

UNIVERZITET U BEOGRADU
Fakultet veterinarske medicine
Katedra za mikrobiologiju

Nemanja Zdravković, dr vet.

**Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola,
eugenola, cinamaldehida i timola prema
sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u
slučajevima mastitisa krava**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
Faculty of Veterinary medicine
Department of Microbiology

Nemanja Zdravković, dvm.

**Antibacterial examination of carvacrol, eugenol,
cinamaldehide and thymol against
Staphylococcus aureus isolated in cases of cow
mastitis**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Komisija za odbranu Doktorske disertacije

Mentor: Dr Dejan Krnjaić, vanredni profesor
Fakultet Veterinarske medicine, Beograd

Članovi:

Dr Vera Katić, red. prof.
Fakultet veterinarske medicine

Dr Saša Trailović, red. prof.
Fakultet veterinarske medicine

Dr Marina Radojičić, docent
Fakultet veterinarske medicine

Dr Dragana Vuković, van.prof.
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Za svoj put u mikrobiologiju želim da hronološki izrazim zahvalnost prof. dr Dušanu Mišiću bez koga ne bih kročio u svet bakterija, kao i dr Ružici Ašanin profesoru u penziji, koja me je primila na svoj projekat tehnološkog razvoja. Za sve što sam naučio u prvim danima laboratorijskog rada zahvalnost dugujem svojoj tehničarki Jeleni Stankov, dr Jeleni Ašanin i dr Kseniji Aksentijević. Uz navedene želim da izrazim zahvalnost i pomoć u radu tehničarkama Radmili Savatović i Radmili Banković. Za podršku i povremene otrežnjujuće savete zahvalio bih prof. dr Jakovu Nišaviću i prof. dr Nenadu Miliću. Veliku pomoć u savlađivanju poteškoća u primenjenim molekularnim tehnikama dobio sam od dr Dragane Jošić iz Instituta za zemljište i od dr Dejana Vidanovića iz VSI Kraljevo.

Neizmernu pomoć, modelovanje teme i beskrajne sate i sate nerviranja dugujem svom mentoru prof. dr Dejanu Krnjaiću, bez koga ni ova teza, kao ni znanje usvojeno tokom njene izrade, ne bi postojalo. Na kraju želim da zahvalim i ostalim članovima komisije na finom brušenju kojim je ova teza dobila konačni oblik.

Hvala svim prijateljima i kolegama, koji su me podržali, a posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, supruzi Zorici i sinu Vuku, jer su u bili uz mene.

Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava

Kratak sadržaj

Staphylococcus aureus predstavlja jednog od najznačajnijih uzročnika mastitisa krava, koji dovodi do velikih zdravstvenih problema i ekonomskih gubitaka u proizvodnji mleka. Imajući u vidu sve prisutniju rezistenciju prema antibioticima sojeva *S. aureus* izolovanih kod mastitisa, odnosno zabranjenu ili ograničenu upotrebu antibiotika u organskoj proizvodnji, etarska ulja imaju sve veći značaj u terapiji obolelih grla.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita: antibakterijsko delovanje odabranih komponenti etarskih ulja: karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola na sojeve *S. aureus* izolovanih u slučajevima supkliničkih mastitisa krava, njihovo sinergističko delovanje u tečnoj kulturi, kao i delovanje na biofilm *S. aureus*.

Za ispitivanja na kliničkim izolatima, korišćeni su uzorci prikupljeni u toku redovne kontrole sa područja koje obuhvata 8500 mlečnih grla, holštajn-frizijske rase. Osim kliničkih izolata u radu su korišćeni i referentni sojevi *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 i meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43300. Kao kontrolni soj za produkciju biofilma korišćen je izolat *S. aureus* sa Instituta za mikrobiologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Da bi se postigli postavljeni ciljevi korišćene su i klasične mikrobiološke metode izolacije identifikacije *S. aureus*, kao i PCR metoda molekularne detekcije: *nuc* gena za proizvodnju termostabilne nukleaze koji se pojavljuje u različitim alelnim formama kod *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus*, na čemu se zasniva identifikacija vrste, zatim *coa* gena za produkciju koagulaze i *ica* A i D alelne forme gena koji kodira produkciju biofilma. Disk difuzionom metodom ispitivana je osetljivost izolata na antimikrobne supstance, zastupljene u terapiji mastitisa u Srbiji. Metodom određivanja minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija antimikrobnih supstanci određena je osetljivost izolata *S. aureus* prema aktivnim komponentama etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola u koncentracijama od 2560 µg/ml do 1,25 µg/ml i kontrolnim antibioticima linkomicinu, neomicinu i kloksacilinu. Određivanje međusobnog odnosa na antimikrobno dejstvo aktivnih komponenti u vršeno je modifikovanom metodom šahovske table, dok je određivanje dužine antibakterijskog delovanja izvršeno time – kill metodom u mleku u trajanju od 14 dana uz tri dodatne inokulacije bakterija 2., 4. i 6. dana ispitivanja. Utvrđivanje sposobnosti produkcije biofilma u mikrotitracionim pločama vršeno je bojenjem biofilma rastvorom kristal violeta, i merenjem

ekstinkcije upotrebom spektrofotometra, dok je inhibitorno dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma izvedeno u mikrotitracionim pločama na formiranom biofilmu inokulisanjem aktivnih komponenti u koncentraciji od 80µg/ml do 2560µg/ml. Poređenjem očitanih ekstinkcija mase biofilma sa i bez aktivne komponente izračunavano je smanjenje mase biofilma. Ispitivanje baktericidnog dejstva aktivnih komponenti prema ćelijama biofilma vršeno je merenjem degradacije tetrazolijumske soli MTT. Koncentracija aktivne materije koja je dovela do smanjenja ekstinkcije na polovinu vrednosti ekstinkcije netretiranog biofilma uzeta je kao minimalna baktericidna vrednost koja dovodi do 50% smanjenja broja živih ćelija biofilma.

Utvrđivanjem minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija prema ispitivanim izolatima *S. aureus* najpotentnije dejstvo pokazao je cinamaldehyd (161,5µg/ml), zatim slede karvakrol (237,7µg/ml), eugenol (271,6µg/ml) i timol (306,5µg/ml). Ispitivanjem zajedničkog antimikrobnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja utvrđen je sinergistički odnos kod 7 određenih kombinacija i koncentracija, a najviši aditivni efekat zabeležen je u kombinaciji 20µg/ml karvakrola i 80µg/ml eugenola. Najduže antibakterijsko delovanje na ispitivane *S. aureus* sojeve imao je cinamaldehyd koje se ispoljavalo i nakon 14 dana uz 3 reinokulacije bakterija. Dugotrajnim delovanjem karakterisao se i karvakrol zadržavajući antibakterijsko dejstvo 14 dana, dok su timol i eugenol izgubili svoje antimikrobno dejstvo nakon 48h do 72h. Ispitivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehyda i timola na biofilmove *S. aureus* pokazalo je da sve četiri komponente deluju na biofilm u značajno višim koncentracijama nego prema pojedinačnim planktonskim ćelijama. Najpotentnijim dejstvom, odlikovao se karvakrol (903,5µg/ml), zatim timol (1160µg/ml), eugenol (1416µg/ml) i cinamaldehyd (1435µg/ml). Na viabilne ćelije biofilma najbolje dejstvo ispoljio je timol (688,0µg/ml), zatim karvakrol (737,1µg/ml), eugenol (1410µg/ml) i cinamaldehyd (1440µg/ml). Dobijeni rezultati antibakterijskog delovanja karvakrola, eugenola, cinamaldehyda i timola na sojeve *S. aureus* izolovanih kao uzročnika mastitisa ukazuju na mogućnost njihove efikasne primene u terapiji mastitisa krava, kako u konvencionalnoj tako i u organskoj proizvodnji.

Ključne reči: cinamaldehyd, etarska ulja, eugenol, karvakrol, mastitisi, rezistencija, *Staphylococcus aureus*, timol

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

UDK broj: 619: 579.62: 618.19-002

Antibacterial examination of carvacrol, eugenol, cinnamaldehyde and thymol against *Staphylococcus aureus* isolated in cases of cow mastitis

Summary

Staphylococcus aureus is one of the most important causes of cow mastitis that leads to major health problems and economic losses in milk production. Essential oils and their active components are gaining importance in the treatment of mastitis patients due to growing antimicrobial resistance of *S. aureus* strains, as well as due to prohibited or limited use of antibiotics in organic production. The aim of this study was to examine: antibacterial activity of selected essential oil components: carvacrol, eugenol, thymol and cinnamaldehyde on *S. aureus* isolated in cases of subclinical mastitis in cows, their synergistic effects, and the effect on the *S. aureus* biofilm.

To achieve these goals, clinical isolates were used, collected during regular checkups in the areas covered by 8500 dairy cattle of the Holstein-Friesian breed. Beside clinical isolates reference strains of *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 and methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 43300 have been used. Control used for the production of *S. aureus* biofilm was the strain from the Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Belgrade. In order to reach the set objectives, classical microbiological methods of isolation and identification of *S. aureus* were used as well as the PCR methods of molecular genetic detection: *nuc* gene for the production of thermostable nuclease that appears in different allelic forms in *S. aureus*, *S. intermedius*, and *S. hyicus*, which is used for identification species, then *coa* genes for the production of coagulase, and *ica* A and D allelic forms of the gene coding the production of a biofilm. Disk diffusion method was used in testing of the isolates' sensitivity to antimicrobial substances, present in the treatment of mastitis in Serbia. Determining the minimum inhibitory and bactericidal concentrations of antimicrobial substances was used to describe *S. aureus* isolates to the active components of essential oils: carvacrol, eugenol, cinnamaldehyde and thymol in a concentration of 2560 µg / ml to 1,25 µg / ml and control antibiotics as well lincomycin, neomycin and cloxacillin.

Determination of influence between the antimicrobial activities of active components was performed by chessboard modified method, while the length of antibacterial activity was tested by time - kill method in milk for 14 days with three additional reinoculation of bacteria on the 2nd, 4th and 6th days of testing. Ability of biofilm production was carried out in microtiter plates by staining biofilm with solution of crystal violet and measuring the extinction using a spectrophotometer, and the inhibitory effect of active components to

biofilm have been done in microtiter plates at a concentration range from 80µg/ml to 2560µg/ml. Comparing the extinction with or without the active component showed reduction of biofilm. Testing of bactericidal effect of active components on biofilm cells was conducted using tetrazolium salt MTT. The concentration of active substance which led to a reduction of the extinction of the half of the value of the extinction of the untreated biofilm was taken as the minimum bactericidal value that gave 50% reduction in the number of living cells of the biofilm.

The minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations towards *S. aureus* isolates demonstrated the most potent antibacterial effect of cinnamaldehyde (161,5µg/ml), followed by carvacrol (237,7µg/ml), eugenol (271,6µg/ml) and thymol (306,5µg/ml). Combination of these active components of essential oils exhibited synergism in antibacterial activity in 7 combinations. The best antimicrobial synergism is conceived with 20µg/ml carvacrol and 80µg/ml eugenol combination. Durable antimicrobial activity on *S. aureus* had cinnamaldehyde, which retained antibacterial properties for 14 days even with 3 re-inoculations of bacteria. Carvacrol showed long-term motion as well, which antibacterial effect lasted for 14 days, while thymol and eugenol had lost their antimicrobial activity after 48h to 72h. Study of the inhibitory effects of the active components of essential oils carvacrol, eugenol, thymol and cinnamaldehyde on *S. aureus* biofilm showed that all four components reduce biofilm growth.

The most potent effect on biofilms, exhibits carvacrol (903,5µg/ml), followed by thymol (1160µg/ml), eugenol (1416µg/ml), and cinnamaldehyde (1435µg/ml). The best antibacterial effect on the viable cells of the biofilm was expressed by thymol (688,0µg/ml) than carvacrol (737,1µg/ml), followed by eugenol (1410µg/ml) and cinnamaldehyde (1440µg/ml). The results of antibacterial activity of carvacrol, eugenol, cinnamaldehyde and thymol on *S. aureus* strains isolated from mastitis indicate the possibility of their effective application in the treatment of cow mastitis in conventional as well as in organic production.

Keywords: carvacrol, cinnamaldehyde, essential oils, eugenol, mastitis, milk, resistance, *Staphylococcus aureus*, thymol

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific discipline: Microbiology

UDC: 619: 579.62: 618.19-002

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Etarska ulja	4
2.1.1. Hemijski sastav	4
2.1.2. Primena etarskih ulja	8
2.2. Mehanizam antibakterijskog dejstva etarskih ulja	11
2.3. Toksičnost etarskih ulja	15
2.4. Mastitis krava	16
2.5. Rod Staphylococcus i vrsta Staphylococcus aureus	21
2.5.1. Istorijat i osnovne karakteristike	21
2.5.2. Rasprostranjenost, otpornost i faktori virulencije	24
2.6. Rezistencija	29
2.6.1. Značaj rezistencije u veterinarskoj medicini	30
2.7. Biofilm	34
2.7.1. Biofizičke karakteristike biofilmova	34
2.7.2. Fiziologija ćelija biofilma	35
2.7.3. Biofimovi sa više vrsta bakterija	36
2.7.4. Struktura biofilmova	36
2.7.5. Formiranje i širenje biofilma	37
2.7.6. Rast biofilma	38
2.7.7. Odvajanje biofilmova	39
2.7.8. Značaj biofilmova u specifičnostima patogeneze mastitisa	40
2.8. Specifičnosti organske proizvodnje mleka	42
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	49
4. MATERIJAL I METODE	50
4.1. Materijal	50
4.2. Metode	50

4.2.1.	Izolacija i identifikacija <i>S. aureus</i>	50
4.2.1.1.	Izolacija i fenotipska identifikacija	50
4.2.1.2.	Molekularna identifikacija <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> i <i>S. hyicus</i>	51
4.2.1.3.	Detekcija gena za produkciju koagulaze	53
4.2.2.	Ispitivanje osetljivosti kliničkih izolata <i>S. aureus</i> na antimikrobne supstance	55
4.2.2.1.	Ispitivanje osetljivosti metodom disk difuzije	55
4.2.2.2.	Ispitivanje osetljivosti mikrodilucionom metodom u bujonu	55
4.2.3.	Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma	56
4.2.3.1.	Ispitivanje prinosa mase biofilma izolata <i>S. aureus</i>	56
4.2.3.2.	Detekcija <i>icaAD</i> gena za produkciju biofilma	57
4.2.4.	Određivanje antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema kliničkim izolatima <i>S. aureus</i>	58
4.2.4.1.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	58
4.2.4.2.	Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBC)	58
4.2.4.3.	Ispitivanje antibakterijskog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja u različitim kombinacijama	59
4.2.5.	Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja na <i>S. aureus</i>	62
4.2.6.	Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na <i>S. aureus</i> u biofilmu	62
4.2.6.1.	Utvrđivanje dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma	63
4.2.6.2.	Utvrđivanje baktericidnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na ćelije biofilma	63
4.2.7.	Statistička obrada podataka	64
5.	REZULTATI	66
5.1.	Izolacija i identifikacija	66
5.1.1.	Fenotipska identifikacija	66
5.1.2.	Molekularna identifikacija <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> i <i>S. hyicus</i>	67
5.1.3.	Detekcija gena za produkciju koagulaze	69
5.2.	Ispitivanje osetljivosti kliničkih izolata <i>S. aureus</i> na antimikrobne supstance	72
5.2.1.	Ispitivanje osetljivosti metodom disk difuzije	72
5.2.2.	Ispitivanje osetljivosti mikrodilucionom metodom u bujonu	75

5.3.	Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma	77
5.3.1.	Ispitivanje prinosa mase biofilma izolata <i>S. aureus</i>	77
5.3.2.	Identifikacija <i>icaAD</i> gena za produkciju biofilma	78
5.4.	Određivanje antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema kliničkim izolatima <i>S. aureus</i>	79
5.4.1.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	80
5.4.2.	Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBC)	83
5.4.3.	Ispitivanje antibakterijskog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja u različitim kombinacijama	84
5.5.	Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja na <i>S. aureus</i>	89
5.6.	Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na <i>S. aureus</i> u biofilmu	92
5.6.1.	Utvrđivanje dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma	93
5.6.2.	Utvrđivanje baktericidnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na ćelije biofilma	96
6.	DISKUSIJA	102
6.1.	Izolacija i identifikacija <i>S. aureus</i>	102
6.2.	Ispitivanje osetljivosti izolata <i>S. aureus</i> prema antimikrobnim sredstvima	104
6.3.	Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma	108
6.4.	Određivanje antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema kliničkim izolatima <i>S. aureus</i>	109
6.4.1.	Određivanje minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC)	110
6.4.2.	Ispitivanje antibakterijskog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja u različitim kombinacijama	114
6.5.	Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja	117
6.6.	Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na <i>S. aureus</i> u biofilmu	119
7.	ZAKLJUČCI	121

8. LITERATURA	123
9. OBAVEZNI PRILOZI.....	136
9.1. Biografija autora.....	136
9.2. Izjava o autorstvu	137
9.3. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	138
9.4. Izjava o korišćenju	139

1. UVOD

U savremenoj, intenzivnoj proizvodnji mleka mastitisi predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem. Tako, na primer, u Sjedinjenim Američkim Državama procenjeni gubici usled mastitisa dostižu 2 milijarde američkih dolara, a nastaju usled pada proizvodnje mleka, odbacivanja mleka od obolelih životinja, izlučenja iz proizvodnje jedinki i pogoršanja klase mleka. Po nekim procenama u Evropskoj uniji zajedno sa troškovima lečenja svaki pojedinačni slučaj upale vimena krava košta oko 140 €, što u stadu sa stotinak muznih grla i očekivanom prevalencijom mastitisa od 20% tokom godine iznosi oko 12 800€. Najznačajniji uzročnici infektivnih mastitisa su *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*Strep. agalactiae*), *Strep. dysgalactiae* i *Strep. uberis*. Pored *S. aureus*, koji se smatra najčešćim uzročnikom, iz mleka su izolovane i druge koagulaza pozitivne stafilokoke, kao što su *S. intermedius* ili *S. hyicus*. Na mastitise prouzrokovane *S. aureus* otpada 25-30% infekcija, koje su praćene patološkim procesom u intersticijumu vimena, fibroznim promenama u sekretornom epitelu i posledično smanjenjem proizvodnje mleka. Uzročnici se izlučuju putem mleka u kome dolazi i do povećanja broja somatskih ćelija. Mleko četvrti koja je inficirana stafilokokama predstavlja opasnost po zdravlje potrošača, kako od samih bakterija tako i zbog mogućnosti stvaranja enterotoksina. U borbi protiv uzročnika infektivnih mastitisa primenjuju se različite strategije menadžmenta stada uključujući redovne kontrole, profilaktičku terapiju u periodu zasušenja, vakcinaciju kao i isključivanje iz proizvodnje obolelih grla. Kod pojave mastitisa tokom laktacije često se primenjuje antibiotska terapija. Dugotrajnim korišćenjem jednog antimikrobnog hemoterapeutika uništavaju se osetljivi sojevi patogenih bakterija i vrši se selekcionni pritisak koji favorizuje otporne sojeve mikroorganizma i vremenom se pojavljuje fenomen rezistencije.

Organska proizvodnja je sveobuhvatan sistem upravljanja farmama i proizvodnjom hrane, koja kombinuje najbolje ekološke prakse, visok nivo biodiverziteta, očuvanje prirodnih resursa, primenu visokih standarda dobrobiti životinja i način proizvodnje u skladu sa željama pojedinih potrošača za proizvode dobijene od prirodnih supstanci i u prirodnim procesima. Organska proizvodnja tako ima dvostruku društvenu ulogu, sa jedne strane popunjava specifično tržište odgovarajući na zahteve korisnika za

organskim proizvodima, a sa druge strane omogućava opšte dobro, doprinosi zaštiti životne sredine, dobrobiti životinja i ruralnom razvoju. Organski proizvedeno mleko predstavlja tržišno orijentisanu strategiju stočarstva, koja primenjivanjem zakonski regulisanih pravila u proizvodnji garantuje odsustvo većeg uticaja čoveka u biološki prirodni proces dobijanja mleka, što se odnosi i na sintetski modifikovanu ishranu i terapiju grla. Primena antimikrobnih sredstava u organskoj proizvodnji se drastično razlikuje u odnosu na konvencionalnu intenzivnu proizvodnju. Upotreba antibiotika i hemoterapeutika je u organskoj proizvodnji potpuno zabranjena u Sjedinjenim Američkim Državama, dok je prema propisima Evropske unije ograničena i dopuštena isključivo u određenim retkim situacijama. Da bi prevazišli ove probleme, raznovrsne lekovite biljke širom sveta se ispituju na posedovanje antimikrobnih svojstava, a u cilju pronalazjenja novih efikasnih antibakterijskih i antifungalnih sredstava.

