIC vrijednost (frakcionarna inhibitorna koncentracija). Antibiotik je u ovom slučaju označen kao supstanca A, dok je eterično ulje predstavljalo supstancu B. Na osnovu prethodno određenih MIK vrijednosti, napravljene su serije standardnih razblaženja supstanci A i B u cilju ispitivanja njihove kombinovane interakcije (početne koncentracije za pripremu razblaženja su MIK vrijednosti testiranih supstanci i opadale su horizontalno u mikrotitar ploči za antibiotik, a vertikalno za eterično ulje). Nakon pripreme serijskih razblaženja antimikrobnih agenasa u mikrotitar pločama, pripremljene su i dodate bakterijske suspenzije testiranih sojeva na isti način kao i u testovima za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pojedinačnih agenasa. U mikrotitar ploču sa 96 bunarčića, dodavano je određenim redoslijedom po 90 μL inokuliranog MH bujona i 10 μL serijskog razblaženja kombinacije supstanci A i B. Konačni volumen u svakom bunarčiću bio je 100 μL , krajnja gustoća bakterijskih stanica je 10^6 CFU/ml. Mikrotitar ploče su inkubirane preko noći na 35 °C, a rezultati su očitavani na već opisan način uz dodatak TTC. Najmanja koncentracija agenasa u kombinaciji potrebna da spriječi pojavu crvene boje smatrana je vrijednošću MIK. Dobijene MIK vrijednosti testiranih kombinacija su korištene za određivanje FIC indeksa i interpretaciju tipa interakcije između antimikrobnih agenasa. U uzorcima mlijeka analizirali smo i ukupan broj somatskih stanica instrumentalnom metodom brojanja sa aparatom *Fossomatic* (*Fossomatic* brojanje).

REZULTATI

Prema KMT na području Kalesije identifikovano je neispravnih 41 od ukupno 100 obrađenih uzoraka (25 ih je bilo u tragovima, slabo pozitivnih je bilo 23, a umjereno pozitivnih 17, jako pozitivnih 1). Na području Kalesije nije bilo slučajeva kliničkog mastitisa. S obzirom da je KMT orijentacijski postupak kojim se neizravno može dobiti uvid u broj somatskih stanica, zanimala nas je usporedba rezultata dobivenih postupkom KMT i pomoću *Fossomatic* brojanja.

U Tabeli 1 dat je uporedni prikaz rezultata KMT testa i *Fossomatic* brojanja za područje Kalesije.

Табела 1 Упоредни приказ резултата BSS KMT теста и инструменталне методе – подручје Калесија

Процјена резултата инструментална метода	Број узорака	Средња вриједност BSS	Процјена реакције KMT	Број узорака	Средња вриједност BSS
негативан (-)	47	119.124	негативно (-)	34	241.778
слабо позитиван (+)	17	386.273	у траговима (+/-)	25	337.561
позитиван (++)	19	1.259.682	слабо позитивно (+)	23	906.385
јакo позитиван (+++)	17	2.832.250	умјерено позитивно (++)	17	1.851.941
			јакo позитивно (+++)	1	5.971.000
			клинички маститис	0	0

Геометријска средина код негативних узорака према инструменталној методи на подручју Калесије износила је 119.124 за 47 узорака, док је према KMT иста износила 241.778 за 34 узорака.

У Табели 2 дат је упоредни приказ резултата KMT теста и *Fossomatic* бројања за подручје Градачка.

Табела 2 Упоредни приказ резултата BSS KMT теста и инструменталне методе – подручје Градачка

Процјена резултата инструментална метода	Број узорака	Средња вриједност	Процјена реакције KMT	Број узорака	Средња вриједност BSS
негативан (-)	49	205.846	негативно (-)	35	125.090
слабо позитиван (+)	7	373.333	у траговима (+/-)	19	267.231
позитиван (++)	21	938.500	слабо позитивно (+)	16	841.263
Јакo позитиван (+++)	23	8.422.000	умјерено позитивно (++)	27	1.447.867
			јакo позитивно (+++)	2	6.474.000
			клинички маститис	1	6.290.000

Geometrijska sredina (srednja vrijednost) broja somatskih stanica na području Gradačca, kod negativnih uzoraka, prema KMT iznosila je 125.090 za 35 uzoraka, dok je kod instrumentalne metode iznosila 205.846 za 49 uzoraka. U skladu s Pravilnikom o sirovom mlijeku (Propis, 2011) uzorci su obrađeni instrumentalnom metodom, a sa geometrijskom sredinom 400.000 BSS/ml i više stavljeni su van klase i takvo mlijeko je povučeno iz otkupa.

KNS kao uzročnik mastitisa identifikovan je u 8,5% uzoraka (17/200) (Tabela 3).

