

UDK: 618.19-002:615.33+57.017.2

Originalni naučni rad

PRIMENA MASTIK® TESTA ZA ODABIR ANTIBIOTIKA U TERAPIJI MASTITISA KRAVA

*B. Petrukić, D. Milanov, B. Vidić, Đ. Marković, B. Ivković**

Izvod: U ovom radu izvršeno je ispitivanje u cilju poređenja primene komercijalnog MASTIK® testa za brzo određivanje osetljivosti uzročnika mastitisa krava na antibiotike i standardnog Kirby-Bauer disk-difuzionog testa. Ispitano je 6 uzoraka mleka od krava sa kliničkim i subkliničkim mastitisom, odabranih metodom slučajnog izbora. Iz uzoraka su standardnim mikrobiološkim tehnikama izolovani sledeći mikroorganizmi: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, koagulaza-negativni *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* i *Aspergillus fumigatus*. Primenom MASTIK® testa i disk-difuzionog testa, dobijeni su u potpunosti uporedivi rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih bakterijskih uzročnika mastitisa na antibiotike. MASTIK® test predstavlja jednostavnu metodu, aplikativnu u terenskim uslovima i pogodnu za brz odabir antibiotika u terapiji mastitisa krava, dok se čekaju rezultati mikrobiološke identifikacije uzročnika.

Cljučne reči: mastitis, antibiotici, osetljivost, MASTIK®, disk-difuzioni test.

Uvod

Mastitis u svetu i kod nas i danas predstavlja jednu od najznačajnijih bolesti visokomlečnih krava. Gubitak koji nastaje kod krava obolelih od mastitisa potiče ne samo od smanjene proizvodnje mleka, već i od odbačenog mleka (usled karence), gubitka premije, troškova lečenja i negativnog uticaja mastitisa krava na reprodukciju.

Rana dijagnoza mastitisa krava je od velike važnosti zbog velike cene koja se plaća za terapiju mastitisa i gubitka koji od njega nastaje. Regulativa Evropske unije (*Regulation EC No 1662/2006*) navodi da mleko koje se koristi za ishranu ljudi mora poticati od zdravih životinja.

Klasične metode detekcije mastitisa obuhvataju određivanje broja somatskih ćelija, koncentracije pojedinih markera zapaljenja (npr. enzima N-acetil- β -D-glukozaminidaze i laktat dehidrogenaze), određivanje električne provodljivosti i na kraju izolacije uzročnika i antibiograma. Izolacija uzročnika, još uvek, predstavlja zlatni standard. Međutim, zbog

* Mr sci. Branko T. Petrukić, saradnik u nastavi, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; dr Dubravka Milanov, naučni saradnik, dr Branka Vidić, naučni savetnik, Naučni Institut za veterinarstvo, Novi Sad; Đorđe Marković, dvm, Branislav Ivković, dvm, sektor veterine, Jugohemija-Vetagra, Beograd.

Ovo istraživanje je pomognuto sredstvima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije za projekat pod brojem 20115.

velike udaljenosti farmi krava od laboratorija, čest je slučaj da se kultivisanje uzoraka mleka krava obolelih od mastitisa ne vrši već da se krave terapijaju prema iskustvu. Posledica toga je loš uspeh terapije i povećanje rizika po zdravlje ljudi usled nekontrolisane upotrebe antibiotika.

Cilj našeg rada je bio da se uporedi efikasnost MASTIK[®] testa, komercijalnog testa za *in vitro* određivanje bakterijske osetljivosti (MASTIK[®] ImmuCell Corp., Portland, ME, SAD) u odnosu na Kirby-Bauer disk difuzioni test i proceni da li je njegova upotreba kao brze metode ispitivanja bakterijske osetljivosti na antibiotike naučno i stručno opravdana.

MASTIK[®] je brzi kvantitativni test za ispitivanje antibiotske osetljivosti uzročnika mastitisa koji imaju sposobnost fermentisanja laktoze. Većina najčešćih uzročnika mastitisa krava fermentše laktozu i to su sledeći m.o.: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus disgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* i *Arcanobacterium pyogenes*. Uzročnici koji mogu takođe da dovedu do mastitisa kod krava, ali se ipak ređe sreću, a koji imaju sposobnost fermentisanja laktoze su: *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus zooepidermicus*, *Streptococcus* grupe G, koagulaza negativni *Staphylococcus*, *Enterobacter* i *Citrobacter*. Uzročnici mastitisa koji ne fermentišu laktozu se najčešće ne mogu izlečiti antibioticima koji se koriste u terapiji mastitisa ili antibioticima uopšte, ne daju rezultat na testu a obuhvataju: *Mycoplasmae*, *Prothoteca* i *Pseudomonas* (Saperstein, 1993).