U antimikrobnoj terapiji mastitisa mogu se koristiti razne neantibiotske supstance koje se karakterišu antibakterijskim dejstvom dovodeći do sprečavanja rasta i razmnožavanja ili uništavanja uzročnika. Kod infekcija vimena mogu se u preventivne i terapijske svrhe primenjivati kompletna etarska ulja i/ili njihove aktivne komponente. Ovakvi intramamarni injektori su već registrovani za upotrebu u nekim zemljama. Međutim, upotreba antimikrobnih lekova kao i etarskih ulja, a i njihovih kombinacija, nije ograničena samo njihovim efektivnim koncentracijama *in vitro*, već i maksimalnim dozama koje se mogu primeniti bez toksičnih neželjenih efekata kod životinja. Etarska ulja koja se mogu koristiti u terapiji mastitisa mogu poticati od biljaka kao što su: korijander (*Coriandrum sativum* L.), origano (*Origanum vulgare* L.), ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), cimet (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), žalfija (*Salvia officinalis* L.), majčina dušica (timijan) (*Thymus vulgaris* L.) i karanfilić (*Syzygium aromaticum* L. syn. *Eugenia carophyllata* Thunb.). Bliže upoznavanje zapadne medicine sa etarskim uljima i mogućnošću njihove preventivne i terapijske primene započinje od 1926. godine, kada je izdata knjiga Horasa Finmora u Londonu. Etarska ulja su pokazala da poseduju širok spektar bioloških aktivnosti i efikasnu antimikrobnu aktivnost protiv određenih bakterija, kvasaca, filamentoznih gljivica i virusa. Kao aktivne komponente ovih etarskih ulja izolovani su, između ostalih karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol.

U prirodi bakterije retko žive zasebno i smatra se da čak i do 80% svih infekcija prouzrokuju mikroorganizmi koji se nalaze u okviru biofilm formacije. Biofilm predstavlja zajednicu koja se sastoji od većeg broja mikroorganizama okruženih matriksom čvrsto vezanu kako za površinu ćelija domaćina tako i za brojne površine u prirodi. Osetljivost biofilмова *S. aureus* na aktivne komponente etarskih ulja nije dovoljno proučena, a kako se biofilmovi stvaraju *in vivo* kod mastitisa goveda od velikog značaja je utvrđivanje delovanja na njih karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Etarska ulja

Etarska ulja su produkti viših biljaka (*Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Lauraceae* i druge) koji su lokalizovani u različitim delovima biljaka uključujući koren, stablo, list, cvet, plod i seme. Etarska ulja nastaju aktivnošću endogenih i egzogenih sekretornih biljnih tkiva i predstavljaju proizvode pojedinačnih ćelija parenhima biljaka (*Lauraceae*, *Zingiberaceae*), ili žlezdanog epitela kod koga se nakupljaju u međućelijskim prostorima (*Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Apiaceae*). Etarska ulja biljaka imaju veći broj bioloških uloga, između ostalih privlačenje insekata, a time indirektno i pomoć u oprašivanju, stvaranje specifične mikroklimе koja sprečava prekomerno odavanje vode, zaštiti od napada insekata i drugih životinja, sprečavanju razvoja mikroorganizama odnosno odbranu od infekcija.

Usled prethodno opisane uloge u odbrani od infekcija, etarska ulja u ekološkim interakcijama predstavljaju prvu hemijsku barijeru protiv patogena.

2.1.1. Hemijski sastav

Etarska ulja su sekundarni metaboliti biljaka, lako isparljive hidrofobne, kompleksne prirodne smeše ugljovodonika, alkohola, karbonilnih jedinjenja, merkaptana i drugih jedinjenja alifatične i/ili aromatične strukture. Od masti triglicerida se razlikuju po isparljivosti i aromatičnosti i čine do 1% mase biljke kojoj daju karakterističan miris. Aktivne sekretorne ćelije, žlezde ili žlezdane dlake mogu biti lokalizovane u različitim delovima biljke stvarajući etarska ulja drugačijeg sastava. Na sastav ulja određenih vrsta biljaka utiče geografsko poreklo i godišnje doba. Hemotip je ista vrsta biljke, koja u zavisnosti od mesta rasta, može proizvoditi etarska ulja različitog hemijskog sastava. Do danas je otkriveno oko 3000 etarskih ulja od kojih je oko 10% komercijalno značajno (Hammer i Carson, 2011).

Etarska ulja su često karakterističnog mirisa, optički aktivne supstance, specifične težine od, 0,84g/ml do 1,18g/ml (Thormar i sar., 2011). Pored organoleptičkih osobina, osnovne fizičke i hemijske karakteristike na osnovu kojih se utvrđuje kvalitet ulja su gustina, indeks prelamanja, optička rotacija, rastvorljivost u alkoholu, interval ključanja, kiselinski i estarski broj, sadržaj aldehida i ketona, fenola i drugo. Dužim stajanjem na

vazduhu etarska ulja mogu da promene svoju konzistenciju i da postanu gušća poput smole, da promene boju, potamne i da reaguju kiselo. Etarska ulja i aktivne komponente se ne rastvaraju u vodi nego u apsolutnom etanolu, hloroformu, etru, masnim uljima i drugim organskim rastvaračima.

Aromatična svojstva su karakteristika mnogih etarskih ulja kao što su monoterpenska jedinjenja mentol kod nane, terpinen-4-ol kod čajnog drveta i terpineol kod belog bora, odnosno, seskviterpenska jedinjenja nerolidol kod đumbira i lavande, kao i bisabolol kod nevena (Hammer i Carson, 2011).

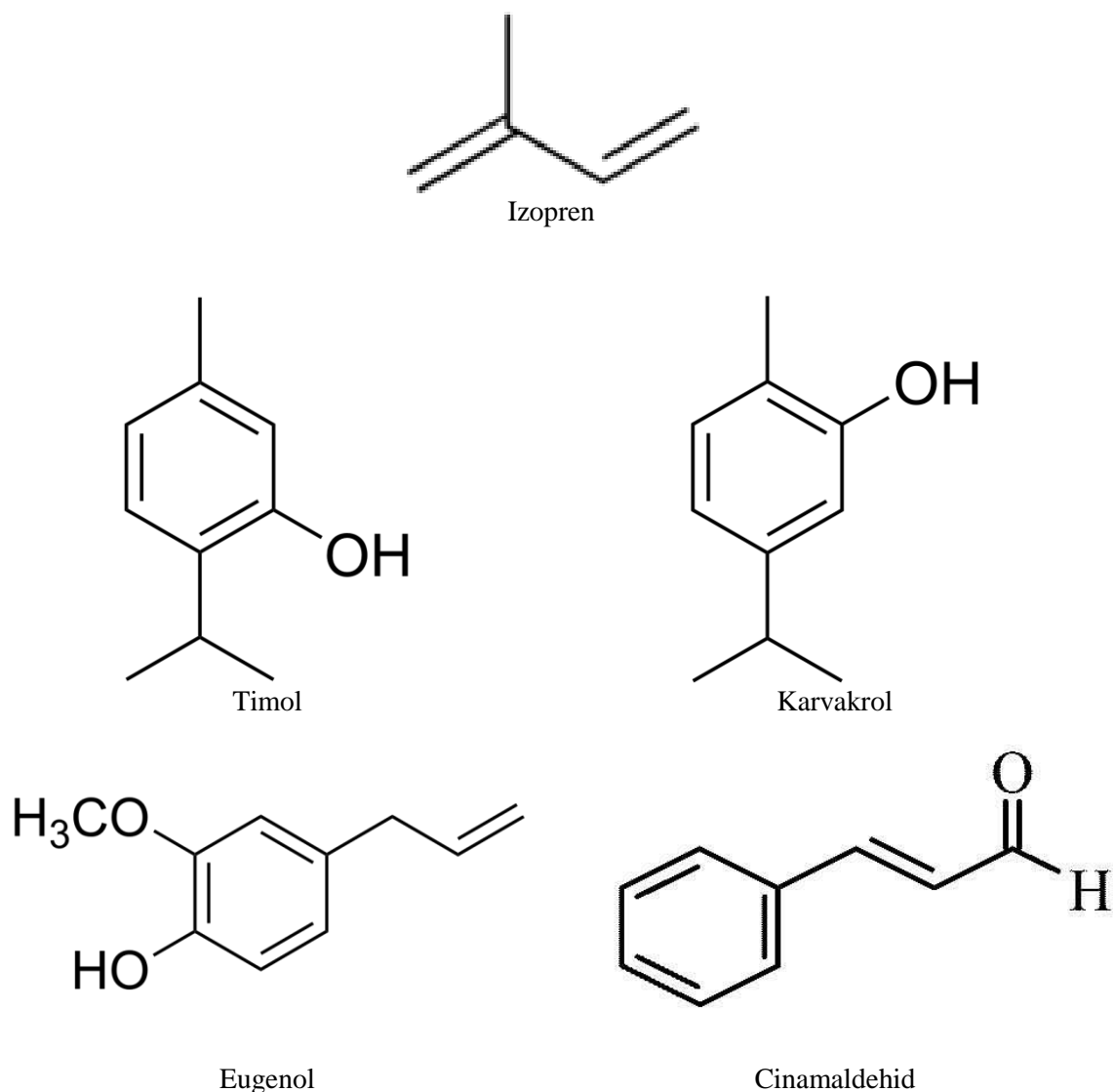
Analiza etarskog ulja podrazumeva odvajanje sastavnih aktivnih komponenata, njihovu identifikaciju i karakterizaciju upotrebom različitih hemijskih metoda. U novije vreme najpouzdaniji način utvrđivanja hemijskog sastava, a time i kvaliteta etarskih ulja, predstavlja primena instrumentalnih metoda analize uključujući atomsku emisiju i apsorpcionu spektrometriju, gasnu hromatografiju, masenu spektrometriju i tečnu hromatografiju visokih performansi (Bakkali i sar.; Pawar i Thaker, 2016). Etarska ulja su najčešće tečnosti, koje ponekad imaju viskoznu ili polučvrstu konzistenciju, koja su po hemijskom sastavu kompleksne prirodne smeše. U etarskim uljima može se ustanoviti veliki broj pojedinačnih jedinjenja u različitim koncentracijama, kao i vrlo različitih hemijskih svojstava, čak i preko 60 u jednom ulju (Burt i sar., 2005; Bakkali i sar., 2008). Etarsko ulje se uglavnom sastoji od dve do tri glavne komponente, koje su zastupljene u relativno visokoj koncentraciji od 20 do 70%, dok se ostale nalaze u tragovima. Ove glavne komponente određuju biološke i farmakološke osobine samog etarskog ulja, kao na primer karvakrol i timol kod ulja timijana (Bakkali i sar., 2008).

Aktivne komponente etarskih ulja dele se na dve grupe različitog hemijskog sastava. Prva grupa je sastavljena od terpena i terpenoida, a druga od aromatičnog i/ili alifatičnog dela. Etarska ulja čine aktivne komponente koje po hemijskoj reaktivnosti mogu biti alkoholi, aldehidi, kiseline, estri, ketoni, fenoli, laktone i ugljovodonici, a sva ova jedinjenja prema strukturi pripadaju terpenima (fenilpropanima) ili organskim ugljovodoničnim i kiseoničnim jedinjenjima (tabela 1) (Lazarević, 2011; Burt i sar., 2005; Bakkali i sar., 2008). Komponente etarskih ulja se odlikuju relativno malom molekularnom masom.

Tabela 1: Primeri aktivnih komponenti etarskih ulja i njihove hemijske osnove

Aldehidi	neral, geranial, benzaldehid, cinamaldehyd
Alkoholi monoterpenski	
alifatični	linalul, geraniol, lavandulol
aromatični	mentol, terpinen-4-ol, α -terpineol
Alkoholi seskviterpenski	nerolidol, bisabolol, b-santalol
Fenoli	timol, karvakrol, eugenol
Ketoni	
monociklični	menton, carvon, pulegon, piperiton
biciklični	kamfor, fenhon, tujon, verbenon
Estri	
aciklični	eramil, linalil, neril acetat
ciklični	metil salicilat, benzil acetat
Oksidi i epoksidi	1,8-cineol (eukaliptol), linalul oksid, limonen oksid, cariofilen oksid
Metil etri	metil kavikol (estragol), safrol, asaron, anetol
Terpeni	limonen, felandren, α i γ terpinen, terpinolen, tujen ,p-
monociklični	cimen, cadinen, sabinen
biciklični	α i β pinen, kamfen
Seskviterpeni	cadinen, cariofilen, aromadendren
Aciklični	cimen, β -mircen

Terpeni, terpenoidi i izoprenoidi predstavljaju jednu od najbrojnijih klasa prirodnih supstanci, kojih je do sada izolovano više od 30000 iz različitih biljaka, mikroorganizama i životinja (Baser i Demirci, 2007). Čine ih kombinacije kratkih ugljovodoničnih jedinica (C-5) koje su nazvane izopreni (slika 1) koji su odgovorni za njihov karakterističan miris i ukus, a razlikuju se od masnih kiselina zbog svoje ciklične i kompleksne strukture sa grananjem. Opšta hemijska formula terpena je $C_{10}H_{16}$, a oni se mogu pojaviti u obliku diterpena, triterpena i tetraterpena (C₂₀, C₃₀, C₄₀), a najčešće kao hemiterpeni C₅ i seskviterpeni C₁₅. Kada ovi ugljovodonici terpeni sadrže još neki hemijski element poput kiseonika, sumpora ili azota nastaju terpenoidi. Prema hemijskoj strukturi timol i karvakrol predstavljaju izomere monoterpene koji sadrže fenolnu grupu, a njima srodni eugenol pored fenolne sadrži i karboksilnu grupu (slika 1). Monoterpeni su česti sastojci etarskih ulja algi, viših biljaka i četinarsa na primer sledećih rodova: *Mentha*, *Eucalyptus*, *Pinus*, *Picea*, *Juniperus*, *Abies*, *Salvia* i *Monarda*.



Slika 1: Strukturne formule izoprena, timola, karvakrola, eugenola i cinamaldehyda

Druga aromatična i alifatična jedinjenja se nalaze u znatnom manjem udelu od terpena u etarskim uljima, čiji je biohemijski prekurzor fenilpropan a sinteza se odvija zasebno od sinteze terpena. Ova jedinjenja obuhvataju alifatične alkohole, aldehide i ketone dugačkog niza ($\geq C_{12}$) koja se mogu naći u slobodnom obliku ili udruženi sa alkanima i estrima viših masnih kiselina u epikutikularnom vosku lista biljaka. Aktivne komponente etarskih ulja navedene aldehydne strukture su između ostalih cinamaldehyd, benzaldehyd, neral i geranial (Hammer i Carson, 2011).

Najvažniji faktori koji utiču na sastav etarskog ulja biljke su: genotip, fenofaza ontogenetskog razvoja odnosno vreme prikupljanja materijala, faktori spoljašnje sredine

uključujući pre svega temperaturu i vlažnost, kao i metod obrade biljaka i način izolacije etarskog ulja. Izolacija etarskih ulja iz biljaka je moguća presovanjem, hidrodestilacijom, ekstrakcijom pomoću ulja i masti ili lako isparljivih rastvarača, ekstrakcijom gasovima u superkritičnim uslovima, head space metodom uz primenu gasnog hromatografa i masenog spektrofotometra, kao i ekstrakcijom rastvaračima potpomognuta delovanjem mikrotalasa (ESAM) (Bakkali i sar., 2008). Za identifikaciju i hemotipizaciju etarskih ulja najčešće se koriste gasna hromatografija i masena spektrometrija.

Biljke često imaju različit sastav etarskih ulja, na primer timijan, *Thymus vulgaris*, koji ima izraženu varijabilnost u pogledu sadržaja timola, karvakrola, linalula, tujan-4-ola i α -terpineola (Nikolić i sar., 2014). Poput *Thymus* vrsta, i indijska nana *Satureja douglasii* ima zastupljena dva hemotipa koji se razlikuju u položaju oksigenacije (položaji 2 i 3) sintetisanih monoterpena (Lazarević, 2011), koji nastaju usled delovanja po biljku stresogenih faktora uključujući količinu svetlosti, vlažnost ili uticaj herbivora. Glavne aktivne komponente etarskog ulja origana, *Origanum vulgare*, su karvakrol (2-metil-5-(1-metiletil)fenol) i timol (2-izopropil-5-metilfenol) koji predstavljaju 30% odnosno 27% ulja (Bakkali i sar., 2008). Prema podacima iz literature koncentracija karvakrola u origanovom ulju može da bude i značajno viša, i do 68% (Choi i sar., 2012). U etarskom ulju cimeta, rod *Cinnamomum*, najzastupljenija aktivna komponenta je trans-cinamaldehyd (65%), a u etarskom ulju karanfilića, *Syzyglum aromaticum*, eugenol (60,5%) (Merchan Arenas i sar., 2011).

2.1.2. Primena etarskih ulja

Medicinsko dejstvo biljaka karakteristika je kojom se odlikuju određene vrste, a nosioci tog dejstva su njihovi sekundarni metaboliti sa izraženim specifičnim farmakološkim efektima (Rojas i sar. 1992; Bakkali i sar., 2008). Sekundarni metaboliti, među kojima su etarska ulja, imaju brojna farmakološka delovanja uključujući antiinflamatorno, antibakterijsko, antioksidativno, anestetičko i antidepresivno. Mnogi produkti sekundarnog metabolizma se odlikuju baktericidnim, repelentnim ili toksičnim delovanjem. Procenjuje se da oko 40% lekova u humanoj medicini vodi poreklo od sekundarnih metabolita biljaka, obuhvatajući prirodne ili hemijski modifikovane supstance (Thormar i sar., 2011).

Od davnina je poznato da etarska ulja imaju antiseptičku i antibakterijsku moć i već se vekovima koriste kao prirodni antibiotici. Etarska ulja se koriste u farmaceutskoj industriji i kozmetici u proizvodnji pojedinih preparata. Našla su svoju primenu u fitoterapiji i aromaterapiji u lečenju, prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja ljudi. Uspešno se koriste kod lečenja infekcija respiratornih puteva, kožnih oboljenja, jačanju imuniteta i oslobađanju od stresa. Etarska ulja se mogu upotrebljavati na različite načine kod kupke, inhalacije, direktnog nanošenja na određeni deo tela, masaže ili mirisnog oplemenjivanja prostora.

Brojna etarska ulja se koriste u medicini i aromaterapiji poseduju svojstva koja je teško povezati sa pojedinačnim određenim sastojkom, već za smešu aktivnih supstanci (Garabadu i sar., 2014).

Zbog svojih nutricionih i fizičko-hemijskih svojstava etarska ulja i njihove aktivne komponente su našle primenu u medicini, kozmetici i u konzervisanju namirnica (Bošković i sar., 2013), oralnim rastvorima registrovanim za ljudsku upotrebu (ALIMS, 2014a) pri čemu samo antimikrobno dejstvo u tim proizvodima uglavnom predstavlja samo dodatu vrednost gotovom proizvodu (added value).

Etarska ulja i njihove aktivne komponente imaju svoj značaj u veterinarskoj medicini u obogaćivanju ishrane, dezinfekciji (Vucinic i sar., 2012) i kao antiparazitici (Mahakittikun i sar., 2014). Na nematodu *Ascaris suum* karvakrol ispoljava antiparazitni efekat preko receptora gama-aminobutirinske kiseline i preko nikotinskih acetilholinskih receptora (Trailovic i sar., 2015). U Srbiji se etarska ulja primenjuju u hrani za životinje na primer kod potpune krmne smeše za zalučivanje prasadi, sa deklarisanom ulogom u prevenciji dijareje: Pan co. Profistart, (Patent co, Mišićevo Srbija). Na tržištu je prisutan i komercijalni preparat fitobiotik Enviva EO101 (Danisco Animal Nutrition) koji sadrži cinamaldehyd i timol u količini 18% w/w preparata, inkapsulirane u maltodekstrinski matriks.

Na tržištu postoji veći broj kozmetičkih preparata namenjenih za upotrebu kod životinjama sa repelentnim dejstvom na insekte koji sadrže etarsko ulje biljke nim (*Azadirachta indica*) i etarsko ulje lavande (*Lavandula angustifolia*), kao na primer ogrlica Leis Collar (Orme Naturali, Italija). Spot on preparat iste kompanije čije se repelentno dejstvo pored etarskog ulja nima, zasniva i na etarska ulja jojobe (*Simmondsia chinensis*) i badema (*Prunus amygdalus*), koga proizvođač preporučuje za

primenu kod više različitih vrsta odnosno kategorija životinja, u periodu laktacije, kod mladunaca i rekonvalescenata.