Tabela 3 Tabela prikaz KNS izolovanih iz sekreta vimena krava

Uzročnik	%izolata sa područja Kalesije		%izolata sa područja Gradačca
KNS	8		9

Enterococcus faecalis kao uzročnik mastitisa identifikovan je u 5% uzoraka (10/200) (Tabela 4).

Tabela 4 Tabela prikaz *Enterococcus faecalis* izolovanih iz sekreta vimena krava

Uzročnik	%izolata sa područja Kalesije		%izolata sa područja Gradačca
<i>Enterococcus faecalis</i>	6		4

E. coli kao uzročnik mastitisa identifikovan je u 26% uzoraka (52/200) (Tabela 5).

Tabela 5 Tabela prikaz *E. coli* izolovanih iz sekreta vimena krava

Uzročnik	%izolata sa područja Kalesije		%izolata sa područja Gradačca
<i>E. coli</i>	22		30

Iz rezultata brojanja somatskih stanica instrumentalnom metodom *Fossomatic* aparatom i izolacije uzročnika (Tabela 6) jasno se vidi da su uzorci sa povećanim BSS također i prema bakteriološkom nalazu bili neispravni, te da su bakterije razlog povećanja istih.

Tabela 6 Uporedni prikaz rezultata somatskih stanica instrumentalnom metodom i izolovanih uzročnika mastitisa

Područje Gradačca		Područje Kalesije	
% neispravnih uzoraka utvrđenih instrumentalnom metodom brojanja somatskih stanica	Ukupan broj izolovanih uzročnika	% neispravnih uzoraka utvrđenih instrumentalnom metodom brojanja somatskih stanica	Ukupan broj izolovanih uzročnika
44	43	36	36

Za ispitivanje profila osjetljivosti izolata Koagulaza negativnih stafilokoka, *Enterococcus faecalis* i *E. coli* na antibiotike analizirano je po 10 izolata od svake vrste. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 7, 8 i 9. Interpretacija rezultata provedena je mjerenjem promjera zona inhibicije u milimetrima.

Tabela 7 Osjetljivost izolata KNS na antibiotike

KNS	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
2.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
3.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
5.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S
6.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
7.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
8.	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
9.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
10.	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S

R – rezistencija na antibiotik; S – osjetljivost; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P– penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Svih deset izolata KNS pokazalo je osjetljivost na AMC i ENR, četiri izolata KNS bila su osjetljiva na penicilin 10µg, dok je ostalih šest izolata bilo rezistentno. Tri izolata bilo je osjetljivo na TMP, dok je sedam ostalih izolata bilo rezistentno

na ovaj antibiotik. 100% rezistentnost KNS je pokazao na AX, CEF, DO, GM, L i T. Rezistencija na penicilin ustanovljena kod 6 izolata (60%), a na TMP kod 7 izolata (70%). Najveća rezistencija (100%) *Enterococcus faecalis* ustanovljena je na antibiotike AMC, AX, CEF, ENR, TMP, zatim na linkomicin (80%) i penicilin (60%). Najveća osjetljivost (100%) *Enterococcus faecalis* ustanovljena je na antibiotike doxycycline i gentamicin, što je prikazano u Tabeli 8.

Tabela 8 Osjetljivost izolata *Enterococcus faecalis* na antibiotike

<i>Enterococcus faecalis</i>	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
2.	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R
3.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
4.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
5.	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
6.	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R
7.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
8.	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
9.	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R
10.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R

R – rezistencija na antibiotik; S – osjetljivost; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P – penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Ispitivanjem osjetljivosti izolata *E. coli* na antibiotike ustanovljena je 100% osjetljivost na AMC, AX i penicilin, zatim na ENR (60%). Najveća rezistencija *E. coli* na antibiotike je ustanovljena na CEF, DO, GM, L, T, TMP, što je prikazano u Tabeli 9.

Табела 9 Осјетљивост изолата *E. coli* на антибиотике

<i>E. coli</i>	AMC	AX	CEF	DO	ENR	GM	L	T	P	TMP
1.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
2.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
3.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
4.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
5.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
6.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
7.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
8.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
9.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R
10.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R

R – резистенција на антибиотик; S – осјетљивост; AMC - amoxicillin/clavulanic acid; AX – amoxicillin; CEF – cephalixin; DO – doxycycline; ENR – enrofloxacin; GM – gentamicin; L – lincomycin; T – oxytetracycline; P – penicillin; TMP - trimethoprim/sulphamethoxazol

Профили осјетљивости изолата KNS на етерична улја одређени су диск-дифузионом методом и приказани у Табели 10. Највећи антимикробни потенцијал на изолате KNS имају етерична улја *Origanum compactum* и *Thymus serpyllum*. Свих десет изолата је показало осјетљивост на ова етерична улја. Четири изолата су била осјетљива и шест изолата умјерено осјетљива на етерично улје *Origanum majorana*.