Materijal i metod rada

Ispitivanje je izvršeno na 6 uzoraka mleka, dostavljenih u laboratoriju sa zahtevom za bakteriološko ispitivanje i izradu antibiograma. Pet od dostavljenih uzoraka bilo je vidno promenjene boje i konzistencije.

Uzorci mleka su poštujući standardnu mikrobiološku tehniku zasejani na krvni MacConkey i Sabouraud dekstrozni agar i inkubirani na 37°C. Osetljivost izolata na antibiotike je ispitivana disk difuzionom metodom. Paralelno sa zasejavanjem uzoraka, izveden je MASTIK[®] test prema uputstvu proizvođača: po 1 ml mleka je inokulisan u reagens bočicu. Sadržaj je homogenizovan i inkubiran na 37°C u trajanju od dva sata. Posle inkubacije sadržaj je dobro promešan i sterilnom pipetom je po dve kapi rastvora inokulisano u svaki od 16 udubljenja na testu. Ploče su prekrivene zaštitinom folijom i inkubirane na 37°C u trajanju od 18 časova. Nakon toga, izvršeno je očitavanje reakcije MASTIK[®] testa i osetljivost na antibiotike je procenjivana na osnovu promene boje (ljubičasta boja-nema rasta bakterija tj. uzročnik je osetljiv na ispitivani antibiotik; žuta-ima rasta tj. uzročnik je neosetljiv na ispitivani antibiotik). Dobijeni rezultat je ubeležen u MASTIK[®] evidencioni karton.

Rezultati istraživanja i diskusija

Standardnim bakteriološkim pregledima iz ispitivanih uzoraka izolovani su sledeći mikroorganizmi:

Uzorak br. 1. Izolovan je *Staphylococcus aureus* u čistoj kulturi;

Uzorak br. 2. Izolovana je *Escherichia coli* u čistoj kulturi;

Uzorak br. 3. Izolovan je u velikom broju *Streptococcus dysgalactiae*;

Uzorak br. 4. Izolovan je koagulaza negativan *Staphylococcus spp*;

Uzorak br. 5. Izolovan je *Streptococcus uberis*;

Uzorak br. 6. Iz uzorka je izolovana plesan iz roda *Aspergillus*;

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata bakterija na antibiotike standardnim disk difuzionim metodom i MASTIK® testom prikazani su u tabelama 1 i 2.

Tab. 1. Rezultati ispitivanja osetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike standardnim disk difuzionim testom

Results of antibiotic succesibility – Kirby Bauer disc test

	Uzorak 1 Sample 1	Uzorak 2 Sample 2	Uzorak 3 Sample 3	Uzorak 4 Sample 4	Uzorak 5 Sample 5	Uzorak 6 Sample 6
Oxytetraciklin	S	S	I	S	S	/
Streptomycin	I	I	I	S	R	/
Neomicin	S	I	R	S	R	/
Penicilin	S	R	S	S	S	/
Ampicilin	S	I	S	S	S	/
Ceftriaxon	S	S	S	S	S	/
Sulfametoksazol- trimetoprim	S	S	I	S	R	/
Gentamicin	S	S	I	S	R	/
Amoksicilin	S	R	S	S	S	/
Amoksicilin + klavulanska kiselina	S	S	S	S	S	/

R – rezistentan; I – intermedijerno osetljiv; S – osetljiv; / nije radeno.

R – resistant; I – intermediate sensitive, S – sensitive; / non done.

Tab. 2. Rezultati ispitivanja osetljivosti uzročnika mastitisa na antibiotike u dve različite koncentracije MASTIK® testom
Results of antibiotic succesibility survey (in two concentrations) MASTIK® test