U Velikoj Britaniji registrovano je više lekova na biljnoj bazi, kao što su na primer tablete piskavice (*Trigonella foenum graecum*) i belog luka (*Allium sativum*) namenjene lečenju artritisa i zapaljenja paranalne žlezde pasa koje pored antimikrobnog ispoljavaju i antiinflamatorno dejstvo. Za smirivanje i supresiju simptoma estrusa mačaka preporučuju se tablete šiška (*Scutellaria lateriflora*) i valerijane (*Valeriana officinalis*). Protiv lažne trudnoće pasa i tokom graviditeta preporučuje se primena tableta od lista maline (*Rubus idaeus*). Gotov lek na bazi praha južno američkih biljaka kole (*Cola spp.*), damijane (*Turnera diffusa*) i plodova testeraste palme (*Serenoa repens*) primenjuje se protiv depresije i za podizanje budnosti pasa i mačaka (Dorwest Herbs Lts, Engleska), u biljci kole sa nalazi alkaloid kofein koga ima i u zrnu kafe (*Coffea sp.*). Biljni lek koji sadrži ekstrakte lista odnosno korena sene (*Senna spp.*), aloe (*Aloe barbadensis*), krkavine (*Rhamnus purshiana*), valerijane (*Valeriana officinalis*) i maslačka (*Taraxacum officinale*) namenjen je za terapiju i prevenciju konstipacije pasa i mačaka (Dorwest Herbs Lts, Engleska).

U japanskoj farmakopeji iz 2007. godine kao i u osmom izdanju evropske farmakopeje detaljno je opisan postupak spravljanja homeopatskih lekova, i pripreme 200 odnosno 1434 biljna pripravka.

Pri Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije postoji 1369 registrovanih biljnih lekova, 590 tradicionalnih biljnih lekova, i 5 registrovanih tradicionalnih lekova (ALIMS, 2014). U Srbiji nema registrovanih gotovih lekova za intramamarnu primenu u terapiji goveda na biljnoj bazi (ALIMS, 2014).

U organskom stočarstvu postoji potražnja za adekvatnim lekovima i zato na inostranom tržištu postoje organski intramamarni injektori za primenu kod goveda, ovaca i koza. Aplikator Phyto-Mast (Penn Dutch Cow Care, Narvon, SAD) sadrži 15ml leka koji je sastavljen od timola, etarskih ulja anđelike (*Angelica archangelica*), sladića (*Glycyrrhiza uralensis*) i zimzelena (*Gaultheria procumbens*). Ovaj preparat se primenjuje aplikovanjem dva injektora na početku terapije i po jedan naredne dve muže, a proizvođač propisuje i karencu za mleko od 12h i meso jedan dan od primene preparata. Ispitivanje efikasnosti ovog preparata pokazalo je da ima pozitivno dejstvo na brzinu oporavka grla nakon mastitisa, ali ne i snažno antibakterijsko dejstvo (Pinedo i

sar., 2013). U terapiji goveda u zasušenju primenjuje se preparat Cinnatube (New AgriTech, Locke, SAD), koji sadrži etarska ulja cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), čajnog drveta (*Melaleuca alterniflora*) eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*), nevena (*Calendula officinalis*) i pčelinji vosak. Primenom Phyto-Mast i Cinnatube preparata u zasušenju, kao i njihove kombinacije, postižu se podjednako uspešni rezultati u prevenciji mastitisa u narednoj laktaciji kao i kod uobičajene primene penicilina i streptomicina (Mullen i sar., 2014). Preparat Kilco Mas-Gel Intramammary Tubes (Kilco, Velika Britanija) je na bazi aloe (*Aloe barbadensis*) i glicerina, a predviđen je za upotrebu pri prvim znacima pogoršanja kvaliteta mleka i nema propisan period karence. Gel za intramamarnu upotrebu Captor Gel (AWP International, Italija) je namenjen za primenu pri blagom porastu somatskih ćelija u mleku, sadrži antiinflamatorne i baktericidne sastojke više različitih biljaka: vitelarije (*Vitellaria paradoxa*, sinonim: *Butyrospermum parki*), masline (*Olea europaea*), nevena (*Calendula officinalis*) i eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*). Pored preparata namenjenih aplikaciji u sisni kanal, postoji veći broj preparata na biljnoj bazi namenjenih za mazanje kože ili masažu vimena, koji pored antimikrobnog dejstva deluju antiinflamatorno. Krema na bazi nevena (*Calendula officinalis*) Blackspot Cream (NovaVet, Velika Britanija) namenjen je ozledama papile vimena i ubrzava zarastanje rana i nagnječenja na koži. Krema Uddermint (Teisen, Velika Britanija) sadrži 35% ulja japanske nane (*M. arvensis* var. *piperascens*, syn. var. *japonica*) i preporučuje se za terapiju edema vimena, pogotovo kod prvih muža prvotelki. Mazanje obolelog mesta Multiderm Dairy Salve (Norbrook, Irska) preporučuje se kod povreda nastalih fizičkom traumom vimena i sisa krava, a preparat sadrži ekstrakte čajnog drveta (*Melaleuca alterniflora*) i lana (*Linum usitatissimum*).

2.2. Mehanizam antibakterijskog dejstva etarskih ulja

Pošto etarsko ulje biljaka predstavlja smešu aktivnih komponenti, pretpostavlja se da sastojci etarskih ulja koji nisu količinski dominantni imaju, takođe, ulogu u antibakterijskoj aktivnosti, najverovatnije u vidu sinergističkog dejstva sa drugim komponentama (Gutierrez i sar., 2008; Rohani i sar., 2011). Za antimikrobnu aktivnost etarskih ulja je važna hemijska struktura pojedinih komponenti. Od najvećeg značaja je lipofilni karakter ugljovodoničnog skeleta i hidrofilni karakter funkcionalnih grupa.

Uopšteno gledano, aldehidi, fenoli i alkoholi spadaju u potentnije antimikrobne supstance, dok terpeni i metil estri imaju slabije antimikrobno dejstvo (Hammer i Carson, 2011). Antibakterijski potencijal aktivnih komponenti etarskih ulja može se prikazati sledećim redosledom (od najmanjeg ka najvećem): linalil acetat < limonen < β -pinen < α -pinen < kamfor < linalul < 1,8-cineol < mentol < timol < karvakrol (Sokovic i sar., 2010). Visoka aktivnost aldehida je verovatno posledica prisustva karboksilne grupe (R-COOH) koja može lako da reaguje sa alkoholima ili kiselinama. Fenoli i alkoholi imaju hidroksilnu grupu koja ima odavno poznato antiseptičko dejstvo i kao komponenta nepolarnih rastvarača doprinosi boljoj rastvorljivosti i olakšava vezivanje ovih jedinjenja za biološke membrane (Hammer i Carson, 2011). Komponente fenolne strukture su uglavnom odgovorne za antibakterijsko dejstvo etarskih ulja (Burt i sar., 2005).

Ispitivanja antibakterijskog delovanja etarskih ulja i njihovih aktivnih komponenti na mikroorganizme koji dovode do kvarenja hrane i na patogene koji se prenose putem hrane, pokazala su da je antibakterijska aktivnost etarskih ulja izraženija protiv Gram pozitivnih nego Gram negativnih bakterija (Gutierrez i sar., 2009; Hsouna i sar., 2011). Osetljivost Gram negativnih bakterija prema etarskim uljima manja je od osetljivosti Gram pozitivnih bakterija, zbog posedovanja lipopolisaharidne komponente spoljašnje membrane koja okružuje ćeliju i dodatno ograničava difuziju etarskog ulja u ćeliju (Thormar i sar., 2011). Aktivne komponente etarskih ulja, koja sadrže ciklične ugljovodonike, kao što su, karvakrol, euganol, cinamaldehyd i timol, ispoljavaju antibakterijsko dejstvo jer najverovatnije dezintegrišu spoljašnji deo ćelijske membrane i time povećavaju njenu propustljivost. Nakon primene cikličnih ugljovodonika na membrani bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) uočeno je zadebljanje hidrofobnog dvosloja ćelijske membrane praćeno promenom fluidnosti i otežanim radom protonske pumpe (Sikkema i sar., 1994). Zabeleženi nivo oštećenja plazma membrane bio je u direktnoj korelaciji sa hidrofobnošću primenjene aktivne supstance.

Tokom ispitivanja dejstva etarskog ulja čajnog drveta *Melaleuca alternifolia* na *E. coli* u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta uočena je indukcija autolize praćena oštećenjem citoplazme i ćelijske membrane uz pojavu zgusnutog materijala u vidu intracelularnog koaguluma i odvojenih delova ćelije u vidu malih ekstracelularnih mehura (Gustafson i sar., 1998).

Etarska ulja mogu ispoljiti svoje antibakterijsko delovanje sprečavanjem procesa transkripcije i translacije mikroorganizma. Glavna aktivna komponenta ekstrakta čajnog drveta, terpinen-4-ol, direktno utiče na regulaciju 10 gena *S. aureus* i sprečava njihovu transkripciju (Cuaron i sar., 2013). Ekstrakt čajnog drveta dovodi do inaktivacija gena toplotnog šoka (*dnaK* i *vraSR*) i posledično sprečavanje biosinteze peptidoglikana *S. aureus*. Pored toga ekstrakt čajnog drveta sprečava transkripciju *mmpL* gena odgovornog za deobu ćelije odnosno otpornost prema različitim hemijskim faktorima uključujući i na antibiotike, na primer aminoglikozide.

Aktivna komponenta cinamaldehyd prisutna u velikom broju etarskih ulja biljaka utiče negativno na sintezu DNK, RNK, proteina, lipida i polisaharida u bakterijskoj ćeliji, tako što zaustavlja respiratorni lanac, prenos elektrona i posledično oksigenaciju supstrata (Jia i sar., 2011). Karbonil grupa cinamaldehyda vezuje se za određene enzime *Enterobacter aerogenes* i time sprečava dekarboksilaznu aktivnost bakterije (Yossa i sar., 2012). Cinamaldehyd se odlikuje antifungalnim dejstvom i dovodi do oštećenja ćelijske membrane kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, stvarajući kanale i dovodeći do prekomernog isticanja metabolita i enzima iz ćelije i posledično smrti. Eugenol, karvakrol i timol su bliske hemijske strukture, pa im je farmakološko dejstvo po svemu sudeći sličnog mehanizma. Baktericidno dejstvo karvakrola verovatno leži u prekidanju kontinuiteta ćelijske membrane, s obzirom da je karvakrol lipofilna supstanca i da se selektivno nakuplja u tom delu bakterije (Ultee i sar., 1999). Karvakrol kod *Bacillus cereus* dovodi do potpunog gubitka intracelularnih zaliha ATP-a za 14 minuta nakon početka delovanja. Karvakrol pri koncentraciji od 0,01mM smanjuje potencijal membrane *B. cereus*, pri 0,15mM dolazi do ireverzibilnih promena u provodljivosti ćelijske membrane, pri 0,25mM do promene intracelularne pH vrednosti, a pri 1mM za 9 minuta prouzrokuje ireverzibilne promene praćene padom koncentracije kalijuma u ćeliji sa 12 μ mol/mg na 0,99 μ mol/mg (Ultee i sar., 1999). U ispitivanjima antimikrobnog dejstva etarskog ulja origana, koje je u sebi sadržalo 68% karvakrola i u koncentraciji od 500 μ l/ml, ustanovljen je inhibitorni efekat na sojeve *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 12692, 13301, 33591, 33593, 29213, 27659 i 27660 (Choi i sar., 2012). Aktivne komponente etarskih ulja deluju u značajno nižim koncentracijama nego kompletna etarska ulja. Ispitivanjem delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja na *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis

ATCC 13076 utvrđena je njihova antibakterijska efikasnost u koncentracijama 0,62μl/ml eugenola, 0,31μl/ml cinamaldehida, 0,156μl/ml timola i karvakrola (Ratajac i sar., 2008). U ispitivanju osetljivosti kliničkih izolata *S. aureus*, trans-cinamaldehyd je ispoljio je antimikrobno dejstvo u koncentraciji od 0,1%, a eugenol, karvakrol i timol od 0,5% (Ananda Baskaran i sar., 2009). Cinamaldehyd u koncentraciji od 800ppm karakterisao se baktericidnom aktivnošću prema *E.coli* O157:H7 i *Salmonella enterica* (Yossa i sar., 2012). Izolati *S. aureus*, uzročnika mastitisa iz Brazila, odlikovali su se osetljivošću na etarska ulja origana i timjana u koncentraciji od 800 do 3200μg/ml, ali i na niže koncentracije aktivnih komponenti datih ulja, karvakrola u koncentraciji od 200-1600μg/ml odnosno timola od 200-800μg/ml (Dal Pozzo i sar., 2011). Hemijski sastav etarskih ulja u određenim biljkama značajno se razlikuje, a samim tim različit je i intenzitet antimikrobnog delovanja različitih serija prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama (Thormar i sar., 2011). Rod *Pseudomonas*, pogotovo vrsta *P. aeruginosa*, ispoljava najmanju osetljivost na delovanje etarskih ulja (Burt i sar., 2005; Pogany Simonova i sar., 2010).

Osetljivost bakterija na aktivne komponente i nefrakcionisana etarska ulja ne zavisi od stepena rezistencije bakterija prema antibioticima, što je potvrđeno kod izolata *S. aureus* uzročnika mastitisa, kod kojih nije zabeležena različita osetljivost na etarska ulja između penicilin osetljivih i penicilin rezistentnih sojeva (Dal Pozzo i sar., 2011). Kako etarska ulja ispoljavaju efekat u subletalnim koncentracijama prema bakterijama, postavlja se pitanje mogućeg sinergističkog dejstva etarskih ulja sa antibioticima i njihove simultane primene u terapiji, pogotovo infekcija uzrokovanih rezistentnim sojevima bakterija.

Priroda samog delovanja etarskih ulja, i značajno viša zastupljenost glikolipida u ćelijskoj membrani gljivica, dovodi do potentnijeg efekta na ove eukariotske mikroorganizme nego na bakterije, pa je antimikotično dejstvo okarakterisano nižim MIC vrednostima (Nikolić i sar., 2014; Inouye i sar., 2007). Ovo zapažanje se ne odnosi na sva etarska ulja i aktivne komponente tako da ima i suprotnih primera njihovog jačeg delovanja prema bakterijama (Nikolić i sar., 2013).

2.3. Toksičnost etarskih ulja

Izreka da samo doza doprinosi da je neka supstanca otrov (*Sola dosis venenum facit*) (Paracelsus 1493–1541) može se primeniti i kod etarskih ulja. Određeni broj ovih ulja i njihovih sastojaka pokazao se kao bezbedan (generally regarded as safe - GRAS) i kao takvi se tradicionalno koriste u ishrani ljudi kao aromatični dodaci hrane (Gutierrez i sar., 2009). Ali u zavisnosti od koncentracije odnosno doze pojedina etarska ulja i/ili njihove komponente mogu delovati iritirajuće i toksično. Karvakrol se karakteriše antibakterijskim, antifungalnim i antikancerogenim efektom, ali pri koncentracijama većim od 100µg/ml smanjuje vijabilnost ljudskih limfocita (Turkez i Aydin, 2013). Citotoksično dejstvo eugenola zavisi od ciljnog tkiva odnosno kulture tkiva koja je primenjivana u ispitivanju, u koncentraciji manjoj od 600µM u ćelijskoj liniji ljudskih fibroblasta VH10 zabeleženo je oštećenje DNK, u Caco-2 liniji ćelija poreklom iz kolona uočene su promene manjeg intenziteta dok je toksičan efekat izostao kod linije HepG2 ćelija poreklom iz jetre (Slamenova i sar., 2009). Etarsko ulje rogača *Ceratonia soliqua* koji je sadržao 2,07% terpena ispoljilo je selektivni afinitet prema tumorskim ćelijama uz slabi citopatogeni efekat prema normalnim ćelijama (Hsouna i sar., 2011). Timol i karvakrol usled svog antioksidativnog, antiinflamatornog i antiapoptičkog dejstva ispoljavaju pojedinačno ili sinergistički nefroprotektivni efekat (Em i sar., 2014). Poznato je da primena lekovitih biljaka, samim tim njihovih etarskih ulja i aktivnih komponenti, može dovesti do alergijskog dermatitisa kod ljudi pa prilikom upotrebe ovih sastojaka treba primeniti adekvatne zaštitne mere. Na osnovu većeg broja radova i praćenja procenata preživljavanja ćelija može se zaključiti da su najveći stepen citotoksičnosti odnosno negativnog efekta prema eukariotskim ćelijama pokazali etarsko ulje timijana, a zatim karvakrol i timol čija je vrednost minimalne inhibicije 50% ćelija (IC50) iznosila manje od 0,5µl/ml podloge. Za razliku od njih eugenol pokazuje malu inhibiciju rasta ćelija sa IC50 vrednostima između 0,5 µl/ml i 1µl/ml podloge. Na BEND ćelijskoj liniji poreklom od endometrijuma krave utvrđen je sledeći redosled neškodljivosti aktivnih komponenti ispitivanih etarskih ulja: mentol > eugenol > timol > karvakrol. Upoređujući sa ispitivanjima na drugoj ćelijskoj liniji MDBK, Madin Darby ćelije bubrega goveda, dobijeni rezultati su bili slični, sa redosledom netoksičnosti aktivnih komponenti: mentol > eugenol > karvakrol > timol. Redosled komponenti etarskih ulja, od onih koje imaju snažnu antibakterijsku aktivnost, a pritom

imaju nisku citotoksičnost, izražen kroz količnik IC50 / MIC od većeg ka manjim, za ćelijsku liniju BEND: timol, karvakrol, eugenol i mentol, dok je za ćelijsku liniju MDBK nakon ekspozicije od 24 časa: eugenol, karvakrol, mentol i timol (Ratajac, 2013). Etarsko ulje origana (La Fitta Viva, Leskovac Srbija) sadrži upozorenje da nije za primenu na životinjama, pogotovo na mačkama.

Citotoksična aktivnost etarskih ulja i njihovih aktivnih komponenti u uslovima *in vitro*, daju samo pretpostavku citotoksičnog dejstva *in vivo*, jer ni transport niti biotransformacija aktivnih materija nisu identični u kulturama ćelija i životinjskom organizmu. Većina modela kultura ćelija ima jedan sloj ćelija koji se dovodi u direktan kontakt sa ispitivanom komponentom u hranljivoj podlozi i inkubira do 96 časova, što je malo verovatno da se može dogoditi *in vivo* (Ratajac, 2013).

2.4. Mastitis krava

Mastitis ili upala vimena je bolest poznata kod svih domaćih životinja sisara i predstavlja čest problem koji se javlja u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji. Krave sa upalom vimena daju manje mleka, lošijeg kvaliteta, koje osim što nije bezbedno za ishranu ljudi, često nije pogodno ni za preradu. Mastitis u užem smislu je definisan kao zapaljenje mlečne žlezde koje je rezultat dejstva patogenih mikroorganizama (Hermans i sar., 2004; Heldman, 2005). Šteta koja nastaje lečenjem, odbacivanjem mleka u periodu karence i pratećom negom dovodi do smanjene rentabilnosti proizvodnje i onemogućava postizanje potrebnog broja laktacija. Mastitisi najčešće nastaju u prvim mesecima nakon telenja i pretežno oboljevaju visokomlečne krave (McDougall i sar., 2009). Kod životinja mastitis najčešće izazivaju različite bakterije, u 95 – 98% slučajeva, dok su drugi infektivni agensi (gljivice, alge i virusi) od manjeg značaja. Od kontagioznih bakterijskih uzročnika mastitisa najznačajniji su *S. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strep. uberis*, *Mycoplasma* spp. i *Corynebacterium bovis* (Hillerton i Berry, 2005). Preko trideset godina posebno se ističu *S. aureus* i *S. agalactiae* kao zarazni patogeni koji se odlikuju brzim širenjem u stadima dovodeći do velikog broja inficiranih četvrti (Philpot, 1979). Trenutno u svetu *S. aureus* je najčešće izolovani patogen kod supkliničkih i hroničnih mastitisa krava (Nielsen, 2009, Tiezzi i sar., 2015). Literaturni podaci o udelu intramamarnih infekcija vimena prouzrokovanih *S. aureus* vrlo variraju usled rasnog sastava, različitih uslova, nege i zdravstvene kontrole farmi. U Kini *S.*

aureus je treći najzastupljeniji uzročnik mastitisa, izolovan iz 41% obolelih krava (Cheng i sar., 2010) Prema stratifikovanom uzorku u Kanadi utvrđeno je prisustvo *S. aureus* kod 74% stada, odnosno 40% muznih grla (Olde Riekerink i sar., 2010). U Nemačkoj državi Hesens, prevalencija mastitisa se kreće od 0% do 68% krava u laktaciji na različitim farmama, odnosno od 0% do 27% četvrti u laktaciji (Sommerhäuser i sar., 2003). U Iranu, iz uzoraka mleka krava obolelih od mastitisa, od stafilokoka najčešće su izolovani: *S. aureus* (44,44%), zatim *S. hyicus* (22,22%) i *S. intermedius* (5,55%) (Ebrahimi i Taheri, 2009). U našem regionu supklinički mastitisi su u Mađarskoj utvrđeni kod 57,63% četvrti u laktaciji, a prisustvo *S. aureus* kod 10% muznih krava (Janosi i Baltay, 2004).