Табела 10 Осјетљивост изолата KNS на етерична улја

KNS	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	S	S
2.	S	I	S
3.	S	I	S
4.	S	I	S
5.	S	I	S
6.	S	S	S
7.	S	I	S
8.	S	I	S
9.	S	S	S
10.	S	S	S

R – резистенција; S – осјетљивост; I (intermediate) – умјерено осјетљива

Profil osjetljivosti *Enterococcus faecalis* na eterična ulja disk difuzionom metodom prikazan je u Tabeli 11.

Tabela 11 Osjetljivost izolata *Enterococcus faecalis* na eterična ulja

<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	R	S
2.	R	R	I
3.	S	R	S
4.	S	R	S
5.	S	R	I
6.	S	R	S
7.	S	R	S
8.	S	R	S
9.	S	R	S
10.	S	R	S

R – rezistencija; S – osjetljivost; I (intermediate) – umjereno osjetljiva

Kod izolata *Enterococcus faecalis* drugi uzorak je pokazao rezistentnost na eterična ulja *Origanum compactum* i *Origanum majorana*, dok su svi ostali izolati pokazali rezistentnost samo na djelovanje eteričnog ulja *Origanum majorana*. Osam izolata *Enterococcus faecalis* bili su osjetljivi na djelovanje eteričnog ulja *Thymus serpyllum*, dok su dva izolata pokazala umjerenu osjetljivost. *Origanum compactum* je imao bolje antimikrobno djelovanje na izolate *Enterococcus faecalis* od eteričnog ulja *Thymus serpyllum*.

Profil osjetljivosti *E. coli* na eterična ulja disk-difuzionom metodom prikazan je u Tabeli 12. Najveći antimikrobni potencijal na izolate *E. coli* imala su eterična ulja *Origanum compactum* i *Thymus serpyllum*, dok je eterično ulje *Origanum majorana* imalo umjereno osjetljivo dejstvo na 6, a rezistentno na 4 izolata (Tabela 12).

Табела 12 Осјетљивост изолата *E. coli* на етерична улја

<i>E. coli</i>	<i>O. compactum</i>	<i>O. majorana</i>	<i>T. serpyllum</i>
1.	S	R	S
2.	S	I	S
3.	S	R	S
4.	S	R	S
5.	S	I	S
6.	S	R	S
7.	S	I	S
8.	S	I	S
9.	S	I	S
10.	S	I	S

R – резистенција; S – осјетљивост; I (intermediate) – умјерено осјетљива

У овом раду одређене су минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне бактерицидне концентрације (МБК) за три врсте етеричних улја *O. compactum*, *O. majorana* и *T. serpyllum* тестираних на три изолата и то *E. coli* изолат бр. 10, КНС изолат 5 и *Enterococcus faecalis* изолат 10. Сви 10 изолата *E. coli* и КНС показали су осјетљивост на све три врсте етеричних улја *O. compactum*, *O. majorana* и *T. serpyllum*. Међутим свих 10 изолата *Enterococcus faecalis* било је резистентно на етерично улје *O. majorana*, те због тога минималну инхибиторну и бактерицидну концентрацију није било могуће одредити. У Табели 13. су приказане МИК и МБК тестираних етеричних улја.

Табела 13 МИК и МБК етеричних улја тестираних на 3 изолата *E. coli*, КНС и *Enterococcus faecalis*

Етерично улје	<i>O. compactum</i>		<i>O. majorana</i>		<i>T. serpyllum</i>	
	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)
<i>E. coli</i> изолат 10	12	21	28,6	43	26	39
КНС изолат 5	14	21	17,2	43	19,5	39
<i>Enterococcus faecalis</i> изолат 10	10,5	16,8	R	R	17,2	43

Iz priloženih rezultata može se uočiti da eterično ulje *O. compactum* ima najniže minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije, te je identifikovano kao ulje sa najjačom antimikrobnom aktivnošću na sva tri testirana izolata. MIK vrijednosti za *O. compactum* se kreću od 10,5 mg/ml do 14 mg/ml, za razliku od *O. majorana* kod kojeg je najniža MIK vrijednost 17,2 mg/ml i *T. serpyllum* koji ima najnižu MIK vrijednost također od 17,2 mg/ml.

Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za antibiotik amoxicilin/clavulanic acid su pokazale najveću antimikrobnu aktivnost na testirane izolate. Svih 10 izolata *E. coli* i svih 10 izolata KNS bilo je osjetljivo na antibiotik amoxicilin/clavulanic acid, te je zbog toga ovaj antibiotik izabran za dalje testiranje. Međutim svih 10 izolata *Enterococcus faecalis* pokazalo je rezistenciju na ovaj antibiotik, te na ovom izolatu nije vršeno određivanje MIK i MBK vrijednosti navedenog antibiotika. MIK i MBK vrijednosti amoxicilin/clavulanic acid testirane su na dva izolata, a to su *E. coli* izolat 10 i KNS izolat 5. Iz priloženih rezultata može se uočiti da antibiotik amoxicilin/clavulanic acid pokazuje znatno niže MIK i MBK vrijednosti u odnosu na eterična ulja. Takav rezultat se i očekivao s obzirom da je ovaj antibiotik poznat kao izrazito jako antibakterijsko sredstvo. Međutim ne treba zanemariti antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja, te ih treba uzeti u razmatranje kao moguća alternativna antibakterijska sredstva, jer je dokazano da izrazito dobro djeluju na izolate testirane u ovom radu. Ukupno 3 izolata (*E. coli* izolat 10, KNS izolat 5 i *Enterococcus faecalis* izolat 10) analizirano je radi utvrđivanja sinergističkog efekta eteričnih ulja i antibiotika (FIC). Interakcije između antimikrobnih agenasa u kombinaciji određene su nakon određivanja MIK vrijednosti izračunavanjem indeksa fracione inhibitorne koncentracije (FICI) za svaku kombinaciju antimikrobnih agenasa (*O. compactum* + *O. majorana*, *O. compactum* + *T. serpyllum*, *O. majorana* + *T. serpyllum*) prema sljedećoj formuli:

FIC antimikrobnog agensa A = MIC agensa A u kombinaciji / MIC samog agensa A

FIC antimikrobnog agensa B = MIC agensa B u kombinaciji / MIC samog agensa B

FICI (FIC indeks) = FIC agensa A + FIC agensa B

Dobijene vrijednosti FIC indeksa su interpretirane na sljedeći način:

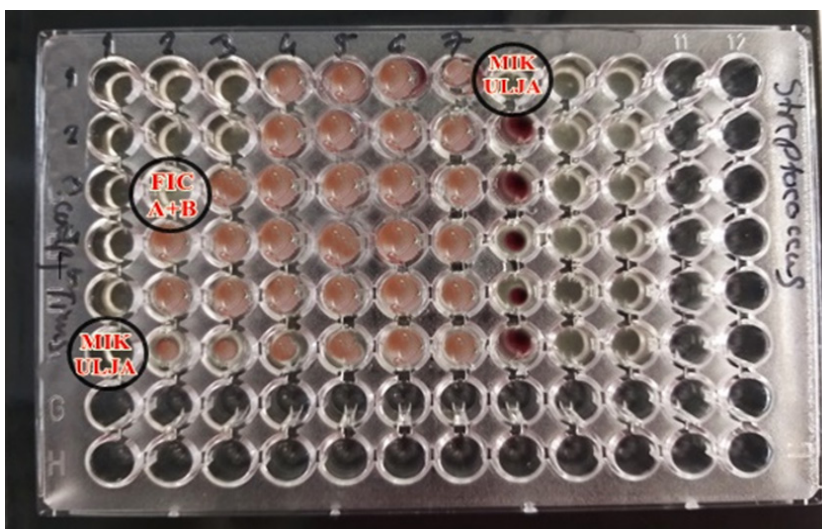
- sinergistički efekat agenasa $FICI \leq 0,5$
- aditivan efekat agenasa $0,5 < FICI \leq 1,0$
- indiferentan efekat agenasa $1,0 < FICI \leq 4,0$
- antagonistički efekat agenasa $FICI > 4,0$ (62).

Svi eksperimenti su izvedeni u dva nezavisna ponavljanja. Dobiveni rezultati predstavljeni su u Tabeli 14 i na Slici 2.

Табела 14 Синергистички ефекат између етерићних улја

Изолати	<i>O. compactum</i> + <i>O. majorana</i>		<i>O. compactum</i> + <i>T. serpyllum</i>		<i>O. majorana</i> + <i>T. serpyllum</i>	
	FIC	Ефекат	FIC	Ефекат	FIC	Ефекат
<i>E. coli</i> изолат 10	0,31	SINERGIZAM	0,13	SINERGIZAM	0,18	SINERGIZAM
<i>KNS</i> изолат 5	0,18	SINERGIZAM	0,21	SINERGIZAM	0,20	SINERGIZAM
<i>Enterococcus faecalis</i> изолат 10	1	INDIFERENTAN	0,16	SINERGIZAM	1	INDIFERENTAN

FIC – Фракциона инхибиторна зона



Слика 2 Синергистичка интеракција између етерићних улја *O. compactum* и *T. serpyllum* идентифицирана на изолату *Enterococcus faecalis* бр. 10. FIC индекс 0,16.