	Uzorak 1 <i>Sample 1</i>	Uzorak 2 <i>Sample 2</i>	Uzorak 3 <i>Sample 3</i>	Uzorak 4 <i>Sample 4</i>	Uzorak 5 <i>Sample 5</i>	Uzorak 6 <i>Sample 6</i>
Eritromicin 1,0 (µg/ml)	S	r	×	S	R	/
Eritromicin 4,0 (µg/ml)	S	r	×	S	S	/
*Oxacilin 1,0 (µg/ml)	S	R	×	S	S	/
*Oxacilin 4,0 (µg/ml)	S	R	×	S	S	/
**Ampicilin 0,5 (µg/ml)	S	R	×	S	S	/
**Ampicilin 4,0 (µg/ml)	S	S	×	S	S	/
Penicilin 0,25 (µg/ml)	S	R	×	S	S	/
Penicilin 4,0 (µg/ml)	S	R	×	S	S	/
***Cefalotin 2,0 (µg/ml)	S	R	×	S	S	/
***Cefalotin 16,0 (µg/ml)	S	S	×	S	S	/
Pirlimicin 0,5 (µg/ml)	R	R	×	R	R	/
Pirlimicin 4,0 (µg/ml)	S	R	×	S	S	/
Oxytetraciklin 4,0 (µg/ml)	S	S	×	S	R	/
Oxytetraciklin 16,0 (µg/ml)	S	S	×	S	S	/

× **test nije validan (negativna kontrola)**
test is not valide (negative control)

/ **bez porasta bakterija (nema promene boje na testu)**
absence of bacterial growth (no color changes in test)

* **Oksacilin je izvorna komponenta Kloksacilina**
Oxacilin as source ingredient of Kloxacilin

** **Ampicilin je izvorna komponenta Amoksicilina i Hetaciklina**
Ampicilin as source ingredient of Amoxicilin and Hetaciklin

*** **Cefalotin je izvorna komponenta Cefapirina i Ceftiofura**
Cefalotin as source ingedient of Cefarin and Ceftiofur

I pored velikih napora koji se čine u prevenciji mastitisa i edukaciji farmera i veterinaru, terapija mastitisa vrlo često ne daje očekivani rezultat, jer se izvodi bez prethodne izolacije mikroorganizama (Bradley, 2002). Udaljenost farmi od laboratorija i stečene navike farmera su umnogome doprineli ovakvom stanju na terenu. To je i bio osnovni motiv da izvršimo poređenje rezultata osetljivosti izolata na antibiotike dobijenih Kirby-Bauer disk difuzionim testom i MASTIK® testom.

Kada je u uzročnicima prisutna bakterijska vrsta (uzročnik mastitisa) u čistoj kulturi MASTIK® test se pokazao kao koristan i pouzdan. To ističe potvrdu uzorkovanja mleka pod maksimalno aseptičnim uslovima, što je čest problem u praksi pa veliki broj uzoraka koji se dostavlja u laboratoriju ima manji ili veći stepen kontaminacije. Od pravilnog uzorkovanja zavisiće i dobijeni rezultat, pa svaka kontaminacija uzorka može dovesti do neuspeha u terapiji.

MASTIK® testom je utvrđena osetljivost sledećih bakterijskih uzročnika prisutnih u uzorcima: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, koagulaza-negativni *Staphylococcus sp.* i *Streptococcus uberis* i ona je u potpunosti uporediva sa rezultatima ispitivanja osetljivosti izolata standardnim disk difuzionim testom, na antibiotike koji su zajednički za oba ispitivanja. Ovaj nalaz u skladu je sa nalazima drugih autora koji su se bavili istom problematikom (Saperstein, 1993 and Hoblet, 1993).

MASTIK® test inokulisan uzorkom br. 3 nije bio očitljiv posle 18 sati inkubacije. To je bio slučaj zbog velikog broja bakterija u uzorku (*Streptococcus dysgalactiae*), što ukazuje na neophodnost provere panela na svakih 4 sata (prema uputstvu). Sa ovim uzorkom mleka došlo je do promene boje test reagensa posle 2 sata inkubacije, ali kako nismo imali na raspolaganju dodatne reagens nismo bili u mogućnosti da postupimo prema uputstvu i inokulišemo novi test reagens. Takođe, kako nismo raspolagali anamnestičkim podacima nismo mogli ni da preskačemo korak inkubacije reagens-mleko (prema uputstvu). Uzorci mleka su odabrani metodom slučajnog odabira, pa se desilo da je u uzorku br. 6 bila prisutna plesan iz roda *Aspergillus* koja je mogući uzročnik mastitisa krava. Rezultati primenom MASTIK® testa su isključili neophodnost primene antibiotika u terapiji, što je korisna orijentacija na terenu koja omogućava njihovu racionalnu primenu.