Podaci o prevalenciji mastitisa u Srbiji uzrokovanih *S. aureus* variraju u zavisnosti od biosigurnosnih i zootehničkih mera na farmama muznih krava. U Srbiji od koagulaza pozitivnih stafilokoka *S. aureus* predstavlja najčešću vrstu uzročnika mastitisa goveda prisutnog kod 88% slučajeva, a pored njega poslednjih godina su dokazani *S.intermedius* i *S.hyicus* (Rajic Savic i sar., 2014). Oko 30% krava u mlečnim stadima tokom života oboli od nekog oblika mastitisa. Klinička forma mastitisa je retka i obuhvata od 3 do 5% stada (Vakanjac i sar., 2010). U zavisnosti od menadžmenta stada i uslova držanja prevalencija mastitisa uzrokovanih *S. aureus* kreće se u rasponu od 10,94% do 15% krava sa u formi kliničkog i subkliničkog mastitisa (Hristov i sar., 2005). Opisana je u Srbiji pojava mastitisa prouzrokovanog *S. aureus* kod 53% grla u zapatu, ali na samoj farmi nisu sprovedene adekvatne mere prevencije (Magaš i sar., 2013). Može se smatrati da je broj obolelih grla od mastitisa prouzrokovanih *S. aureus* u rasponu od 19% do 40% ukupnog broja mastitisa (Vakanjac i sar., 2008). Prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka u vimenu ne znači nužno i mastitis. U vimenu se može uspostaviti latentna infekcija, kada data jedinka predstavlja stalni izvor infekcije za ostale zdrave krave, a infekcija može da se kasnije razvije u klinički manifestan mastitis (Rajić Savić, 2014).

Mastitis je multifaktorijalno oboljenje i didaktički se faktori nastanka oboljenja mogu podeliti u sledeće klase (Thrusfield, 2007):

- Predisponirajući faktori, faktori koji povećavaju prijemчивost životinje kao što su: godine starosti, imunološki status, građa sisa i vimena;

- Olakšavajući faktori pojave bolesti (smeštaj - nehigijenski uslovi držanja, mokra, prljava, prašnjava i zagađena prostirka, nečista štala, hladan betonski ležaj, promaja, napajanje ledenom vodom; ishrana - smrznuta hrana, plesnivo seno; muža – neadekvatna muzna tehnologija, nepravilna ručna muža pri izmuzavanju);
- Uročnik: infektivni agensi svojim stepenom patogenosti tj. virulencom i faktorima virulence definišu pojavu i tok infekcije;
- Pojačavajući faktori koji pogoršavaju bolest kao što su: konstantno izlaganje patogenima pri supresiji imunog sistema, nedezinfikovana muzna oprema i nagle promene spoljašnje temperature.

Povoljne uslove za nastajanje mastitisa predstavlja slabo zdravstveno stanje, odnosno oslabljena otpornost organizma, do čega najčešće dovode različite bolesti ili greške u ishrani krava, zatim hladnoća, vlaga, loši podovi u staji, prljava prostirka, nepravilna mašinska muža, ručna muža savijenim palcem koja dovodi do nagnječenja sisnog kanala, različite povrede vimena i dr. Lošom dezinfekcijom se dozvoljava umožavanje bakterija i njihova kolonizacija unutar mlečne žlezde na površini mlečne cisterne, kanalima i samoj alveoli. Nepotpuno izmuzanje i zadržavanje mleka u vimenu pogoduje nastajanju upale vimena. Bakterije prodiru u vime preko sisnog kanala čemu doprinosi i zadržavanje mleka na vrhu samog kanala. Različite urođene ili nasledne nepravilnosti u građi papile (uvučeni i tanjirasti vrh papile, prevelike ili premale papile, kao i prekobrojne papile - pasise) i građi vimena (stepeničasto vime, kozije vime, slabo vezano vime uz struk, širina mlečnih kanala i dr.), oštećen sisni kanal ili Fistenbergova (Fürstenberg) rozeta predisponiraju pojavu infekcije.

Usled neadekvatne muže ili traume vimena nastaju mikrolezije i eksponiraju se molekuli međućelijske supstance. Za ove molekule se mogu priljubiti određene bakterije, koje nakon umožavanja mogu prodreti dublje u tkivo. Izolovan *S. aureus* u slučajevima mastitisa krava može da se veže sa fibronektin, fibrinogen, laminin i različite tipove kolagena *in vitro* (Zecconi, 2010). Tokom umožavanja bakterija, pre svega *S. aureus*, u vimenu stvaraju se citotoksične materije koje dovode do patoloških promena praćenih reakcijom urođenog imuniteta uključujući infiltraciju neutrofilnih granulocita i inflamacijom. Agregacija neutrofilnih granulocita i otpuštanje medijatora zapaljenja i drugih produkata dovodi do pojave „krpica” u mleku i interalveolarnog

edema. Nastali mešoviti agregati mogu da dovedu do zapušanja mlečnog kanala i time do staze mleka i posledične involucije lobusa mlečne žlezde (Hermans i sar., 2004). Oslobođeni citokini stimulatивно deluju na fibroblaste, makrofage i limfocite i otpočinju reparacioni procesi i buja intraalveolarno vezivno tkivo. Bakterije perzistiraju u alveoli i kanalima i intermitentno se izbacuju u mlečnu cisternu. Naglo umnožavanje *S. aureus* može dovesti do pojave gnoja u mleku i apscesa u mlečnoj žlezdi. Terapijski neuspeh lečenja je češći kod grla kod kojih je mastitis prisutan u više četvrti, i kod kojih je preporuka da se zbog visokog rizika od rekurentnih infekcija upute na ekonomsko iskorišćavanje.

Prema formi bolesti mastitis može biti klinički i supklinički. Kod kliničkog mastitisa su manifestne promene kod životinje, mlečne žlezde ili mleka a sama infekcija protiče u akutnom ili ređe u perakutnom toku. Kod supkliničkog mastitisa izostaju klinički vidljive promene, mleko je blago promenjeno u sastavu i postoji blagi odgovor organizma na prisustvo mikroorganizama, pa se dijagnostikovanje vrši indirektno, pomoću testova kao što su: utvrđivanje broja somatskih ćelija, elektroprovodljivost mleka, sadržaj NaCl, koncentracija C reaktivnog proteina, medijatora zapaljenja, itd.

Klinički mastitis prouzrokovan *S. aureus* može varirati od blagog toka do perakutnog gde se javlja gangrena i ozbiljan poremećaj opšteg stanja. U nekim zapaćtima mastitis prouzrokovan *S. aureus* se širi brzo i zahvata visok procenat muznih grla, dok u drugim zapaćtima infekcija se širi sporo, stagnira i ograničena je samo na određena grla, što pre svega zavisi od faktora virulencije dominantnog klona *S. aureus* (Sommerhäuser i sar., 2003). Razlog za veliku rasprostranjenost intramamarnih infekcija izazvanih *S. aureus* je povezan sa karakteristikama ove bakterije kao i generalnog nerazumevanja epidemiologije zaraze koja vodi do neefikasnih mera kontrole (Zecconi, 2010). Mere kontrole treba da obuhvate mnogo razlićitih aspekata i nije ih moguće uvek pokriti sve odjednom. U cilju kontrole mastitisa primenjuju se i fizićko odvajanje junica od starijih krava kao i zabrana napajanja teladi mlekom krava koje imaju mastitis (McDougall i sar., 2009).

Glavni cilj epidemioloških istraživanja je da se identifikuju rezervoari specifićnih patogena i putevi infekcije. U odnosu na epidemiološke karakteristike, izazivaći mastitisa podeljeni su u dve glavne grupe: patogeni sa glavim rezervoarom u inficiranim

četvrtinama vimena i patogeni iz okruženja koji se mogu naći u okolini u kojoj krave borave (Sommerhäuser i sar., 2003; Zecconi, 2010).

Za razliku od stada gde se *S. aureus* brzo širi inficirajući veliki broj životinja, postoje i stada gde se odlikuje malom tendencijom širenja. Samo širenje infekcije u najvećoj meri zavisi od biotipa odnosno dominantnog klona *S. aureus* u stadu (Sommerhäuser i sar., 2003; Xu i sar., 2008). Učestalost infekcije vimena krava je najveća u poslednoj trećini graviditeta, a prevalencija pojave mastitisa je veća kod junica nego kod krava (Barkema i sar., 2006; McDougall i sar., 2009). U borbi protiv mastitisa odnosno kod adekvatnog izbora preventivnih i kontrolnih mera ključno je identifikovati faktore koji dovode do oboljenja (Dohoo i sar., 2003). Dobar menadžment farme ili primena efikasne terapije ublažavaju negativne efekte jednog ili više faktora rizika, i time smanjuju pojavu i učestalost mastitisa u stadima (Zecconi, 2010).

Stočarska proizvodnja u oblasti mlekarstva u Srbiji, suočava se sa velikim izazovima na rastućem međunarodnom tržištu (CAP EU). Pripreme za ukidanje kvota za proizvodnju mleka u Evropskoj uniji su otpočele 2010. godine (European Commission, 2010) i od 01.04.2015. proizvodnja mleka je u potpunosti liberalizovana. U Republici Srbiji jedino ekonomski održiva proizvodnja mleka u novonastalim okolnostima može da izdrži nalet uvoza sirovog mleka i mleka u prahu iz zemalja EU. Optimizacija troškova proizvodnje je neophodan uslov za održivost farmi mlečnih grla. Da bi se postigla neophodna isplativost, moraju se sagledavati troškovi koji mogu nastati usled smanjenja proizvodnje, troškova veterinarskih usluga i povećanog remonta stada (Nielsen, 2009).

Tokom 2007.godine, je učestalost lečenih grla od kliničkog mastitisa iznosila 16% u Švedskoj. Bolesti vimena uključujući defekte u građi vimena sa posledičnim visokim brojem somatskih ćelija u mleku su najznačajniji razlog povlačenja grla iz proizvodnje u Švedskoj. Od ukupnog broja grla isključenih iz proizvodnje 26% mlečnih grla je bilo usled bolesti vimena, a 10% usled poremećaja vimena i visokog broja somatskih ćelija u mleku (Swedish Dairy Association, 2008) (Nielsen, 2009). Prevalencija mastitisa je verovatno i veća jer mnogi proizvođači interno prate broj somatskih ćelija u mleku i pristupaju lečenju bez zvaničnog obaveštavanja.

Prevenција mastitisa zahteva dodatne troškove, ulaganja u stručne konsultacije, lekove i veterinarsku službu. Dodatni troškovi proizvodnje moraju da obezbede bolju rentabilnost farme i poboljšanje randmana mleka po grlu (kvantitativno i kvalitativno).

Informisanje o troškovima i izgubljenoj dobiti je od suštinskog značaja za razumevanje problema i donošenja adekvatnih odluka u menadžmentu stada. Ekonomske štete izazvane mastitisima i upravljanje proizvodnjom koja uključuje lečenje obolelih četvrti, povlačenje grla iz proizvodnje, odbacivanje mleka dovodi do povećanja cene proizvodnje mleka i smanjenja rentabilnosti (McDougall i sar., 2009).

2.5. Rod *Staphylococcus* i vrsta *Staphylococcus aureus*

2.5.1. Istorijat i osnovne karakteristike

Naziv Stafilokok (*Staphylococcus* – lat) je prvi upotrebio Ogston 1883. godine. On je ovim pojmom opisao grupu mikrokoknih bakterija koje izazivaju upalne i gnojne procese. Prvi je i diferencirao, prema izgledu na mikroskopskim preparatima, dva tada poznata tipa piogenih koka na grupu koja se na raspoređuje u mase nalik na grozdove i nazvao ih stafilokoke (*Staphylococcus*) i na grupu koja formira lance – Bilrotove Streptokoke (*Streptococcus*). Formalan opis roda *Staphylococcus* je uradio Rosenbah (1884), podelivši ovaj rod u dve vrste *S. albus* i *S. aureus*.

Nakon ispitivanja biohemijskih reakcija i odnosa prema domaćinu, Flug je 1886. godine, izdvojio rod *Micrococcus*. Primetio je da stafilokoke razmekšavaju želatin i da su patogene, dok su mikrokoke saprofitne i varijabilno deluju na želatin. Rodovi *Staphylococcus*, *Micrococcus* i *Planococcus* su svrstani u familiju *Micrococcaceae* na osnovu pozitivne reakcije sa vodonik peroksidom – katalaza testa. Sredinom 1960-tih godina pronađeno je da je odnos guanina i citozina u DNK stafilokoka 33-40mol% (Götz i sar., 2006). Sve do sredine sedamdesetih godina pripadnici roda *Staphylococcus* su bili podeljeni u tri vrste: koagulaza pozitivni *S. aureus*, i koagulaza negativne *S. epidermidis* i *S. saprophyticus* (Götz i sar., 2006).

Prema sposobnosti da koagulišu plazmu kunića (koagulaza test) dugo su razvrstavane kao patogene i nepatogene (Salle, 1967), a danas ta podela sve više gubi na značaju jer su ustanovljene i patogene koagulaza negativne vrste ovog roda (Smeltzer i Beenken, 2013). Koagulaza pozitivne vrste su *S. aureus*, *S.intermedius*, *S.pseudintermedius*, *S.delphini*, *S.schleiferi* i *S.hyicus*. Dugo je *S.schleiferi* svrstavan u koagulaza negativne bakterije dok 1990. godine nije pronađen koagulaza pozitivan soj iz uha psa. Tada ova vrsta razdvojena u dve podvrste *S.schleiferi coagulans* koja je koagulaza pozitivna i *S.*

schleiferi schleiferi koja je koagulaza negativna (Hermans i sar., 2004). Međusobna diferencijacija pripadnika roda *Staphylococcus* se može vršiti: prema fenotipskim osobinama (fermentacija ugljenih hidrata i iskorišćavanje različitih supstrata) i prema genotipskim razlikama na osnovu građe različitih seminkonzervativnih gena kao što su: gen za 16S RNK, *nuc*, *sodA* i *hsp60* (Sasaki i sar., 2007; Sasaki i sar., 2010).

Rod *Staphylococcus* se dopunjuje novim opisima vrsta, pa je prema Götz i saradnicima obuhvatao 36 vrsta 2006. godine, prema Quinn i saradnicima 43 vrste 2011. godine, a danas broji 52 opisane vrste (<http://web.horde.org/bacterio.cict.fr>).

U zavisnosti od vrste i virulencije soja kao i predispozicije domaćina, *Staphylococcus* spp kod domaćih životinja i ljudi prouzrokuje:

- Gnojna i septikemična oboljenja
- Gnojne procese na koži, potkožnom tkivu i sluznicama, apcese
- Mastitise – infekciju mlečne žlezde
- Sistemske infekcije.

Tri najznačajnije patogene vrste kod domaćih životinja su *S. aureus*, *S. pseudintermedius* i *S. hyicus*.

Tipični izolati *S. aureus* u veterinarskoj medicini, uzrokuju infekcije svih vrsta sisara. Kod krava prouzrokuje mastitis i impetigo, kod ovaca mastitis, pijemiju, folikulitis i dermatitis, kod koza mastitis i dermatitis, kod svinja botriomikozu, mastitis i impetigo, kod konja botriomikozu i mastitis, kod pasa i mačaka gnojne infekcije, kod živine artritis i septikemiju ćuraka, odnosno bolest bumbarove noge i omfalitis kod kokošaka. Kod svih vrsta životinja *S. aureus* predstavlja veoma značajnog uzročnika neonatalih septikemija i infekcija rana.

S. pseudintermedius kod pasa dovodi do piodermije, endometritisa, cistitisa, otitis eksterne i drugih gnojnih procesa. Kod mačaka *S. intermedius* može prouzrokovati razne gnojne procese.

S. hyicus izaziva eksudativni epidermitis i artritis svinja.

Kod zdravih, imunokompetentnih životinja, bakterije roda *Staphylococcus* uključujući *S. aureus* kolonizuju kožu, intestinalni trakt i nazofarinks što po pravilu protiče bez simptoma. Široka rasprostranjenost i nalaz na koži, sluznicama i adneksima kože, ukazuje da su *Staphylococcus* vrste sastavni deo normalnog mikrobioma životinja i ljudi (Manian, 2003; Frank i sar., 2003; Juhász-Kaszanyitzky, 2007).

Faktori virulencije kojima raspolažu stafilokoke uključujući i *S. aureus* u određenim situacijama dovode do proboja imunološke zaštite i do nastanka, oportunističkih infekcija. Ovi patogeni mikroorganizmi su odgovorni za veliki broj patoloških stanja, počev od infekcija koje potencijalno mogu biti opasne po život, kao što su septikemija i toksični šok sindrom, do alimentarnih oboljenja.

S. aureus i *S. epidermidis* mogu da kolonizuju razna medicinska sredstva – aparate, adheriranjem na površine i formiranjem biofilma postaju slabije osetljivi na antibiotike i dezinficijense (Arciola i sar., 2012). Stafilokoke zbog sposobnosti formiranja biofilma, predstavljaju veoma značajne uzročnike infekcija u bolnicama, koje se dovode u vezu sa upotrebom medicinskih aparata i instrumenata (Farran i sar., 2013).

Kada se posmatra bolničko okruženje, glavni klinički problem su sojevi *S. aureus* koji se odlikuju rezistencijom na meticilin (MRSA). Ovaj problem se usložnjava činjenicom da MRSA, pored rezistencije na sve β laktamske antibiotike (osim pojedinih cefalosporina sa anti-MRSA aktivnošću kao što su ceftarolin i ceftobiprol), može da poseduje i gene rezistencije na druga antimikrobna sredstva. Ovakva evolucija ove patogene bakterije je dovela do toga da postoje izolati koji su rezistentni prema celokupnoj paleti antimikrobnih sredstava. (Hermans i sar., 2004).

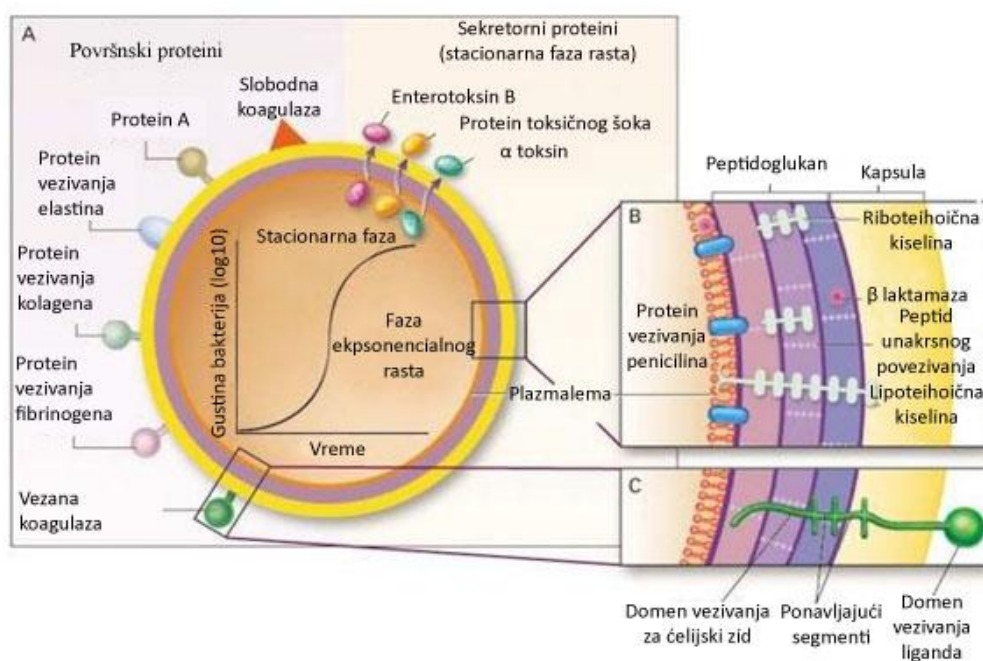
Bakterije roda *Staphylococcus* se karakterišu okruglim oblikom (koke), veličinom od 0,5-1,5 μ m i pozitivnim bojenjem po Gramu. Deoba se vrši u više ravni, zbog čega se na preparatima u svetlosnoj mikroskopiji uočavaju najčešće u grupacijama u obliku grozdova, mada mogu biti pojedinačne, u parovima, u kraćim lancima ili u obliku tetrada. Bojenje treba vršiti na mlađim kulturama (18-24h), jer u starijim se mogu obojiti negativno po Gramu. Pripadnici roda *Staphylococcus* su oksidaza negativni izuzev *S. lentus*, *S. sciuri* i *S. vitulus*. Sve vrste su katalaza pozitivne osim *S. aureus* susp. *anaerobius* i *S. saccharolyticus*, jedine dve vrste striktnih anaeroba u ovom rodu. Sve ostale vrste su aerobni i fakultativno anaerobni mikroorganizmi.

Dobar rast na većini uobičajnih hranljivih podloga je odlika bakterije *S. aureus*. Na agaru sa dodatkom ovčje ili goveđe krvi, u količini od 5%, stvara dvostruku (target) hemolizu. Na agaru formiraju kolonije veličine 1 – 2mm, okrugle, glatke, neprozirne, sjajne i konveksne nakon inkubacije od 18 – 24 časa. Nakon produžene inkubacije veličina kolonije može biti preko 4mm. Neke *Staphylococcus* vrste se odlikuju stvaranjem karotenoidnog pigmenta, tako da je većina kolonija *S. aureus* izolovanih od

ljudi zlatno žuto boje (*aurum*, lat. - zlato), dok su kolonije vrsta *S. hyicus* i *S. intermedius*, koje nemaju ovaj pigment, bele boje.