Сва три етерићна улја (*O. compactum*, *O. majorana* и *T. serpyllum*) тестирана на *E. coli* изолат 10, *KNS* изолат 5, *Enterococcus faecalis* изолат 10 показала су међусобну интеракцију означену као синергизам. Комбинације сва три етерићна улја нису прелазиле FIC вредности веће од 0,5, при чему су интеракције ових етерићних улја означене као синергистичке, што значи да поједине компоненте једног етерићног улја

znatno pojačavaju efekat drugog eteričnog ulja, te daju zajednički pozitivni efekat. Izuzetak je izolat *Enterococcus faecalis* 10, kod kojeg je kombinacija eteričnog ulja *O. compactum* sa *O. majorana*, i kombinacija *O. majorana* sa *T. serpyllum* identificirana kao indiferentna. Kako je ranije navedeno, ovaj soj je bio rezistentan na eterično ulje *O. majorana*, te mješavina ovog ulja sa druga dva (*O. compactum* ili *T. serpyllum*) nije dala pozitivnu interakciju između ulja. Efekat ove kombinacije je indiferentan, što znači da *O. majorana*, bez obzira što je u kombinaciji sa nekim drugim uljem, ne pokazuje antimikrobno djelovanje na ovaj izolat.

DISKUSIJA

Mastitis je najčešća bolest mliječnih krava i ima dobro prepoznate štetne efekte na dobrobit životinja i profitabilnost farmi mliječnih proizvoda. Potpunije razumijevanje mastitisa nije bilo moguće sve dok se nije razvio mikroskop, koji je omogućio otkrivanje mikroorganizama koji su primarni etiološki agensi. Početna briga oko mastitisa temeljila se na javnom zdravlju i bila je usmjerena na smanjenje broja bakterija u sirovom mlijeku (Choi i sur., 2012). Razvoj pouzdanih testova za otkrivanje mastitisa je prioritet za istraživače, kojim žele osigurati javnu sigurnost, proizvoditi visokokvalitetne mliječne proizvode i imati praktična sredstva za upravljanje kravama oboljelim od mastitisa. Metode detekcije uključuju direktno mikroskopsko ispitivanje, brojanje somatskih stanica u mlijeku i izolaciju uzročnika (Adkins, 2017), čime smo se vodili i mi u našem istraživanju.

Broj somatskih stanica je dobar pokazatelj vjerovatnosti infekcije. Što je BSS viši, veća je vjerovatnost da su vime ili pojedine četvrti inficirane. Uredbom o načinu uzimanja uzoraka, razvrstavanju i obračunu cijene mlijeka (Propis, 1994) definisano je da prerađivači mlijeka u Bosni i Hercegovini mogu otkupljivati samo mlijeko koje zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom o sirovom mlijeku (Propis, 2011). Klasiranje sirovog mlijeka na prostorima Bosne i Hercegovine vrši se na osnovu izračunate geometrijske sredine za somatske stanice za posljednja tri mjeseca, a za mikroorganizme za posljednja dva mjeseca. Uzorci sa geometrijskom sredinom 400.000 BSS/ml se stavljaju van klase. Takvo mlijeko se povlači iz otkupa, a goveda se nakon analize sekreta vimena terapistiraju antibioticima. Nakon provedene terapije i karence ponovo se analizira mlijeko na BSS i prisustvo antibiotika. Ukoliko je vrijednost nakon ponovljene analize manja od 400.000 BSS/ml mlijeka, ono se ponovo vraća u klasu i otkup. Ukupno 44 od 100 obrađenih uzoraka područja Gradačca u našem istraživanju instrumentalnom metodom brojanja somatskih stanica, a sa vrijednosti geometrijske sredine 400.000 BSS/ml i više stavljeni su van klase i takvo mlijeko je povučeno iz otkupa. Sa područja Kalesije je 36 uzoraka od ukupno 100 obrađenih uzoraka instrumentalnom metodom brojanja somatskih

stanica, a sa vrijednošću geometrijske sredine 400.000 BSS/ml i više, stavljeno van klase i takvo mlijeko je povučeno iz otkupa.