Obzirom na jednostavnost u izvođenju test je koristan za primenu u terenskim uslovima za brz odabir antibiotika, dok se čekaju rezultati bakteriološkog ispitivanja. Poželjno je uporedo sa MASTIK® testom izvršiti i klasično laboratorijsko ispitivanje, zbog:

- identifikacije bakterijskog uzročnika mastitisa;
- identifikacije uzročnika kao što su: *Pseudomonas aeruginosa*, kvasnice, ahlorofilne alge (*Prototheca zopfii*) i plesni;
- moguće kontaminacije uzorka (što je veoma čest slučaj) koja se može proceniti standardnim tehnikama laboratorijskog ispitivanja;
- mogućnosti ispitivanja osetljivosti bakterijskog izolata i na druge antibiotike koje ne sadrži test panel.

Činjenica da mastitis kod krava uzrokuje ekonomske gubitke je dobro poznata, ali njegov uticaj ide i dalje od uticaja na proizvodnju mleka. Klinički mastitis krava može da ima izrazit negativan uticaj na reprodukciju, jer je utvrđeno da krave koje obole od mastitisa u prvih 45 dana posle teljenja imaju znatno nižu stopu koncepcije (Ahmadzadeh, 2009).

Imajući u vidu sve napred navedeno, nameće se potreba da farmeri obrate još veću pažnju u programima prevencije i kontrole, a veterinari u sprovođenju terapije mastitisa ne samo zbog uticaja na efikasnost proizvodnje već i zbog uticaja na reproduktivnu efikasnost krava i zdravlje ljudi.

Zaključak

Dobijeni rezultati potvrđuju aplikativnost MASTIK® testa u brzom ispitivanju osetljivosti bakterijskih uzročnika mastitisa na odabrane antibiotike. Obzirom na jednostavnost u izvođenju i pouzdanost, test je koristan za primenu u terenskim uslovima za brz odabir antibiotika, dok se čekaju rezultati bakteriološkog ispitivanja.

Iako MASTIK® test nije namenjen za utvrđivanje terapije mastitisa krava izazvanih gljivicama (koje mogu biti uzročnik mastitisa ali ređe), na osnovu rezultata ispitivanja, pokazao je da u ovom slučaju ne treba koristiti antibiotike. Ovaj podatak može nam biti od velike pomoći i jasno ukazuje da takav uzorak mleka treba obavezno poslati u laboratoriju gde će se uraditi identifikacija uzročnika klasičnim mikrobiološkim tehnikama. Na ovaj način može se sprečiti neracionalno korišćenje antibiotika i smanjiti opasnost od njihovih rezidua u mleku i mlečnim proizvodima po zdravlje ljudi.

Literatura

1. *Ahmadzadeh, A., Frago, F., Shafii, B., Dalton, J.C., Price, W.J., McGuire, M.A. (2009):* Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows, *Animal Reproduction Science*, 112: 273–282.
2. *Bradley, A.J. (2002):* Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J* 164, 116–128.
3. Commission Regulation (EC) No 1662/2006, Health requirements for raw milk and colostrum production, *Official Journal of the European Union L* 320/4.
4. *Hoblet, K.H., Queen, G.W., Howard, R.R. (1993):* Antibiotic Susceptibility Test for Mastitis: A Comparison of a Commercial Test Kit with Kirby-Bauer, *Ag Prac*, 14:7, 45-51.
5. *Saperstein, G. (1993):* Clinical applications of antibiotic susceptibility test for mastitis, *Ag Prac* 14: 4, 25-28.

UDC: 618.19-002:615.33+57.017.2

Original scientific paper

USE OF MASTIK® TEST IN CHOICE OF ANTIBIOTICS TREATMENT OF MASTITIS IN COWS

*B. Petrujkić, D. Milanov, B. Vidić, Đ. Marković, B. Ivković**

Summary

In this paper comparison of efficiency of commercially available antibiotic sensitivity test MASTIK® with traditionally used Kirby-Bauer disk diffusion method was described. Six samples of examined milk were chosen on a randomly basis. In the samples presence of following microorganisms was determined: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coagulase-negative *Staphylococcus sp.* and *Streptococcus uberis*. Based on the result of the trial it was determined that MASTIK® test is completely comparable to the results obtained by classical disk diffusion method and can be of great help on a field in fast selection of antibiotics, while results of bacteriological identifications are being awaited.

Key words: mastitis, antibiotics, sensitivity, MASTIK®, Kirby-Bauer disc method.

* Branko T. Petrujkić, M.Sc., Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade; Dubravka Milanov, Ph.D. Branka Vidić, Ph.D. Scientific Veterinary Institute, Novi Sad; Đorđe Marković, DVM, Branislav Ivković, DVM, Jugohemija-Vetagra, Belgrade.

This investigation was supported by grant from the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia , Project No. 20115.