2.5.2. Rasprostranjenost, otpornost i faktori virulencije

Stafilokoke su omnitropni, široko rasprostranjeni mikroorganizmi u prirodi. Prisutne su u vodi, zemlji, prašini i vazduhu (Van der Zee i sar., 2013; Okesola, 2011) Kao komensali prisutni su na koži i sluzokožama ljudi i životinja, na gornjim delovima respiratorog trakta i nižim delovima urogenitalnog trakta. Primarni habitat *S. aureus* su nazofarinks i koža ljudi i životinja, koji i predstavljaju najznačajniji rezervoar i izvor infekcije (Okesola, 2011) Pojedine vrste ovog roda pokazuju selektivan afinitet prema određenim životinjskim vrstama. Stafilocoke su otporne na sušenje tako da se u prašini i raznim predmetima mogu dugo održati. Kao odraz adaptacije na stresogenu sredinu mogu formirati biofilm. Otporne su na visoke koncentracije kuhinjske soli (NaCl) i šećera što je iskorišćeno za pripremu selektivnih podloga koje sadrže i do 10% NaCl. Ova osobina omogućava im da se dugo održe u slanim i slatkim namirnicama i da u njima produkuju toksine. Temperatura od 60°C ih uništava za jedan sat, dok neke vrste mogu duže vreme opstati na temperaturi od 80°C (Quinn i sar., 2011). Faktori virulencije se didaktički dele na faktore fizički povezane sa ćelijom i na egzotoksine i egzoenzime (šema 1).



Šema 1. Šematski prikaz faktora virulencije *S. aureus* (Lowy, 1998)

Kod klinički najznačajnije vrste stafilokoka kod ljudi i životinja *S. aureus* faktori virulencije se prema funkciji mogu podeliti na (Gordon i Lowy, 2008):

- a) faktore koji omogućavaju vezivanje (koagulaza-klamping faktor, proteini vezivanja fibrinogena (fibronectin-binding proteins), kolagena i sialoproteina kosti (sialoprotein-binding protein).
- b) faktore koji omogućavaju opstanak *S. aureus* (intracelularni opstanak, stvaranje specifičnih „malih” kolonija i formiranje biofilma).
- c) faktore koji učestvuju u izbegavanju i/ili uništavanju odbrambenih mehanizama domaćina (leukocidini (Panton - Valentin leukocidin PVL), γ -toksin/hemolizin, kapsularni polisaharidi, protein A, protein inhibicije hemotakse (chemotaxis inhibitory protein of staphylococci CHIPS), ekstracelularni protein prijanjanja (extracellular adherence protein EAP) i modulini rastvorojivi u fenolu.
- d) faktore koji učestvuju u prodiranju u tkivo (proteaze, lipaze, nukleaze, hijaluronat lijaza, stafilokinaza, fosfolipaza C i elastaze - metaloproteinaze).
- e) faktore koji dovode do intoksikacije i/ili nastanka sepse (enterotoksini, toksični šok sindrom toksin 1 (TSST-1), eksofolijativni toksini A i B, - α hemolizin, peptidoglikan i lipoteihoična kiselina).
- f) faktore sa nerazjašnjenom ulogom u virulenciji (koagulaza, mobilni element katabolizma arginina (arginine catabolic mobile element ACME), bakteriocin.

Protein A se nalazi na površini bakterijske ćelije, vezuje Fc region antitela IgG klase i time narušava orijentaciju IgG molekula i posledično onemogućava opsonizaciju i fagocitozu (Götz i sar., 2006). Vezujući deo proteina A se nalazi na njegovom N kraju koji je izložen na površini bakterijske ćelije (Lowy, 1998). Tipiziranjem gena koji kodira protein A dobijaju se *spa* tipovi značajni za epidemiološke i epizootiološke analize prisustva i širenja *S. aureus*, a sam polimorfizam proteina A se primenjuje u svrstavanju izolata u određene srodne grupe - klastere (Zecconi i sar., 2006). Kapsularni polisaharid sprečava vezivanje antitela za stafilokoke i indukuje oslobađanje citokina od strane monocita, epitelnih i endotelih ćelija (Götz i sar., 2006).

Ćelijski zid stafilokoka sačinjen je pretežno od peptidoglukana koji se sastoji od naizmenično β 1,4 vezanih N-acetilglukozamin i N-acetilmuraminske kiseline. Lanci acetilizovanih glukana poprečno su povezani tetrapeptidnim lancima kao i

pentaglicinskim mostom koji je specifičan za *S. aureus* (Lowy, 1998). Peptidoglukan može ispoljiti aktivnost sličnu endotoksinu, stimulišući otpuštanje citokina iz makrofaga, aktivaciju komplementa i nakupljanje trombocita.

Postoji 11 različitih tipova polisaharidnih mikrokapsula koji su prisutni kod *S. aureus*. Najveći broj meticilin rezistentnih *S. aureus* (MRSA) poseduje kapsulu tipa 5 (Lowy, 1998). Među prvim primenjenim vakcinama kod muznih grla u kontroli mastitisa bila je inaktivisana vakcina pripremljena od *S. aureus* kapsularnog tipa A i B (Zecconi, 2010). Peptidoglukan i lipoteihoična kiselina se smatraju za važne faktore virulencije *S. aureus*. Zajednički ova dva faktora mogu dovesti do pojave šoka, mada niti izolovana lipoteihoična kiselina niti peptidoglukan samostalno ne dovode do datog simptoma na modelu pacova (Götz i sar., 2006). Adhezini su molekuli koje ove bakterije mogu eksprimirati na svojoj površini i tako omogućavaju ili poboljšavaju vezivanje sa proteinima tkivne međucelijske supstance kao što su fibronektin, laminin, vitronektin i kolagen. Neki sojevi vezuju i fibrinogen što se fenotipski može utvrditi klamping (clumping) testom. Posedovanje ovog faktora virulencije olakšava bakteriji vezivanje za tkivo oštećeno traumom (Götz i sar., 2006).

Koagulacija plazme kunića je uslovljena sa dva enzima: vezanom i slobodnom koagulazom, odnosno klamping faktorom (*eng. clumping*) i koagulazom u užem smislu. Klamping faktor spada u familiju adhezina, dok koagulaza u užem smislu vezuje protrombin domaćina i formira kompleks stafilotrombin. Proteazna aktivnost ovog kompleksa pretvara fibrinogen u fibrin. Bakterije ovog roda okružene fibrinom na svojoj površini ili u neposrednoj okolini izbegavaju fagocitozu. Gen koji kodira koagulazu (*coa*) odlikuje se manjim promenama sekvence i njegov polimorfizam može se koristiti za diferencijaciju izolata u okviru iste vrste što daje vredne podatke u epizootiološkim i epidemiološkim studijama (Gharib i sar., 2013; Kalorey i sar., 2007). Lipaza i FAME (fatty acid metabolising enzyme) imaju negativan efekat na imuni odgovor. U sklopu reakcije na infekciju, makroorganizam može proizvoditi supstance koje sadrže lipide i masne kiseline, a imaju ulogu deterdženta i surfaktanta i tako onemogućavaju prijanjanje bakterija (Götz i sar., 2006). Takođe nije isključeno da ovim putem bakterije dolaze do dela hranljivih sastojaka. Hijaluronidaza i hijaluronliaza su enzimi koji razgradnjom hijaluronske kiseline olakšavaju širenje stafilokoka sa primarnog mesta infekcije, pojačavaju njihovu invazivnost predstavljajući važan faktor

virulencije (Götz i sar., 2006). I proteaze doprinose stepenu patogenosti stafilokoka, a najbolje opisana je V8 proteaza koja vezuje i inaktivise IgG antitela *in vitro*, razgrađuje protein vezivanja fibronektina i pospešuje širenje bakterija u tkivo. Druge proteaze inaktivisu odbrambene produkte ćelija makroorganizma kao što su defenzini neutrofilnih granulocita.

Fenotipsko dokazivanje sposobnosti *Staphylococcus* vrsta da razgrađuju DNK se vrši na DNK agaru. Gen koji kodira formiranje termostabilne nukleaze (*nuc*) javlja se u više različitih formi i kao takav se može koristiti za diferencijaciju različitih vrsta u okviru roda *Staphylococcus* (Sasaki i sar., 2010). Termostabilna nukleaza se proizvodi u bakterijama pre početka stvaranja enterotoksina, pa može da se koristi u nadzoru higijenske ispravnosti namirnica kao indikator prisustva enterotoksogenih sojeva *S. aureus* u hrani (Heldman, 2005). Nedostatak ove metode ispitivanja je u tome što oko 4% sojeva *Enterococcus* spp., izolovanih iz mleka i proizvoda od mleka, imaju sposobnost stvaranja termostabilne nukleaze. Prisustvo nukleaza je potvrđeno i kod *S. epidermidis* i kod više *Micrococcus* vrsta ali one nisu termostabilne (Heldman, 2005). Enterotoksini i TSST-1 su toksini koji imaju superantigensku aktivnost. Enterotoksini dovode do intoksikacije ljudi nakon konzumiranja kontaminirane hrane. Razlikuje se sedam različitih tipova enterotoksina koji dovode do povraćanja, proliva i akutne inflamacije sluzokože želuca i tankih creva ne samo kod ljudi već i kod životinja. Ukoliko TSST-1 prodre u cirkulaciju dolazi do stimulacije T limfocita i burnog oslobađanja citokina. Na korelaciju nalaza termostabilne nukleaze i enterotoksina ukazao je Heldman, koji je kod 250 enterotoksogenih sojeva stafilokoka dokazao prisustvo nukleaze kod 242 soja (95%) (Heldman, 2005). Termostabilna nukleaza *S. aureus* se može koristiti u detekciji enterotoksogenih sojeva bakterija koje su uništene visokom temperaturom, bakteriofagima, hemikalijama i kada su prisutne L forme.

Mleko kontaminirano stafilokokama je potencijalni rizik po zdravlje potrošača, a trovanja enterotoksinima stafilokoka su na četvrtom mestu najčešćih trovanja hranom 2008. godine u EU (EFSA i ECDC, 2013; Imani i sar., 2010). Hrana koja se dovodi u vezu sa stafilokoknim trovanjima je hrana bogata proteinima, koja se proizvodi u zanatskim uslovima, kod kojih je proces proizvodnje praćen manuelnom obradom proizvoda, često u kombinaciji sa neadekvatnim termičkom obradom i čuvanjem hrane (Cusato i sar., 2013; Ropkins i sar., 2003). Meki sirevi domaće radinosti koji se prodaju

na pijacama u Srbiji nose relativno mali rizik po potrošača u smislu enterotoksina poreklom od stafilokoka. Sa 17 pijaca, od 555 uzoraka mekih sireva, koagulaza pozitivne stafilokoke izolovane su u 168 (30,27%) sireva, gen za enterotoksin imalo je 26 (5,2%) i to svi SEA tipa, a sam enterotoksin je potvrđen u jednom uzorku (0,18%) (Savić Radovanović, 2015).

Epidermolitični (eksfoliativni) toksini ETA i ETB dovode do pojave promena na koži ljudi i životinja, opisani su u širokom varijetetu simptoma od buloznog impetiga do sindroma „krastave kože” ljudi. Njihovo dejstvo je enzimsko (esteraze) ali se još uvek ne zna kako tačno dovode do promena. Epidermolitični toksin tipa C (ETC) je opisan kod konja sa kožnom infekcijom *S. aureus*. Eksudativni dermatitis svinja je uzrokovan virulentnim sojevima *S. hyicus* koji produkuju toksine slične toksinima *S. aureus*. (Götz i sar., 2006).

Najbolje opisan iz grupe hemolizina je α hemolizin koji je najpotentniji i prouzrokuje potpunu hemolizu eritrocita na agaru sa krvi kunića, ovna ili goveda. Potpuna hemoliza se fenotipski uočava nakon inkubacije od 24 sata na temperaturi 37°C. Na ćelijama domaćina koje imaju receptor za ovaj toksin, po vezivanju dolazi do ulaska jona u ćeliju domaćina, pokreće se kaskadna reakcija i oslobađanjem citokina može doći do toksičkog šoka sličnog onom izazvanog TSST-1. (Götz i sar., 2006).

Beta (β) hemolizin je sfingomijelinaza koja oštećuje ćelijsku membranu bogatu lipidima. Prisutniji je kod sojeva izolovanih od životinja u odnosu na sojeve izolovane od ljudi. Dovodi do pojave široke zone hemolize na agaru sa krvi ovna ili goveda. Nakon inkubacije od 24 sata na temperaturi 37°C uočava se nepotpuna hemoliza, a naknadnim držanjem na nižim temperaturama u frižideru, zona hemolize se povećava i postaje potpuna oko same kolonije. Tako je ova hemoliza zbog postojanja dve zone i načina nastanka dobila naziv „toplo – hladna” hemoliza. Poseduju ga svi sojevi *S. intermedius* i skoro svi sojevi *S. aureus*. Leukotoksin (gama - γ toksin) i leukocidin su sinergistički toksini usmereni protiv leukocita i membrana eukariotskih ćelija. Prisustvo ovog toksina je veoma važno kod nekrotičnih infekcija, i 90% sojeva *S. aureus* izolovanih iz datih promena su se odlikovali stvaranjem leukotoksina (Götz i sar., 2006) Delta (δ) toksin je mali peptid koji proizvodi *S. aureus*. Njegova uloga u patogenezi nije sasvim objašnjena, ali se pretpostavlja da ima direktan i indirektan efekat na monocite i zapaljensku reakciju.

2.6. Rezistencija

Antimikrobna sredstva različito deluju na određene vrste mikroorganizama, a mogu izazvati smrt ćelije usled destrukcije bakterije ili sprečiti njihovo razmnožavanje, pa ih na osnovu ovog kriterijuma možemo podeliti u dve grupe:

- a) Antimikrobna sredstva koja ispoljavaju bakteriostatsko delovanje (tetraciklini, hloramfenikol, makrolidi i sulfonamidi)
- b) Antimikrobna sredstva koja ispoljavaju baktericidno delovanje (aminoglikozidi, penicilini i cefalosporini)

Antimikrobna sredstva deluju na određene strukture bakterija ili na njene biohemijske i metaboličke procese i prema mehanizmu delovanja antibiotici su podeljeni u četiri grupe:

- a) Inhibitore sinteze ćelijskog zida
- b) Inhibitore funkcije ćelijske membrane
- c) Inhibitore sinteze proteina putem sprečavanja translacije ili transkripcije
- d) Inhibitore sinteze nukleinskih kiselina.

Rezistencija predstavlja otpornost bakterija prema određenom antibiotiku koja može biti urođena u slučaju kada je prisutna kod svih sojeva, odnosno stečena kada se pojavljuje samo kod nekih sojeva date vrste. Bakterije su sposobne da razvijaju odbrambene mehanizme protiv antibiotika mutacijom postojećih gena odnosno sticanjem novih gena drugih bakterija. Mikroorganizmi imaju sposobnost da se prilagođavaju nepovoljnim uslovima sredine u kojoj se nalaze, uključujući i prisustvo antimikrobnih sredstava, i da nakon različitih fenotipskih i genotipskih varijacija odnosno promena prežive i da se razmnožavaju. Prema mehanizmima kojima mikroorganizmi stiču rezistenciju na antimikrobna sredstva podeljeni su na sledeće grupe:

- a) Strukturne promene ciljnih (target) mesta bakterija na koja deluju antimikrobna sredstva
- b) Smanjenje propustljivosti ćelijske membrane na antimikrobna sredstvo
- c) Effluks sistem - izbacivanje antimikrobnih sredstava iz bakterija u spoljašnju sredinu aktivnim transportom pri čemu se unutar ciljne bakterije ne postižu tražene koncentracije
- d) Sposobnost produkcije enzima koji razlažu ili modifikuju antimikrobna sredstva

Široka upotreba antiinfektivnih agenasa rezultirala je razvojem rezistencije bakterija na pojedine antibiotike (Howard i sar., 2014; Huber, 1970; Krnjaic i sar., 2005; Krnjaić, 2000). Penicilin je u kliničkoj terapiji prvi put primenjen 1941. godine u Velikoj Britaniji protiv *S. aureus*. Prva rezistencija prema penicilinu zabeležena je kod *S. aureus* 1947. godine i to samo četiri godine nakon započinjanja industrijske proizvodnje ovog antibiotika. Da bi problem rezistencije na penicilin bio prevaziđen, 1959. godine registovan je meticilin, sintetski penicilin otporan na delovanje penicilinaze. Šezdesetih godina dvadesetog veka se javlja problem rezistencije i na meticilin (Patricia, 1961), a osamdesetih dvadesetog godina *S. aureus* je prepoznat kao dominantan uzročnik intrahospitalnih infekcija (Moellering, 2012). Neizbežno je bilo njegovo širenje na opštu populaciju, i 1987. godine je meticilin rezistentni *S. aureus* izolovan kao uzročnik infekcije potkožnog tkiva i upale pluća pacijenta koji nije bio hospitalizovan (Hayani i sar., 2008). U veterinarskoj medicini prva izolacija MRSA je bila 1972. godine u Belgiji iz mleka krave obolele od mastitisa (Devriese i sar., 1972).

2.6.1. Značaj rezistencije u veterinarskoj medicini

Zdravstveno stanje životinja u proizvodnji hrane animalnog porekla usko je povezano sa zdravljem ljudi, mada su ranije stručnjaci iz oblasti stočarstva odbijali ideju da se upotreba antibiotika kod životinja može povezati sa rezistencijom patogenih bakterija kod ljudi (Kostić, 2005). Iako su široko rasprostranjene, prenošenje *Staphylococcus* vrsta između ljudi i različitih vrsta životinja je relativno ograničeno, mada je dokazana mogućnost prenošenje gena rezistencije između stafilokoka poreklom od ljudi i životinja (Kaszanyitzky i sar., 2003; Nunan i Young, 2007).

Sojevi *S. aureus* koji su rezistentni na antibiotike mogu se prenositi na ljude ne samo direktnim nego i indirektnim putem, preko različitih namirnicama uključujući mleko, meso i proizvode od mleka i mesa (Juhász-Kaszanyitzky, 2007; Teuber, 1999; Alvarez-Astorga i sar., 2002; Manie i sar., 1998; Nunan i Young, 2007). Bakterije koje kontaminiraju meso, osim što mogu dovesti do infekcija i intoksikacija potrošača, potencijalno predstavljaju rizik za ljude i kao nosioci gena rezistencije na antibiotike (Kaszanyitzky i sar., 2003; Juhász-Kaszanyitzky, 2007; Krnjaić, 2000). U svakom slučaju životinje koje se koriste za proizvodnju hrane predstavljaju ne samo značajne

rezervoare patogenih bakterija životinja i ljudi nego i gena rezistencije u prirodi (Kostić, 2005).

Intenzivan način proizvodnje životinja i široka primena antimikrobnih sredstava u profilaktičke i terapijske svrhe značajno utiče na prevalenciju rezistentnih sojeva prvenstveno izolovanih od kućnih ljubimaca, živine i svinja, a zatim kod sojeva izolovanih od goveda (Krnjajić, 2000). U prethodnih šezdeset godina jedno od najintezivnijih oblasti naučnih istraživanja predstavljalo je ispitivanje pojave i raširenosti rezistencije bakterija prema antibioticima. U radovima prezentovani su dijametralno suprotni rezultati prevalencije rezistencije, uključujući i penicilin rezistentnih *S. aureus* poreklom iz različitih izvora. *S. aureus* je visoko patogen i sposoban je da brzo razvije multipnu rezistenciju na antibiotike pomoću brojnih mehanizama. Raniji radovi su ukazali da su infekcije kod pasa izazvane stafilokokama koje su multirezistentne potencijalno i uzročnici zoonoza (Prescott i sar., 2002; Manian, 2003). Rezistencija na antimikrobne lekove je češća kod *S. aureus*, nego kod *S. intermedius* (Aarestrup i Jensen, 2002) koji lako može ispoljiti rezistenciju na antibiotike, iako se nalazi na klinički zdravim životinjama (Gharsa i sar., 2015)

Ispitivanjem izolata stafilokoka poreklom od različitih životinjskih vrsta ustanovljeno je da 42,6% sojeva *S. hyicus* i 6,4% sojeva *S. aureus* poreklom od goveda pokazuje rezistenciju na tetraciklin. Relativno visok nivo rezistencije na tetraciklin - kod *S. hyicus* se može dovesti u vezu sa širokom upotrebom tetraciklina na farmama svinja, za razliku od niskog nivoa rezistencije na tetraciklin kod sojeva *S. aureus*, uzročnika mastitisa krava što se objašnjava uglavnom time da se u lečenju ovog oboljenja retko koristi ova grupa lekova (Kaszanyitzky i sar., 2003; Schwarz i sar., 1998).