U svom istraživanju Murphy (1947) je primijetio da više od 20 vrsta bakterija može uzrokovati mastitis kod krava, a najmanje 99% tih infekcija uzrokuju *Str. agalactiae*, drugi streptokoki, stafilocoki i bacili (uključujući koliformne bakterije, *Pseudomonas* spp. itd.). Svoje istraživanje Eberhart (, 1977) je usmjerio ka istraživanju koliformnih bakterija kao uzročnika mastitisa. Objava njegovog istraživanja nagovijestila je svijest o rastućoj važnosti mastitisa uzrokovanog oportunističkim organizmima iz okoliša. U istraživanju koje je rađeno 2017. godine u Zeničkoj regiji (Bosna i Hercegovina), najčešći uzročnici mastitisa su bili koagulaza negativni stafilocoki u 13,04% uzoraka, *Klebsiella pneumoniae* u 13,04% uzoraka, *Enterococcus* spp. u 8,70% uzoraka, *E. coli* u 8,70 uzoraka, *Enterobacter*, *Serratia* spp. i *Yersinia enterocolitoca* u 4,35% uzoraka (Burović, 2020).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali visok procenat bakterijskih uzročnika mastitisa. Uzročnici mastitisa utvrđeni su kod 43% uzoraka sa područja Gradačca i 36% uzoraka sa područja Kalesije. Rezultati identifikacije izolata pokazali su da se 8,5% izolata odlikovalo osobinama karakterističnim za KNS, *Enterococcus faecalis* 5%, a osobinama karakterističnim za *E. coli* se odlikovalo 26%. Ovi rezultati upućuju da su uzročnici mastitisa oportunističke bakterije iz okoliša. Iz rezultata brojanja somatskih stanica instrumentalnom metodom *Fossomatic* aparatom i izolacije uzročnika jasno se vidi da su uzorci sa povećanim BSS također i prema mikrobiološkim pokazateljima bili neispravni, te da su bakterije razlog povećanja istih.

Bakterijski izolati kliničkog mastitisa su uglavnom osjetljivi na antibiotike koji se koriste u terapiji, ali zbog sve većeg selektivnog pritiska zbog nekontrolisane upotrebe antibiotika u veterinarskoj medicini, procenat rezistentnih sojeva uzročnika mastitisa je u stalnom porastu. Dodatna pažnja treba biti usmjerena na upravljanje stadom, s posebnim naglaskom na higijenu. Upotreba bakterijske izolacije i ispitivanja antimikrobne osjetljivosti su ipak od izuzetnog značenja za izbor tretmana i nadzor antimikrobne rezistencije. Koagulaza negativni stafilocoki kod nas su izolirani u 8,5% slučajeva. Oni su najčešći izolat mastitisa goveda u mnogim zemljama i opisani su kao novi patogeni mastitisa. Na osnovu sadašnjeg znanja, teško je utvrditi ponašaju li se koagulaza negativni stafilocoki kao zarazni ili okolišni patogeni (Petrović, 2006). Pitkälä i sur. (2004) su pokazali da je *Enterococcus* spp. osjetljiv na penicilin i ampicilin, a studija Lambert i sur. (2001) pokazala je osjetljivost na ampicilin i otpornost na tetraciklin, dok su svi naši izolati *Enterococcus faecalis* pokazali osjetljivost za doxycycline i gentamicin, a potpunu rezistenciju na amoxicillin /clavulanic acid.

U novije vrijeme brojni autori su se bavili i proučavanjem efikasnih alternativa

antibioticima u liječenju mastitisa kod krava. U tom smislu eterična ulja su se pokazala sigurnom alternativom, jer su nakon dužeg izlaganja pokazala dobre antimikrobne karakteristike (Lambert i sur., 2001). Prethodna istraživanja su pokazala kako eterično ulje origana ima dobra antimikrobna svojstva kod svih *Staphylococcus* vrsta koje su bile rezistentne na antibiotike, te kod *E. coli* koja je bila rezistentna na više lijekova u liječenju mastitisa kod krava. Antibakterijski mehanizam eteričnog ulja origana potiče povećanje propusnosti bakterijske membrane, što dalje utiče na homeostazu pH i ravnotežu anorganskih iona. Fenolni spojevi eteričnog ulja origana inhibiraju rast bakterija mijenjanjem površine bakterijskih stanica, što može inhibirati prijanjanje bakterija na epitelne stanice vimena. Postoji mnogo studija u svijetu za procjenu antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja na uzročnike mastitisa, a za mnoga eterična ulja i njihove komponente utvrđivane su i minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije.