Beta-laktamski antibiotici se široko koriste kod krava za lečenje i prevenciju mastitisa. Preventivna terapija se rutinski koristi nakon završetka laktacionog perioda. Beta-laktamski antibiotici, kao što su kloksacilin (izoksazolilni semisintetski penicilin), ampicilin (aminopenicilin), cefalonium ili cefkvinom (četvrta generacija cefalosporina), se aplikuju lokalno u svaki sisni kanal pred zasušenje, što obezbeđuje zaštitu u periodu kada krava ne daje mleko čime se smanjuje rizik od mastitisa u sledećoj laktaciji (Sommerhäuser i sar., 2003). Od posebnog značaja u antimikrobnoj terapiji mastitisa krava predstavlja kloksacilin otporan na dejstvo penicilinaze, koji je registrovan u Republici Srbiji samo za intramamarnu upotrebu kod krava (ALIMS, 2014b). Infekcija

meticilin rezistentnim stafilokokama predstavlja ozbiljan problem kod ljudi, ali se ređe javljaju kod životinja.

U mnogim zemljama sveta nepoznata je zastupljenost meticilin rezistentnog *S. aureus* (MRSA) među *S. aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava. Visok nivo rezistencije na β laktamske antibiotike nastaje usled prisustva *mec* gena koji kodira sintezu penicilin vezujućeg proteina (PBP2a). Gen *mecA* je deo *mec* operona zajedno sa regulatornim genima *mecI* i *mecR1*, a koji sačinjavaju mobilni genetski element poznat kao Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec) - kasetni hromozom *mec* staflokoka. Kasetni hromozom *mec* staflokoka je podeljen u 5 glavnih klasa (IWG-SCC, Turlej i sar., 2011). Ipak, podacima o mastitisima izazvanim MRSA treba pristupati oprezno jer postoje nejasnoće u ekspresiji *mecA* gena, nivou ispitivanja i porekla MRSA sojeva. U radovima se opisuju izolati *S. aureus* kod mastitisa krava koji ispoljavaju rezistenciju na meticilin, a koja nije povezana *mecA* genom (Turutoglu i sar., 2009). Osim A alelnih varijanti *mec* gena opisana je i epidemiologija *mecC* alela goveda u Danskoj od čega 2 izolata potiču iz perioda 1975-1992. godine (Petersen i sar., 2013). Učestalost *blaZ* gena rezistencije na penicilin je ređe opisivana. Otkriveno je da *mecA* gen, lančano vezuje za sebe druge gene rezistencije (takozvana vezana rezistencija) pa se tako prenošenjem *mecA* gena zajedno prenose i svi ostali naknadno „zakačeni” geni rezistencije, što je pogotovo karakteristično za SCC tipove I, II i III (Silva i sar., 2014). Prisustvo *mecA* gena istraženo je kod 118 sojeva *S. aureus*-a koji su poticali iz uzoraka mleka krava obolelih od mastitisa *S. aureus*. MRSA sojevi su otkriveni disk difuzionom metodom, *spa* testom, tipiziranjem sekvence multilokusa (MLST) i tipiziranjem SCCmec. Gen za rezistenciju na meticilin (*mecA*) je pronađen kod 11 (9,3%) od 118 izolata *S. aureus*-a, ukazujući na to da približno 10% farmi u Belgiji koje imaju problem sa mastitisom izazvanim sa *S. aureus*, imaju zapravo MRSA. Sojevi su bili ST398, *spa*-tipovi t011 ili t567 i imali su SCCmec- tip IVa ili V, dokazujući da pripadaju LA-MRSA (livestock associated MRSA) tipa CC398 (Vanderhaeghen i sar., 2010). Posle prvog izveštaja o mastitisu izazvanom MRSA 1972. godine (Devriese i sar., 1972), MRSA kao uzročnik mastitisa je prijavljivana samo sporadično (Juhász-Kaszanyitzky, 2007). Iz tih studija se činilo da je prevalencija mastitisa izazvanih MRSA uopšteno vrlo niska. Nedavno je otkriven specifični MRSA klon, CC398, koji je prisutan kod svinja, teladi, brojlera, kućnih ljubimaca i ljudi koji su

u kontaktu sa životinjama (Vanderhaeghen i sar., 2010; Cuny i sar., 2010). Potvrđeno je da MRSA poreklom od životinja može prouzrokovati oboljenje kod ljudi i to tip CC398 odnosno ST398 (van Duijkeren i sar., 2004). Ovaj tip MRSA (LA-MRSA) bliže je povezan sa *spa*-tipovima SCCmec IVa i V (de Neeling i sar., 2007; Lewis i sar., 2008). LA-MRSA pokazuje rezistenciju ka tetraciklinima i u manjem obimu ka makrolidima, linkozamidima, aminoglikozidima i fluorohinolonima, a kod LA-MRSA nedostaje stafilokinaza, važan faktor virulencije prisutan kod velike većine ostalih sojeva MRSA (Monecke i sar., 2007). Posle izolacije i identifikacije LA-MRSA u izolatima poreklom od prasadi, konja i živine, potvrđena je i kod goveda u Belgiji (Vanderhaeghen i sar., 2010). Zbog postojanja multirezistencije LA-MRSA sojeva mogu se očekivati problemi kod antimikrobne terapije obolelih grla.

Prevalencija MRSA među izolatima *S. aureus* iz mleka u Turskoj je na nivou od 1,7%, ali u istom ispitivanju utvrđena je visoka prevalencija rezistencije na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom od 85,7% (Arslan i sar., 2009). Drugim ispitivanjem u Turskoj, ranije sprovedenim, ustanovljena je MRSA kod 17,5% izolata (Turutoglu i sar., 2006). U Holandiji na farmama je prisustvo MRSA u mleku utvrđeno kod 0% - 7,4% ispitivanih farmi, odnosno 0%-1,98% četvrti vimena (Vanderhaeghen i sar., 2010). U Velikoj Britaniji na 2,15% farmi ustanovljeno je prisustvo *mecC* gena, a na 0,27% farmi *mecA* gena MRSA (Paterson i sar., 2014). U Slovačkoj je od 2052 ispitana grla MRSA pronađena kod 14,4% (EFSA i ECDC, 2015), dok 2000. godine u Argentini tokom opsežnih ispitivanja MRSA nije otkrivena na farmama (Gentilini i sar., 2000). Od izolovanih *S. aureus* iz mleka u Italiji MRSA predstavlja 9,2% sojeva (Luini i sar., 2015).

Istraživanja u Srbiji govore da sojevi *S. aureus* od krava sa supkliničkim i kliničkim mastitisom retko ispoljavaju multipnu rezistenciju (Krnjaić, 2000). MRSA nije otkrivena kod krava 2000. godine (Krnjaić, 2000), a 2012. godine je ustanovljena kod 5,9% ispitanih uzoraka mleka (Zutic, 2012). U uzorcima supkliničkih mastitisa 2014. godine nije pronađen nijedan izolat MRSA (Rajic Savic i sar., 2014).

2.7. Biofilm

Uopšteno, biofilmovi se opisuju kao sesilne zajednice mikroorganizma koje su okružene specifičnim ekstraćelijskim matriksom i sa sposobnošću prijanjanja na različite površine stvarajući dinamičko okruženje u kome pojedinačni mikroorganizmi postizu homeostazu, odnosno optimalno su raspoređeni da iskoriste sve raspoložive hranljive materije (O'Toole i sar., 2000).

U istraživanjima u kojima se upoređuju planktonski način života ćelije sa formom biofilma iste vrste bakterija ili klona, može se nedvosmisleno zaključiti da su biofilmovi mnogostruko otporniji na delovanje većine faktora koji ograničavaju rast bakterija, uključujući sadržaj hranljivih materija, nisku pH, nisku aktivnost vode (a_w), prisustvo soli i antimikrobnih sredstava (O'Toole i sar., 2000; Fux i sar., 2004). Smrtnost ljudi je viša prilikom primarne infekcije bakterijama koje imaju sposobnost formiranja biofilma, što je najverovatnije slično i kod životinja (Barsoumian i sar., 2015). Upravo je ovo razlog zašto se veliki broj istraživača posvetio proučavanju biohemijjskih, fizičko-hemijjskih i genetskih faktora rasta i održanja biofilmova različitih patogena. Mogućnost bakterija da opstanu i da se umnože na različitim površinama u formi biofilma tumači se drastično izmenjenim fizičkim mehanizmima, intezivnijom interakcijom između ćelija, specifičnim odnosom ćelija prema ekstracelularnom matriksu i visoko organizovanim načinom transporta hranljivih materija i tečnosti (O'Toole i sar., 2000).

2.7.1. Biofizičke karakteristike biofimova

Pojedini istraživači smatraju da u prirodi bakterijske populacije postoje samo u organizovanim zajednicama, a ne i kao solitarne ćelije (Jenkinson i Lappin-Scott, 2001). Jednom kada kolonizuju određenu površinu, mikroorganizmi formiraju sloj (jednoslojni ili višeslojni) ćelija u interakciji. Biofimi mogu da rastu na dodiru površina različitih agregatnih stanja: čvrsto/tečno (mlekovodi, urinarni kateteri i sl.), tečnost/gas ili čvrsto/gas (Jenkinson i Lappin-Scott, 2001). U prirodi biofimi se mogu naći na brojnim površinama dovoljno vlažnim da omoguće njihov rast (McLandsborough i sar., 2006). Biofime mogu formirati veliki broj vrsta mikroorganizama koje su od izuzetnog značaja u patologiji životinja i ljudi, kao i higijeni proizvodnje namirnica animalnog porekla kao što su u prvom redu bakterije rodova: *Staphylococcus*,

Pseudomonas, *Bacillus*, *Vibrio*, *Listeria*, *Escherichia* i *Salmonella* (Garrett i sar., 2008; Barsoumian i sar., 2015; O'Toole i sar., 2000; Stepanovic i sar., 2004). U laboratorijskim uslovima, sposobnosti stvaranja biofilmova i njihovih karakteristika najčešće se ispituje na *S. aureus* i *P. aeruginosa* kao modelima za Gram pozitivne i Gram negativne bakterije.

2.7.2. Fiziologija ćelija biofilma

Bakterije u sastavu biofilma imaju drugačije generacijsko vreme, različite su morfologije, fiziologije i nutritivnih zahteva od forme slobodnih ćelija (Garrett i sar., 2008). Istraživanja difuzije gasova i tečnosti kroz matriks biofilma pokazuju da bakterijske ćelije u biofilmovima raspolažu sa manje kiseonika i hranljivih materija nego slobodne ćelije u suspenziji, ali zato su i otpornije na delovanje prema njima toksičnih agenasa (Sutherland, 2001). Bakterije smeštene u određenim delovima biofilma odlikuju se različitim statusom i nivoom metaboličkih aktivnosti. Tako je na primer *P. aeruginosa* lociran u unutrašnjosti biofilma neaktivan usled funkcionalnog nedostatka kiseonika. Ova fiziološka razlika prisutna kod ove vrste bakterija, u zavisnosti od njenog prisustva u centralnom ili perifernom delu, nije od značaja kod fakultativno anaerobnih bakterija koje su metabolički aktivne u svim delovima biofilma (Werner i sar., 2004).

Kod *S. aureus* dokazano je da sposobnost produkcije grupe adhezina, genetski kodiranih klasterom gena *icaABCD*, preduslov za formiranje biofilma (Szweda i sar., 2012). Pored ovog kodiranog mehanizma stvaranja adhezina postoji i drugi nezavisan *bap* gen odgovoran za sintezu posebnih proteina udruživanja (biofilm – associated protein – Bap). Kod Gram negativnih bakterija za formiranje biofilmova je verovatno neohodno formiranje N-acil-homoserinskih laktona, što nije karakteristično za slobodne ćelije (McLandsborough i sar., 2006). Hemijski stimuli koji nose informacije o brojnosti bakterija u neposrednoj blizini (quorum sensing) su vrlo bitni za ekspresiju gena koji učestvuju u stvaranju biofilma kako Gram pozitivnih, tako i Gram negativnih baterija (Sutherland, 2001; McLandsborough i sar., 2006).

2.7.3. Biofimoivi sa više vrsta bakterija

Neobične metaboličke interakcije su dokazane i u biofilmovima koji se sastoje iz više bakterijskih vrsta (Zago i sar., 2015; Wilson i sar., 2004). U sredinama koje imaju veći rizik za razvoj biofilмова, kod proizvodnje hrane i medicinske oprema usled zaostajanja hrane ili organskih materija odnosno neadekvatnog pranja i dezinfekcije, pronađeni su i biofilmovi koji su u svom sastavu imali veći broj vrsta mikroorganizama (Sutherland, 2001; McLandsborough i sar., 2006).

Bakterije biofilma kompleksnog sastava od više vrsta bakterija se razlikuju u svom metaboličkom profilu od bakterija i klonova ponaosob ili monokulturalnog biofilma. Sama ispitivanja se zbog reproducibilnosti češće vrše na monokulturalnom biofilmu u prisustvu tečne hranljive podloge kao medijuma za njegovo formiranje, a manji broj radova je izveden na površini ili sredini u koji se biofilm nalazi u prirodi (urin, mleko, zaostala hrana ili komponente hrane u fabrikama). Određeni broj radova bavio se ispitivanjem međusobnog sinergističkog ili antagonističkog odnosa različitih vrsta bakterija prilikom stvaranja biofilma. Tako je uočena bolja produkcija biofilma sa većim brojem ćelija *Listeria monocytogenes*, u slučaju zajedničkog kultivisanja sa *Pseudomonas* sp. (Hassan i sar., 2004), a sa druge strane postoje literaturni podaci o inhibitornom dejstvu *L. monocytogenes* na druge bakterije (Leriche i Carpentier, 2000).

2.7.4. Struktura biofilмова

Ekstraćelijska komponenta biofilma nije uniformna, zato biofilmovi mogu biti porozni ili neporozni (McLandsborough i sar., 2006). Formiranje strukture zavisi od faktora sredine u kojoj se odvija život bakterijske populacije: temperature, parametara protoka hranljivih materija i gasova, pH vrednosti, prisustva soli, antibakterijskih supstanci itd. (Jenkinson i Lappin-Scott, 2001; Stewart i sar., 2015). Postojanje difuzionih gradijenata dovodi do nehomogene strukture biofilma koja je uslovljena koncentracijom supstrata na dodiru biofilma i tečne faze. Posledično nastaju filamentozne strukture koje prominiraju iz osnovnog sloja biofilma, a koje su vrlo bitne za širenje biofilma i imaju drugačiju gustinu od osnovne mase biofilma (Zhang i sar., 2013).

2.7.5. Formiranje i širenje biofilma

Formiranje biofilma se može podeliti u više faza (O'Toole i sar., 2000; Jenkinson i Lappin-Scott, 2001):

- ulazak bakterija u određenu sredinu
- inicijalno pripajanje
- vezivanje supstrata
- formiranje mikrokolonija (povezivanje ćelija sa ćelijom)
- stvaranje međućelijskog matriksa

Nakon unošenja bakterija u sredinu u inicijalnoj fazi stvaranja biofilma od ključnog značaja su pokretljivost bakterija kao i protok sekreta i/ili ekskreta. Ukoliko postoji ujednačen i laminaran protok hranljivih materija, biofilm će se brže formirati (Zhang i sar., 2013). Tok supstrata je vrlo bitan i bakterije koje su u sredini turbulentnog ili laminarnog protoka lakše prijanjaju za površinu nego pri kultivisanju u nepokretnom medijumu, verovatno zato što protok pritiska ćelije uz površinu ili zid suda.

Interakcije između ćelija i površine uključuju Van der Valsove sile koje obezbeđuju prijanjanje usled dipolnog momenta ili indukovanog dipolnog momenta. Elektrostatske sile su direktno povezane karakteristikama same građe spoljašnjih komponenti ćelije (tabela 3). Pri nastajanju međućelijskog matriksa površina dodira sa ćelijom može biti pozitivno ili negativno naelektrisana, što vodi formiranju difuzibilnog elektrostatičkog dvosloja.

Tabela 3. Najznačajnije adhezivne sile u biofilmu (McLandsborough i sar., 2006)

Sila	Udaljenost od površine
Van der Valsove (Van der Waals)	>50nm
Elektrostatske interakcije	2–10 nm
Hidrofobne interakcije	0,5–2 nm

Bakterijska ćelija, kao i većina prirodnih čvrstih površina, ima u principu negativno naelektrisanje. Međutim ukupno naelektrisanje zavisi od zbira naelektrisanja funkcionalnih grupa molekula koji čine membranu kao što su: amino, karboksilna, fosfatna, sulfatna grupa i kapsularni molekuli. Sila elektrostatskog privlačenja zavisi i

od uticaja sredine: temperature, pH vrednosti, jonskog naboja, valence prisutnih jona i prirode medijuma (McLandsborough i sar., 2006) Teorija nazvana prema autorima DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey i Overbeek) prijanjanje bakterija obrazlaže postojanjem dominantnih Van der Valsovih sila koje dovode do priljublivanja za površinu suprotstavljajući se elektrostatskoj sili odbijanja. To je razlog zbog kojeg je za izradu medicinske gumene opreme pogodnija guma obrađena silikonom (Muszanska i sar., 2012). Približavanjem mikroorganizma površini rastu sile odbijanja koje se moraju prevazići. Pretpostavlja se da je finalno približavanje bakterija površini, odnosno njihovo ireverzibilno vezivanje, posledica hidrofobnih sila i istiskivanja vode iz dodirnog sloja (McLandsborough i sar., 2006). Ovo biofizičko objašnjenje je poprilično pojednostavljeno jer je priroda bakterijske membrane i kapsule drastično različita kod mikroorganizama. Same površine adhezije mogu sadržati veliki broj različitih molekula drugačijeg naelektrisanja i hidrofobnog potencijala. Projektovanje više ili manje hidrofobnih površina nije dalo značajne rezultate u sprečavanju pojave biofilma (Muszanska i sar., 2012), što je posledica izuzetno brzog prilagođavanja mikroorganizama u stvaranju biofilma na različitim podlogama (Garrett i sar., 2008). Oblaganje intratrahealnih tubusa jedinjenjima srebra redukuje stvaranje biofilma, a time i drastično snižava rizik od pojave intrahospitalnih pneumonija ljudi (Raad i sar., 2011). Bakterije se lakše pričvrćuju za površine sa slabijom slobodnom energijom od onih sa povišenom slobodnom energijom kao što je nerđajući čelik (McLandsborough i sar., 2006). Verovatno i naslage proteina olakšavaju formiranje biofilma. Rast i pokretljivost *L. monocytogenes* zavisi od temperature i pri nižim temperaturama ne može da uspostavi biofilm na hidrofobnoj površini (Milanov i sar., 2007), a formiranje biofilma *L. monocytogenes* je lakše u sredini bogatijoj hranjivim materijama. To nije slučaj sa svim bakterijama i tako na primer bakterije roda *Salmonella* formiraju biofilm u oskudnijem medijumu (Stepanovic i sar., 2004). Veliki broj pitanja u pogledu formiranja biofilma ostaje i dalje otvoren bez jasnog objašnjenja .

2.7.6. Rast biofilma

Nakon inicijalnog vezivanja, bakterijska ćelija stvara vanćelijski matriks (extracellular polymeric substances - EPS) koji pospešuje vezivanje za čvrstu podlogu i olakšava postizanje i održavanje mikrokolonije (O'Toole i sar., 2000). Ekstracelularna polimerna

supstanca - matriks olakšava prikupljanje hranljivih materija. Bakterije u biofilmu su otpornije od slobodnih bakterija prema faktorima stresa uključujući i antimikrobno delovanje (Croes i sar., 2009). Potpuno formirani biofilm se sastoji od strukturisanog matriksa sa mrežom horizontalnih i vertikalnih kanala koji omogućavaju razmenu hranljivih i otpadnih materija u svim njegovim delovima. Sastav i struktura matriksa zavisi od uslova sredine i vrste mikroorganizama (Jenkinson i Lappin-Scott, 2001; Muszanska i sar., 2012). Pri hiperprodukciji međućelijskog matriksa biofilm dobija želatinoznu strukturu, a reološkim ispitivanjima dokazano je povećanje elastičnosti biofilma (I. Kapper i sar., 2002 citirano prema McLandsborough i sar., 2006).

Ukoliko se biofilm formira u protočnom sistemu (cevi, kanali i sl.), mikroskopski izgled biofilma podražava karakteristike kretanja tečnosti. U turbulentnom kretanju medijuma biofilm je gušći i zauzima polukružno izbočeni oblik radi manjeg otpora prolasku tečnosti. Širenje biofilma se odvija najčešće niz tok struje odvajanjem delova biofilma. U laminarnom toku formira se ređa, „sunderasta” struktura biofilma sa ravnim dodirnim slojem hrapave površine (Garrett i sar., 2008).