Prema istraživanju Choi i sur. (2012), organo eterično ulje koje se ubrizgavalo u upaljene četvrtine vimena dva puta dnevno tokom 3 dana u pojedinačnoj i dvostrukoj dozi dovelo je do poboljšanja stanja vimena. BSS se značajno smanjio u usporedbi s onima prije liječenja, a također *S. aureus* i *E. coli* nisu otkriveni u mlijeku četvrtog dana nakon tretmana. U literaturi postoji mali broj podataka o uticaju eteričnih ulja kod terapije mastitisa goveda u Bosni i Hercegovini. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da najveći antimikrobni potencijal na izolate KNS, uzročnika mastitisa, imaju eterična ulja *Origanum compactum* i *Thymus serpyllum*, dok su ovi izolati pokazali umjerenu osjetljivost na eterično ulje *Origanum majorana*. Također eterično ulje *Origanum compactum* je ispoljilo visok antimikrobni učinak na izolate *Enterococcus faecalis* i *E. coli*, a eterično ulje *Origanum majorana* imalo je umjereno osjetljivo dejstvo. U istraživanjima u kojima se poredi antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja sa antibioticima, vrijednosti MIC aktivnih komponenti eteričnih ulja višestruko prevazilaze MIC antibiotika. Također iz rezultata našeg istraživanja može se uočiti da antibiotik amoxicillin/clavulanic acid pokazuje znatno niže MIK i MBK vrijednosti u odnosu na eterična ulja. Takav rezultat se i očekivao s obzirom da je ovaj antibiotik poznat kao izrazito jako antibakterijsko sredstvo. Međutim ne treba zanemariti antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja, te ih treba uzeti u razmatranje kao moguća alternativna antibakterijska sredstva, jer je dokazano da imaju izrazito visok antimikrobni potencijal na izolate testirane u ovom radu.

Mnoga eterična ulja imaju značajne antibakterijske, protugljivične i protuupalne učinke. Neke od njihovih glavnih komponenata, poput terpinen-4-ol, djeluju inhibirajući proupalnu ekspresiju citokina, stimulirajući proizvodnju protuupalnih citokina. Takva se opažanja mogu iskoristiti za poticanje bioterapije protiv mastitisa. Upotreba sintetičkih antibiotika sve se više obeshrabruje, jer njihova

присутност у млијеку може имати потенцијалне послједице на здравље становништва и пољопривредно-прехранбени ланец (Souza и sur., 2013).

ZAKLJUČAK

На основу резултата испитивања изведени су сљједићи закључци:

1. Из резултата бројања соматских станца инструменталном методом *Fossomatic* апаратом (40% неисправних узорака) и изолације узрочника (79 идентификованих узрочника) јасно се види да су узорци са повећаним BSS такођер и према микробиолошким показатељима били неисправни, те да су бактерије разлог повећања истих. На основу наших резултата, а шодно Правилнику о сировом млијеку, укупно 40% узорака млијека било је ван класе и повучено је из окупљања, а затим су оболјела млијечна грла адекватно третирана антибиотикима.
2. Испитивањем осјетљивости изолата на антибиотике, највећа резистенција код KNS забилјежена је на антибиотик амoxicillin 30 μ g, cephalixin 30 μ g, doxycycline 30 μ g, gentamicin 30 μ g, lincomycin 30 μ g и oxytetracycline 30 μ g, док је највећа осјетљивост забилјежена на амoxicillin/clavulanic acid 30 μ g и enrofloxacin 10 μ g. Највећа резистенција на антибиотике изолата *Enterococcus faecalis* забилјежена је на амoxicillin/clavulanic acid 30 μ g, amoxicillin 30 μ g, cephalixin 30 μ g, enrofloxacin 10 μ g, trimethoprim/sulphamethoxazol 25 μ g. Осјетљивост код свих изолата забилјежена је на антибиотике doxycycline 30 μ g и gentamicin 30 μ g. Испитивањем осјетљивости изолата *E. coli* на антибиотике установљена је осјетљивост на: амoxicillin/clavulanic acid 30 μ g, amoxicillin 30 μ g, penicillin 10 μ g. Резистентност код свих изолата забилјежена је на cephalixin 30 μ g, doxycycline 30 μ g, gentamicin 30 μ g, lincomycin 30 μ g, oxytetracycline 30 μ g и trimethoprim/sulphamethoxazol 25 μ g.
3. Највећи антимикробни потенцијал су исполјила етерична улја *Origanum compactum* и *Thymus serpyllum* на изолате KNS (100% осјетљивост), док је 40% изолата било осјетљиви на етерично улје *Origanum majorana*, а остали изолати (60%) су били умјерено осјетљиви на ово етерино улје. Изолати *Enterococcus faecalis* (90%) су били осјетљиви на етерично улје *Origanum compactum*, 80% изолата на *Thymus serpyllum*, а 100% резистентност су показали на етерично улје *Origanum majorana*. Највећи антимикробни потенцијал су исполјила етерична улја *Origanum compactum* и *Thymus serpyllum* на изолате *E. coli*. Етерично улје *Origanum majorana* имало је умјерено осјетљиво дејство на 60% изолата, а 40% изолата је било резистентно на ово етерично улје.
4. Испитивањем МИК и МБК етеричних улја на по три изолата *E. coli*, KNS и

Enterococcus faecalis, uočeno je da eterično ulje *O. compactum* ima najjaču antimikrobnu aktivnost na sva tri testirana izolata.