2.7.7. Odvajanje biofilмова

Važno je imati na umu da biofilm nije sistem u stagnaciji. Iako se u literaturi ne navodi uvek, vrhunac razvoja biofilma ogleda se u odvajanju bakterija iz biofilma i diseminaciji uzročnika (McLandsborough i sar., 2006). Pojedina objašnjenja prikazuju biofilmove kao visoke, masivne kule ćelija i međućelijske supstance koje se pri kritičnim karakteristikama protoka lome, oštećuju i otkidaju u pravcu protoka materije (Jenkinson i Lappin-Scott, 2001; O'Toole i sar., 2000). Drugi autori zagovaraju teoriju po kojoj se širenje bakterija iz biofilмова vrši postupno, pojedinačnim odvajanjem bakterija pri dodirnom sloju sa hranljivom materijom. Merenjima diseminacije biofilma *P.aeruginosa* ustanovljeno je da se većina ćelija (20-40%) odvajaju u grupama (grudvicama) sa manje od 300 bakterija, a grudvica od preko 1000 bakterija ima manje od 1% (Wilson i sar., 2004). Biofilmovi *S. aureus* češće vrše diseminaciju u grupama od po 10-100 bakterija nego pojedničnim bakterijama (Fux i sar., 2004). Same grupe odvojenih ćelija *S. aureus* zadržavaju rezistenciju na antibiotike, što je očigledna evolutivna prednost korišćenja ovakvih minikolonija u širenju.

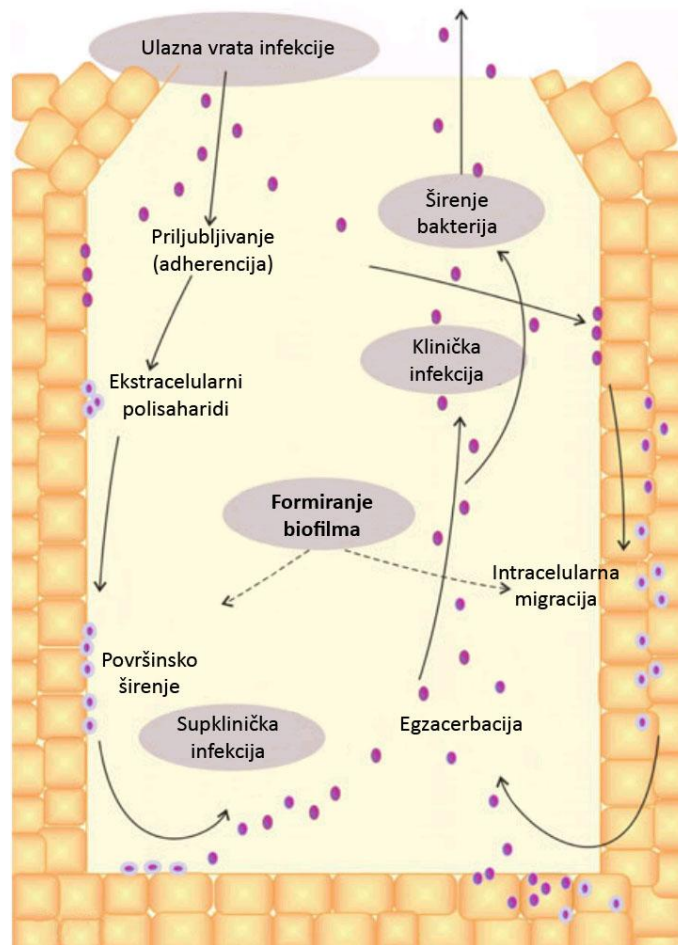
Ceo proces odvajanja je kompleksan i nije sasvim objašnjen pa se zastupaju teorije da je odvajanje ćelija ili grupa ćelija od biofilma posledica različitih faktora od kojih su neki genetski uslovljeni. Najznačajniji faktori su enzimi koji razgrađuju međućelijski matriks, prisustvo slobodnog gasa, količina hranljivih materija i produkata metabolizma u sredini, dostupnost jona koji omogućavaju međusobno vezivanje ćelija, stres indukovani parametrima protoka, prisustvo litičnih bakteriofaga i razmena međućelijskih signala između bakterija (Rupp i sar., 2005; Croes i sar., 2009).

Idealni model za ispitivanje biofilma ne postoji, a usled stalnih modifikacija metoda veoma je teško porediti dobijene rezultate (Stepanovic i sar., 2000; Peeters i sar., 2008). Faktori koji utiču na dizajn ispitivanja i metodološki pristup su brojni i između ostalog obuhvataju i razmatranje: vrste biofilma, sastava biofilma- mono ili multikulturalni biofilm, prateće kontaminacije (*in vivo*), uslova rasta biofilma, izbora hranljivog medijuma i izbora podloge na kojoj se vrši adherencija uključujući njenu površinu (hrapava, ravna, uglačana) i elektrostatički naboj. Prinos - porast biofilma može se uvrstiti bojenjem, odvajanjem od površine surfaktantom ili grebanjem, ultrazvukom ili laserom (McLandsborough i sar., 2006).

Biofilmovi su specifičan biološki sistem tako da antimikrobni lekovi i produkti imunog odgovora teško dopiru do uzročnika, pa osetljivost patogenog mikroorganizma prema antimikrobnim lekovima opada i do 1000 puta (Gomes i sar., 2011; Fux i sar., 2004). Osetljivost stafilokoknih biofilma na aktivne komponente etarskih ulja nije opsežno ispitivana. Etarsko ulje origana inhibira formiranje biofilma pri koncentraciji od 0,125–0,5% v/v (Nostro i sar., 2007), a karvakrol poseduje potencijal za drastično smanjenje biomase biofilma i preko 50% (Nostro i sar., 2012).

2.7.8. Značaj biofilma u specifičnostima patogeneze mastitisa

U patogenezi mastitisa krava sposobnost produkcije biofilma predstavlja važan faktor virulencije *S. aureus* (šema 2) (Melchior, 2011). Stvaranje biofilma obezbeđuje perzistenciju bakterijama i dovodi do upornog mastitisa hroničnog toka. Osetljivost bakterijske ćelije u biofilmu na antibiotike je smanjena usled nemogućnosti ulaska lekova u jonizovanoj formi, ređe deobe bakterija i prisustva enzima koji ih razgrađuju (O'Toole i sar., 2000).



Šema 2. Prikaz značaja biofilma u patogenezi mastitisa uzrokovanih *S. aureus* (Melchior, 2011)

Usled mogućnosti da „neutrališu” delovanje antimikrobnih sredstava, bakterije u sastavu biofilmova obično ne ispoljavaju visok nivo učestalosti gena rezistenciju na antibiotike (Raza i sar., 2013).

U okviru pronalaženja efikasne vakcine protiv mastitisa veliki broj ispitivanja bio je usmeren na sprečavanje stvaranja biofilma bakterija kao njihovog važnog faktora virulencije. Pre više od dvadeset godina započeta su ispitivanja efikasnosti inaktivisanih vakcina *S. aureus* koje su u sebi sadržale polisaharide kapsule odnosno biofilma (Watson i Davies, 1993; Nordhaug i sar., 1994). Između ostalih pripremljena je i vakcina koja se sastojala od mešavine inaktivisanih celih bakterija, polisaharidnog matriksa biofilma uronjenog u liposome i toksoida različitih sojeva *S. aureus* (Amorena i sar., 1994). I u novim formulacijama vakcina dodaje se prečišćeni polisaharid matriksa biofilma *S. aureus* poli-N-acetilglukozamin (PNAG) koji indukuju značajno viši

protektivni nivo antitela kod vakcinisanih mlečnih grla, a time redukuju pojavu i intenzitet mastitisa (Prenafeta i sar., 2010). Vakcina Startvac®, Laboratorios Hipra iz Španije u sebi sadrži i kompleks antigena sluzavog dela biofilma *S. aureus* (slime-associated antigen complex - SAAC) koji se sastoji od 58% (w/v) polisaharida i 42% (w/v) proteina. U polisaharidnoj frakciji identifikovani su glukozamin i galaktozamin sa 6,1% zastupljenosti, a antitela protiv deacetilovane forme poli-N-acetilglukozamina imaju najveći kapacitet za opsonizaciju i veoma su efikasna u zaštiti vimena od infekcije *S. aureus* (Cerca i sar., 2007). Dokazano je *in vitro* da antitela prema SAAC inhibiraju formiranje biofilma i bez prisustva neutrofila i da sprečavaju priljubljanje bakterija za epitel i interakcije koje dovode do formiranja biofilma. Komparativna prednost vakcina koje u sebi sadrže PNAG ili SAAC komponente je njihovo prisustvo kod raznih serotipova odnosno odsustvo njihovih antigenskih varijacija. Stoga, antitela indukovana vakcinacijom ovim antigenima uspostavljaju zaštitu bez obzira na tip kapsule *S. aureus*. Glavni odbrambeni mehanizam mlečne žlezde protiv infekcija uključuje opsonizaciju koja je posredovana antitelima i fagocitozu od strane polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (Prenafeta i sar., 2010). U pretkliničkim i u kliničkim ispitivanjima sprovedenim tokom razvoja vakcine, pokazano je da vakcinacija značajno smanjuje pojavu kliničkog i supkliničkog mastitisa kao i težinu kliničkih simptoma mastitisa i broj somatskih ćelija. Sama vakcinacija značajno utiče na značajno ređu i manju upotrebu antibiotika kod terapije obolelih životinja, a povećana je stopa spontanog izlečenja inficiranih krava (Prenafeta i sar., 2010).

Ukoliko izolovano posmatramo stvaranje biofilma kao faktor virulencije, PNAG ili SAAC-specifična antitela sprečavaju infekciju mlečne žlezde prouzrokovanu *S. aureus* vezivanjem za polisaharide ekstracelularnog matriksa (pre uspostavljanja biofilma), čime se olakšava fagocitoza polimorfonuklearnim neutrofilima i makrofagima što posledično dovodi do eliminacije infekcije.

2.8. Specifičnosti organske proizvodnje mleka

Organska poljoprivreda je sistem ekološkog upravljanja proizvodnjom kojim se unapređuje biodiverzitet (raznovrsnost biljnih i životinjskih vrsta), kruženje materije u prirodi, mikrobiološka aktivnost u zemljištu i zaštita životne sredine. Organska proizvodnja postavlja načela upravljanja prirodnim i biološkim procesima zasnovanim

na ekološkim sistemima korišćenja prirodnih resursa, uz primenu metoda koje obuhvataju:

- žive organizme i mehaničke proizvodne metode,
- proizvodnju biljaka u zemljištu, stočarsku proizvodnju ili akvakulturu koja uvažava principe održive eksploatacije,
- zabranu upotrebe genetički modifikovanih organizama i proizvoda koji se sastoje ili su dobijeni od genetički modifikovanih organizama, sa izuzetkom veterinarskih medicinskih proizvoda,
- proizvodne procese koji se baziraju na proceni rizika i odgovarajućih preventivnih mera.

Kao ulazni repromaterijal u organskoj proizvodnji može se koristiti materijal uključujući i biljke i životinje iz organske proizvodnje, kao i prirodne ili prirodno proizvedene supstance. Strogo se ograničava upotreba hemijskih sintetisanih supstanci. Dozvoljavaju se izuzeci ako odgovarajući sistemi upravljanja ne daju zadovoljavajuće rezultate, ako organski repromaterijali nisu dostupni na tržištu ili ako upotreba pojedinih organskih sredstava u održavanju proizvodnje ima neprihvatljiv uticaj na životnu sredinu. Metode organske proizvodnje se prilagođavaju regionalnim i lokalnim klimatskim i agroekološkim uslovima, stepenu razvoja i specifičnostima tradicionalnog načina uzgoja. Ishrana biljaka za upotrebu u organskoj stočarskoj proizvodnji odvija se kroz poboljšanje prirodne plodnosti i stabilnosti tla uz održavanje biološke raznovrsnosti. U organskoj ratarskoj proizvodnji akcenat se postavlja na đubrenju zemljišta, a ne na đubrenju useva. Kroz navedena načela garantuju se dobrobiti poljoprivrednog proizvođača, potrošača organskih proizvoda i životne sredine tj. zemljišta, biljaka i životinja.

Prema zakonskoj definiciji: organska proizvodnja jeste proizvodnja poljoprivrednih i drugih proizvoda koja se zasniva na primeni metoda organske proizvodnje u svim fazama proizvodnje, a koja isključuje upotrebu genetički modifikovanih organizama i proizvoda koji se sastoje ili su dobijeni od genetički modifikovanih organizama, kao i upotrebu jonizujućeg zračenja, u skladu sa ovim zakonom i propisima donetim na osnovu njega (Službeni glasnik Republike Srbije broj 30/10). Ako je ovakva proizvodnja sertifikovana (ozvaničena) kod neke od ovlašćenih organizacija koja ima odobrenje nadležnog ministarstva za obavljanje poslova sertifikacije, onda se ovakva

proizvodnja naziva sertifikovana organska proizvodnja. Sertifikovana organska proizvodnja je takav sistem proizvodnje koji je u skladu sa Zakonom o organskoj proizvodnji, Pravilnikom o kontroli i sertifikaciji u organskoj proizvodnji i metodama organske proizvodnje (Službeni glasnik Republike Srbije broj 48/11), a koji su usklađeni sa zakonima Evropske unije.

Metode organske stočarske proizvodnje podrazumevaju mere adekvatnog izbora vrsta i rasa životinja, načina uzgoja, objekata za uzgoj, ishrane i zdravstvene zaštite životinja, prevoza i klanja životinja, postupanja sa životinjama koje su nabavljene sa drugih farmi i načina sakupljanja životinjskih vrsta iz prirodnih staništa. Reproductivni materijal za biljnu i stočarsku proizvodnju koji se koristi u organskoj proizvodnji mora da bude proizveden metodama organske proizvodnje, osim ukoliko je reč o autohtonoj rasi ili naučno istraživačkoj delatnosti. Sva odstupanja od osnovnih načela mora da odobri nadležna institucija. Ovlašćena organizacija izdaje sertifikat kojim se potvrđuje da je organski proizvod dobijen u skladu sa zakonom i pratećim pravilnikom. Samo proizvod koji nastane u procesu sertifikovane organske proizvodnje sme ući u promet kao organski proizvod, obeležen je na odgovarajući način i kao takav ima veću vrednost i mora sadržati najmanje 95% sastojaka poljoprivrednog porekla koji su proizvedeni u skladu sa odgovarajućim propisima i standardima. U međunarodnoj trgovini se, za obeležavanje ovakvih proizvoda pored naziva organski koriste i nazivi: bio, biološki, eko, ekološki, org, organik, itd.

Da bi se zasnovala organska proizvodnja, proizvođač podnosi zahtev organizaciji ovlašćenoj za sertifikaciju organske proizvodnje. Sertifikaciona telo prati proizvodnju tokom godine i u obavezi je da obavlja kontrolu i ustanovi da li je proizvođač poštovao Zakon o organskoj proizvodnji i prateći pravilnik. Obavezno je i vođenje propisanih specifičnih zapisa o proizvodnji. Tehnološki postupak prerade u organskoj proizvodnji odvija se u kontinuitetu bez mešanja proizvoda iz organske proizvodnje sa sastojcima, supstancama i proizvodima iz perioda konverzije, odnosno proizvodima iz konvencionalne proizvodnje, kao i bez upotrebe jonizujućeg zračenja, genetički modifikovanih organizama i njihovih derivata. Ako se u tehnološkom postupku prerade koriste tehnološke linije koje se koriste i za preradu proizvoda iz konvencionalne proizvodnje, te tehnološke linije se pre upotrebe u organskoj proizvodnji moraju temeljno očistiti i oprati. Skladištenje organskih proizvoda zahteva odvojenu prostoriju,

osim ukoliko su organski proizvodi upakovani i obeleženi, onda se mogu čuvati u istom skladišnom prostoru sa proizvodima iz konvencionalne proizvodnje.

Tokom 1960. godine se pojavio otpor protiv intenzivnog stočarstva sa fokusom na zaštitu životne sredine i dobijanje zdrave hrane, a vremenom organski pokret je pridobijao sve više pažnje javnosti. U početku, organska proizvodnja je u EU predstavljala retku alternativu konvencionalnoj stočarskoj proizvodnji, ali su se osamdesetih godina XX veka farmeri bolje organizovali i postavili standarde za organsku proizvodnju (Lund, 2002). U isto vreme, organska proizvodnja je privukla pažnju političara koji su uvideli pozitivne strane ovakve proizvodnje, pre svega pozitivne efekte na životnu sredinu i smanjenje zagađenja voda i zemljišta. Pokret za omasovljavanje organske proizvodnje je dobio političku podršku i prve povlastice za konverziju iz konvencionalne u organsku proizvodnju krajem osamdesetih godina XX veka (Lund, 2002). Interesovanje za organsku proizvodnju sada raste i sve je veći broj naučnih studija, između ostalog i u vezi zdravlja i dobrobiti životinja u organskim sistemima.

Prvi standard za organsku proizvodnju postavljen je 1980. od strane međunarodne organizacije za organsku poljoprivredu (IFOAM), koji se danas koristi u preko 750 nacionalnih i regionalnih sertifikacionih tela širom sveta. U okviru EU pravni okvir je uspostavljen 1991. godine a dodatno unapređen 1999. godine.

Prema izveštaju Eurostata (Eurostat, 2015) organska proizvodnja u Evropskoj uniji se sprovodi na 10,3 miliona hektara ili 5,9% ukupnog poljoprivrednog zemljišta. Španija, Italija, Francuska i Nemačka imaju organsku proizvodnju na po više od milion hektara dok je u Srbiji pod organskom proizvodnjom manje od 10 000 hektara.

Prema podacima Eurostata, (Eurostat, 2015) u 2011. godini bilo je 2,6 miliona grla organski sertifikovanih goveda u 27 zemalja EU. Broj registrovanih goveda beleži godišnji rast od 12% od 2005. do 2011. godine. Najveći broj organskih goveda, prema dostupnim podacima, je u Austriji, Francuskoj, Velikoj Britaniji, Švedskoj, Italiji i Španiji. Udeo organske proizvodnje u govedarstvu je najveći u Austriji (19%), Švedskoj (17%), Letoniji, Češkoj (oko 13%) i Danskoj (10%). Tokom prethodnih nekoliko godina u većem broju zemalja članica EU došlo je do porasta organske proizvodnje i tako je 2014. godine u Švedskoj udeo goveda u organskom uzgoju u ukupnom broju

grla iznosio 19,6% (Grafikon 1). Povećanje broja grla u organskoj proizvodnji u 2014. u odnosu na 2013. zabeleženo je u Rumuniji i Hrvatskoj.

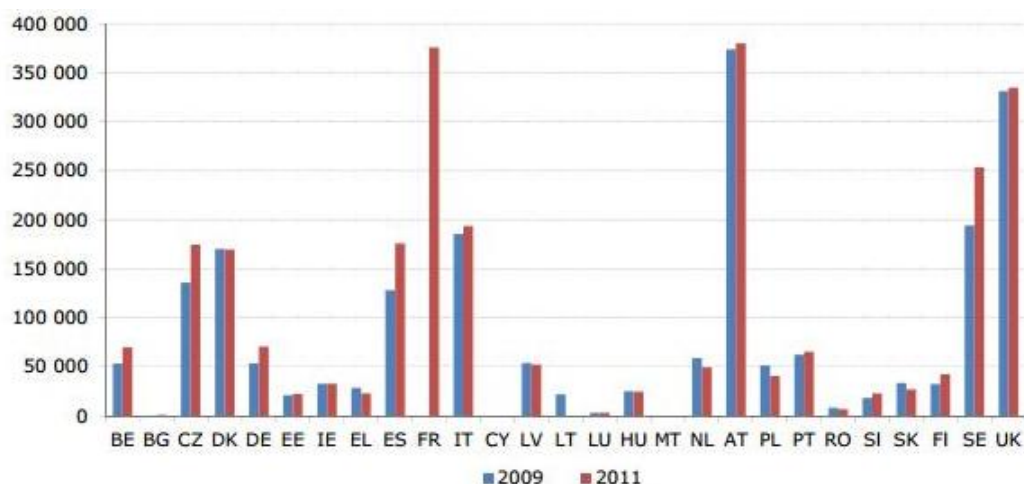
Organski sertifikovanih muznih krava ima oko 700 000 u EU (podaci iz 2011. godine), što je 3% ukupnog broja. Posmatrano za zemlje koje su činile EU do 2003. godine, organski sektor obuhvata 3,7% mlečnih krava dok u 12 evropskih zemalja koje su ušle u EU nakon 2003. godine, ova cifra pada na 1,1%. U Francuskoj, drugom po veličini proizvođača mleka u EU, udeo organskih mlečnih krava u ukupnom nacionalnom stadu mlečnih krava iznosi 2,1%. U Letoniji organske muzne krave predstavljaju 9,6% od ukupnog broja mlečnih krava, zatim slede: Estonija sa 2,7%, Slovačka sa 2% i Češka sa 1,5%. Države članice EU gde organska proizvodnja mleka ima najveći udeo su: Austrija (18%), Švedska (12,7%), Danska (10,9%) i Velika Britanija (8,1%). Nivo proizvodnje organskog mleka tokom 2014. godine predstavljen je u tabeli 4.

U Republici Srbiji su poslednjih godina evidentni pomaci u organskoj proizvodnji. Prema podacima Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine, u 2014. godini pod organskom proizvodnjom bilo je 9 446ha, što je više za oko 1 200ha u odnosu na godinu ranije kada je bilo 8 228ha. U 2012. godini organska proizvodnja se u Srbiji odvijala na 6 340ha. Kada je reč o broju životinja u organskom uzgoju 2014.godine u Srbiji držano je 2 557 krava, 1 285 ovaca i nekoliko desetina svinja. Global Seed u Čurugu predstavlja jednu od najvećih organskih farmi u Evropi, sa organizovanom proizvodnjom na 2 400ha sertifikovanog zemljišta, sa blizu 2 000 goveda i dnevnom proizvodnjom mleka od 17 000l (Seed, 2016).