5. Sva tri eterična ulja (*O. compactum*, *O. majorana* i *T. serpyllum*) testirana na *E. coli* izolat 10, KNS izolat 5, *Enterococcus faecalis* izolat 10 pokazala su međusobnu interakciju. što znači da pojedine komponente jednog eteričnog ulja znatno pojačavaju efekat drugog eteričnog ulja, te daju zajednički pozitivni efekat. Izuzetak je jedan izolat *Enterococcus faecalis*. Kombinacija eteričnog ulja *O. compactum* sa *O. majorana* i kombinacija *O. majorana* sa *T. serpyllum* na izolat *Enterococcus faecalis* imala je indiferentan efekat, što znači da *O. majorana*, bez obzira što je u kombinaciji sa nekim drugim uljem, ne pokazuje antimikrobno djelovanje na ovaj izolat.
6. Antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja treba uzeti u razmatranje, jer može predstavljati zanimljiv izbor i alternativu za smanjenje upotrebe antibiotika u liječenju životinja oboljelih od mastitisa.

Izjava o sukobu interesa: Autor izjavljuje da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Adkins P. R. F., Middleton J. R., Fox L. K., Pighetti G., Petersson-Wolfe C. (2017): Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council. 2017.
- Baćić G. (2009): Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Bannerman D. D. (2004): *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(3):463-72.
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol.*, 36(3):49-52.
- BioMérieux (2002): API 20E - Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods. Biomerieux.
- Burović J. (2020): Izolacija bakterijskih patogena kod klinički manifestnih mastitisa mliječnih goveda i njihova antimikrobna osjetljivost u zeničkoj regiji u 2017. godini. *Veterinarska stanica*, 51:47-52.
- Choi J.-Y., Damte D., Lee S.-J., Kim J.-C., Park S.-C. (2012): Antimicrobial Activity of Lemongrass and Oregano essential oil against standard antibiotic resistant and field isolates from chronic mastitis cow. *International Journal of Phytomedicine*, 4(1):134-139.
- CLSI (2014): M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility

- testing. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2012): M02-A11 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Clinical and laboratory standards institute.
- Eberhart R. J. (1977): Coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 170:1160-1163.
- Fadli M., Saad A., Sayadi S., Chevalier J., Mezrioui N.-E., Pagès J.-M., Hassani L. (2012): Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussoneti* essential oil against nosocomial infection bacteria. *Phytomedicine*, 19(5):464-471.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. E. (2001): A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.*, 91:453-462.
- Maksimović Z., Rifatbegović M. (2015): Osnovni principi kliničke bakteriologije. Veterinarski fakultet Sarajevo.
- Murphy J. M. (1947): The genesis of bovine udder infection and mastitis; the occurrence of streptococcal infection in a cow population during a seven-year period and its relationship to age. *Am. J. Vet. Res.*, 8;29-42.
- Petrović M. D., Petrović M. M., Nenadović, G., Kurćubić V., Marinkov G. (2006): Hemijski - mikrobiološki parametri kvaliteta sirovog kravljeg mleka. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(5-6):109-119.
- Pitkälä A., Haveri M., Pyörälä S., Myllys V., Honkanen-Buzalski T. (2004): Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.*, 87(8):2433-2441.
- Propis (1994): Uredba o načinu uzimanja uzoraka, razvrstavanju i obračunu cijene mlijeka. Službene novine Federacije Bosne i Hercegovine, 1/94.
- Propis (2011): Pravilnik o sirovom mlijeku. Službeni glasnik Bosne i Hercegovine, 21/11.
- Schuster D. E., Kchirli M. E., Rainard P., Paape M. (1997): Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrofilic recruitment during intramammary infection with *E. coli*. *Infect. Immun.*, 65:3286-92.
- Souza E. L., Oliveira C. E. V., Stamford T. L. M., Conceição M. L., Gomes Neto N. J. (2013): Influence of carvacrol and thymolon the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Braz J Microbiol.*, 44:29-35.
- White D., Walmsley M., Liew A., Claycomb R., Mein G. (2005): Chemical and rheological aspects of gel formation in the California Mastitis Test. *Journal of Dairy Research*, 72(1):115-121.

Рад примљен: 14.05.2023.

Рад прихваћен: 23.07.2023.