Srbija je preuzela propis Evropske unije kojim je ograničena upotreba antibiotika i drugih antimikrobnih sredstava u organskoj stočarskoj proizvodnji, što je predviđeno direktivom Evropske unije 1804/1999 (European Union Council, 1999).

Tabela 4. Proizvodnja sirovog organskog mleka (t) tokom 2014. godine prema (Eurostat, 2015)

Zemlja	Mleko	Zemlja	Mleko
Italija	1913600	Poljska	26583
Velika Britanija	808600	Slovačka	26299
Nemačka	708055	Španija	19757
Francuska	571800	Turska	15510
Danska	487100	Estonia	9396
Austrija	443486	Mađarska	8856
Švedska	371452	Irska	7703
Holandija	191601	Slovenija	5401
Letonija	74937	Srbija	3883
Norveška	53526	Bugarska	2486
Finska	48583	Luksemburg	2455
Litvanija	43178	Hrvatska	1782
Rumunija	35945	Kipar	1612
Grčka	34812	Malta	0
Češka	30058	Island	-



Grafikon 1. Broj organski sertifikovanih muznih krava u EU tokom 2009. i 2011. godine

Terapija krava u organskoj stočarskoj proizvodnji nosi određene specifičnosti.

Pored preparata na biljnoj bazi, postoje sintetski lekovi dozvoljeni u organskoj proizvodnji koji se propisuju posebnim aktom. Interesantno je da su u organskoj proizvodnji mleka dozvoljena biološka sredstva, vakcine, serumi i imunostimulansi. Za organsku proizvodnju mleka u SAD odobreno je korišćenje dezificijenasa na bazi joda, izopropil alkohola, nekih jedinjenja hlora i hlorheksidina (FDA, 2016). U lečenju organski uzgajanih životinja prema pravilniku Evropske unije 889/2008 dozvoljeno je korišćenje fitoterapije, homeopatskih proizvoda i određenih mineralnih sirovina, a upotreba sintetskih gotovih lekova se ograničava na upotrebu do tri puta godišnje za mlečna grla, što rezultira da se na organskim farmama u EU mastitisi u 85% slučajeva leče sintetskim lekovima (Brinkmann i sar., 2007).

U terapiji krava odgajanih u skladu sa propisima o organskoj proizvodnji često se koriste homeopatski, biljni i tradicionalni lekovi. Homeopatski lek je svaki lek pripremljen od supstanci poznatih kao homeopatske osnovne supstance, a u skladu sa homeopatskim postupkom proizvodnje. Biljnim preparatima smatraju se i mlevene ili praškaste biljne supstance, tinkture, ekstrakti, ulja, sokovi dobijeni presovanjem, kao i prerađeni eksudat. Tradicionalni lek je lek koji može biti zasnovan na naučnim principima i rezultat je tradicije ili drugih tradicionalnih terapijskih pristupa. Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima ne definiše razlike između homeopatskih, tradicionalnih i biljnih lekova namenjenih za upotrebu kod ljudi i životinja (Službeni glasnik Republike Srbije broj 30/10 107/12). Homeopatski lekovi se koriste u veterinarskoj medicini i zaštiti biljaka – agrohometopiji. Osnovna karakteristika homeopatskog leka je da se priprema razblaživanjem matične tinkture, što se vrši smešom alkohola i vode, najčešće u dva odnosa - 1:10 (D skala) i 1:100 (C skala) zbog čega su često dostupni kao preparati bez recepta (Cupara i sar., 2015). U Danskoj je izvršena komparativna analiza organske i konvencionalne proizvodnje mleka, u periodu 1993. – 2003. godine, i utvrđeno da je u sistemu organske proizvodnje povećan broj somatskih ćelija u mleku kao i frekvencija pojave mastitisa krava (Benedsgaard i sar., 2003). Na nivou 43 organske farme mlečnih krava na kojima su zastupljene krave holštajn-frizijske rase godišnji prinos mleka je 6 277kg/grlu (Brinkmann i sar., 2007).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je da se ispita antibakterijsko delovanje odabranih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola na sojeve *S. aureus* izolovanih u slučajevima supkliničkih mastitisa krava, njihovo sinergističko delovanje u tečnoj kulturi, kao i delovanje na formiranje biofilma *S. aureus*.

Radi ostvarivanja cilja istraživanja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Izolacija i identifikacija uzročnika supkliničkih mastitisa krava primenom konvencionalnih bakterioloških tehnika i tehnika molekularne biologije i formiranje studijske kolekcije *S. aureus* izolata;
2. Utvrđivanje osetljivosti prema antibioticima ispitivanih sojeva *S. aureus*;
3. Utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilma ispitivanih *S. aureus* sojeva detekcijom gena odgovornih za nastanak biofilma i kvantifikacijom produkovanog biofilma;
4. Utvrđivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola za ispitivane *S. aureus* izolate pojedinačno i u različitim kombinacijama datih komponenti;
5. Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja na ispitivane *S. aureus* sojeve;
6. Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola na biofilmove ispitivanih *S. aureus* izolata
7. Analiza dobijenih rezultata

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

Za ispitivanja na kliničkim izolatima, korišćeni su uzorci mleka prikupljeni u toku redovne kontrole sa 7 farmi u okolini Beograda, sa područija koje obuhvata 8500 mlečnih grla. Na svim farmama su goveda holštajn-frizijske rase, kontrolisana u toku laktacije i neposredno pre zasušenja. Prikupljanje uzoraka vršeno je u periodu od marta do juna 2014. godine.

Osim kliničkih izolata u radu su korišćeni i referentni sojevi *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 i meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43300. Kao kontrolni soj za produkciju biofilma korišćen je izolat *S. aureus* sa Instituta za mikrobiologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U radu su korišćeni krvni agar (Blood Agar Base BBL Becton, Dickinson i Company, SAD) sa dodatkom 5% goveđe krvi, Muller-Hinton II bujon (CAMHB, Becton, Dickinson i Company, SAD) i Muller-Hinton II agar (CAMHA, Becton, Dickinson i Company, SAD).

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija i identifikacija *S. aureus*

4.2.1.1. Izolacija i fenotipska identifikacija

Uzorci mleka su zasejavani na krvni agar sa dodatkom 5% goveđe krvi. Izolati koji su imali tipičnu hemolizu, izgled Gram pozitivnih koka na mikroskopskom preparatu, kao i pozitivnu katalaza i koagulaza reakciju odnosno test (Veterinarski zavod Zemun, Srbija), odabrani su za dalja ispitivanja kao koagulaza pozitivne *Staphylococcus* spp.

Za identifikaciju korišćen je skraćeni biohemijski niz koji je obuhvatao: ONPG test (Bio-Rad, France), ispitivanje razlaganja manitola (Institut za viusologiju, vakcine i serume Torlak, Srbija) i ispitivanje razlaganja maltoze (Institut za viusologiju, vakcine i serume Torlak, Srbija) (tabela 5)

Tabela 5. Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka kratkim biohemijskim nizom (Götz i sar., 2006)

	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>
ONPG	-	+	-
Manitol	+	±	-
Maltoza	+	()	-

() – odložena reakcija ± - od 11% do 89% pozitivnih izolata

4.2.1.2. Molekularna identifikacija *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus*

Identifikacija i tipizacija bakterija metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) predstavlja standard za identifikaciju mnogih mikroorganizama i njihovih pojedinačnih genskih alela. PCR se zasniva na obeležavanju ciljnog dela DNK prajmerima i umnožavanju tog dela DNK u velikom broju kopija. Ovako dobijen proizvod se može elektroforetski razdvojiti prema veličini umnoženog fragmenta DNK i obojiti interkalatnim bojama. Ukoliko je reakcija pozitivna, uočiće se specifična linija (band) određene molekulske mase.

Identifikacija kliničkih izolata PCR metodom zasnovana je na prisustvu gena za proizvodnju termostabilne nukleaze (nuc) u različitim alelnim formama kod različitih vrsta stafilokoka. Za identifikaciju je odabrana metoda po Gandri i saradnicima, multipleks PCR sa 6 prajmera, koja daje potvrdu identifikacije vrste: *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus* (Gandra i sar., 2011).

Izolacija DNK

Nakon 24h inkubacije suspendovane su jedna do dve kolonije ispitivane bakterijske kulture u 300 µl sterilne redestilovane vode u sterilnoj mikrotubi sa poklopcem (à 1,5ml Eppendorf, Nemačka) . Mikrotube su uronjene u vodeno kupatilo na temperaturu od 95°C u trajanju od 10min, a zatim odmah odložene na 0°C u trajanju od 5min i centrifugirane 5min na 13 000 o/min. Supernatant je prebačen u sterilnu mikrotubu (à 1,5ml Eppendorf, Nemačka) i čuvan na -20°C do početka daljih analiza.

Uređaji i aparati

Za izvođenje PCR korišćen je PCR master cycler Autorisierter Thermocycler (Eppendorf, Nemačka) i Eppendorf Mastercycler Personal thermocycler (Eppendorf, Nemačka). Nakon amplifikacije PCR produkata, izvođena je elektroforeza u kadici za elektroforezu (Blue marine, Serva) na 1% agaroznom gelu (Serva) na aparatu za elektroforezu (Blue power 500, Serva).

Procedura

Zapremina reakcione smeše pojedinačnog uzorka za PCR je bila 25 μ l. U sastav smeše ulazili su: DTE mmix 2x 12,5 μ l (koji po reakciji sadrži: po 200 μ M trifosfat nukleotida dNTP, 1U Taq DNA polimeraze 5U/ μ l, 2mM MgCl₂ i 4 μ l 10x pufera), prajmeri (tabela 6) *nuc1* 0,25 μ l, *nuc2* 0,25 μ l, *nuc3* 0,25 μ l, *nuc4* 0,25 μ l, *nuc5* 0,25 μ l, *nuc6* 0,25 μ l. Uzorak ispitujućeg DNK 1 μ l i voda za PCR 10 μ l. Kao voda za PCR korišćena je voda za injekcije (Galenika A.D., Srbija)

Tabela 6. Prikaz sekvence prajmera i veličine amplifikata za PCR identifikaciju koagulaza pozitivnih stafilokoka

Set prajmera	Veličina amplifikata(bp)	Sekvenca 5' – 3'	Dokazivanje
Nuc 1	458	ATGAAGTCAAATAAATCGCT	<i>S. aureus</i>
Nuc 2		TTTGGTGAAAAATACTTCTC	
Nuc 3	270	AAAAATAACAACAGGATTGA	<i>S.hyicus</i>
Nuc 4		GTAAAGTCTGAAGCTTCTT	
Nuc 5	106	GAAAAAAATTACAACAGGCG	<i>S.intermedius</i>
Nuc 6		CACATCCGTTGAAGACTTTT	

Uslovi reakcije su prikazani u tabeli 7, a dobijeni amplifikati su analizirani na agaroznom gelu 1% (w/v) (Serva, Nemačka) i obojeni nakon elektroforeze pomoću etidium bromida u koncentraciji 0,5 μ g/ml (Serva, Nemačka) u trajanju od 10min. Za određivanje veličine fragmenata korišćen je marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder SM0243 (Thermo Scientific, SAD). Za uočavanje PCR produkata korišćen je UV transiluminator (Vilber Lourmat, Nemačka).

Tabela 7. Uslovi reakcije mPCR u cilju molekularne identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokokama

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (minut)	Ciklus
Inicijalna denaturacija	94	5	1
Denaturacija	94	2	40
Povezivanje	55	2	
Izduživanje	72	3	
Krajnje izduživanje	72	6-8	1

4.2.1.3. Detekcija gena za produkciju koagulaze

Koagulaza je značajan faktor virulencije u patogenezi oboljenja uzrokovanih stafilokokama. Ispitivanje gena koji kodira koagulazu ima za cilj razvrstavanje kliničkih izolata *S. aureus* prema tipu koagulaze i uvid u njihovu međusobnu povezanost.

A. Gen *cifa* koji kodira proizvodnju vezane koagulaze ispitan je metodom PCR prema protokolu Kalorey i saradnika (2007).

Izolacija DNK, uređaji i aparati za PCR, kao i bojenje ampifikovanih fragmenata DNK u agaroznom gelu izvedeni istovetno kao i u poglavlju 4.2.1.3, a korišćeni prajmeri, njihova sekvenca i veličina u tabeli 8.

Tabela 8. Sekvenca prajmera i veličina amplifikata za PCR identifikaciju vezane koagulaze

Set prajmera	Veličina amplifikata(bp)	Sekvenca 5' – 3'	Dokazivanje
<i>cifa-f</i>	1042	GGCTTCAGTGCTTGTAGG	Vezana koagulaza
<i>cifa-r</i>		TTTCAGGGTCAATATAAGC	

Zapremina svake smeše za reakciju PCR je 20µl. U sastav smeše ulazile su sledeće komponente: DTE mmix 2x (Invitrogen) 10µl (koji po reakciji sadrži: po 200µM trifosfat nukleotida dNTP, 1U Taq DNA polimeraze 5U/µl, 2mM MgCl₂ i 4µl 10x pufera), prajmeri *cifa-f* 0,2µl i *cifa-r* 0,2µl. Uzorak DNK 1,3µl i voda za PCR 8,3µl.

Uslovi izvođenja PCR su dati u tabeli 9. Za određivanje veličine fragmenata korišćen je marker GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Thermo Scientific, SAD).

Tabela 9. Uslovi reakcije PCR identifikaciju vezane koagulaze

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (minut)	Ciklus
Inicijalna denaturacija	94	5	1
Denaturacija	94	1	35
Povezivanje	58	1	
Izduživanje	72	1,5	
Krajnje izduživanje	72	6	1

B. Gen koji kodira proizvodnju slobodne koagulaze *coa* ispitivan je metodom PCR prema protokolu Kalorey i saradnika (2007).

Zapremina i sastav smeše za PCR su dati u poglavlju 4.2.1.4. A.

Tabela 10. prikaz prajmera za *coa* gen i veličine amplifikata

Set prajmera	Velčina amplifikata(bp)	Sekvenca 5' – 3'	Dokazivanje
<i>coa f</i>	627,710,910	ATAGAGATGCTGGTACAGG	Tip koagulaze
<i>coa r</i>		GCTTCCGATTGTTCGATGC	

Izolacija DNK, uređaji i aparati za PCR, kao i bojenje ampifikovanih fragmenata DNK u agaroznom gelu opisani su u poglavlju 4.2.1.3, a korišćeni prajmeri, njihova sekvenca i veličina u tabeli 10. Uslovi izvođenja PCR su dati u tabeli 11.

Tabela 11. Uslovi reakcije PCR za ispitivanje *coa* gena

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (minut)	Ciklus
Inicijalna denaturacija	94	5	1
Denaturacija	94	1	30
Povezivanje	58	1	
Izduživanje	72	1,5	
Krajnje izduživanje	72	6	1

4.2.2. Ispitivanje osetljivosti kliničkih izolata *S. aureus* na antimikrobne supstance

Ispitivanje osetljivosti kliničkih sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka krava na antibiotike i sulfonamide izvršeno je disk difuzionom metodom, a mikrodilucionom metodom u bujonu ispitana je osetljivost svih izolata na kontrolne antibiotike: linkomicin, neomicin i kloksacilin.

4.2.2.1. Ispitivanje osetljivosti metodom disk difuzije

Osetljivost izolata *S. aureus* ispitana je disk difuzionom metodom prema standardu CLSI (Clinical i Laboratory Standards Institute) M02-A11 (CLSI, 2012), a interpretativne kategorije tumačene su prema standardu M100-S24 (CLSI, 2014) za antibiotike navedene u njemu, a za preostale antibiotike interpretativne kategorije su tumačene prema uputstvu proizvođača. Izbor antibiotika je baziran na dostupnim preparatima za lokalnu terapiju vimena, mastinjektorima u Srbiji (ALIMS, 2014b). Ispitivanje je izvršeno antibiogram diskovima (Becton, Dickinson i company, SAD): penicilin (10 i.j), cefoksitin (30 μ g), tetraciklin (30 μ g), neomicin (5 μ g), trimetoprim-sulfametoksazol (1.25-23.75 μ g), amoksicilin-klavulanska kiselina (20-10 μ g) i linkomicin (2 μ g). Ploče su inkubirane 24h na temperaturi od 37°C u aerobnim uslovima u termostatu (Sutjeska, Srbija). Rezultati su dobijeni merenjem prečnika zona inhibicije a interpretativne kategorije su određene prema standardu (CLSI, 2014).

4.2.2.2. Ispitivanje osetljivosti mikrodilucionom metodom u bujonu

Za ispitivanje osetljivosti bakterija na kontrolne antibiotike korišćen je mikrodilucioni test u bujonu predviđen standardom M26-A (NCCLS, 1999). U sterilne mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića (Spektar, Srbija) uliveno je po 100 μ l CAMHB osim u prvu kolonu. Antibiotici linkomicin, neomicin i kloksacilin (Sigma-Aldrich, SAD) su rastvoreni odgovarajućim rastvaračima prema standardu CLSI (CLSI, 2014) i pripremljeni za rad razblaživanjem do koncentracije od 128 μ g/ml u Miler-Hinton II bujonu. Mikrotitracione ploče su pripremljene za rad dodavanjem po 100 μ l rastvora aktivne supstance i u prvu i drugu kolonu i dvostrukim razblaživanjem u preostale kolone. Koncentracija antibiotika se kretala od 128 μ g/ml do 0,0625 μ g/ml u 12 bazenčića mikrotitracione ploče.

Bakterijski inokulum je pripreman prema standardu M7-A7 (CLSI, 2006) suspendovanjem kolonija sa čvrste podloge u sterilni fiziološki rastvor do koncentracije bakterijskih kolonija (colony-forming unit) $1-2 \times 10^8$ cfu/ml (McFarland 0,5) i razblaživanjem 1:10 do $1-2 \times 10^7$ cfu/ml. Po 5 μ l inokuluma zasejano je u svaki bazenčić, što daje finalnu koncentraciju od $4-5 \times 10^5$ cfu/ml, tj. $4-5 \times 10^4$ cfu/bazenčiću. Kao negativna kontrola postavljene su mikrotitracione ploče bez aktivnih komponenti i ploče bez bakterijskog inokuluma, u početnoj koncentraciji od 256 μ g/ml. Ploče su inkubirane 24h na temperaturi od 37°C pri aerobnim uslovima u termostatu (Sutjeska, Srbija). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) predstavlja najnižu koncentraciju pri kojoj nije bilo vidljivog porasta bakterija.

4.2.3. Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma

4.2.3.1. Ispitivanje prinosa mase biofilma izolata *S. aureus*

Sposobnost stvaranja biofilma je ispitana kod svih izolata *S. aureus* i to kako na fenotipskom nivou merenjem mase biofilma tako i genskom detekcijom *ica* A i D alelnih formi gena koji kodira njegovu produkciju. Izolati koji su pokazali najbolju produkciju mase biofilma odabrani su za ispitivanja dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na biofilm. Sposobnost formiranja biofilma je ispitana modifikacijom ranije opisanih metoda po Vasudevan i saradnicima (2003), Peeters i saradnicima (2008), Rodriguesu i saradnicima (2010), Antunes i saradnicima (2011), kao i Farranu i saradnicima (2013).

A. Formiranje biofilma

Za formiranje biofilma klinički izolati i kontrolni sojevi *S. aureus* su uzgajni u BHI bujonu sa dodatkom 2% glukoze preko noći. Mikrotitracione ploče (Spektar, Srbija) pripremljene su ulivanjem po 50 μ l CAMHB u sve bazenčiće. Inokulum je dobijen od kolonija suspendovanih u turbiditetu 0,5 McFarlanda $1-2 \times 10^8$ cfu/ml razblaženog 1:10 u svežoj podlozi. Suspenzija je ulivena u pojedinačne bazenčiće mikrotitracione ploče u zapremini od 5 μ l i inkubirana na 37°C u trajanju od 24h aerobno u termostatu (Sutjeska, Srbija). Nakon inkubacije sadržaj bazenčića ispiran je šest puta sa po 50 μ l fiziološkog rastvora (da bi se otklonile bakterije koje slobodne u medijumu).

B. Bojenje biofilma

Formirani biofilmovi su fiksirani vazduhom u trajanju od 15min na sobnoj temperaturi. Bojenje produkovane biomase vršeno je dodavanjem 50 μ l rastvora 1% kristal violeta (Acros Organic, Belgija). Nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi, višak boje je ispran, a ploča ostavljena da se osuši 30min na sobnoj temperaturi. Kvantitativna analiza produkcije biofilma vršena je rastvaranjem taloga kristal violeta sirćetnom kiselinom (30% v/v Centrohem, Srbija) u zapremini od 50 μ l etanola u svaki bazenčić i nakon 30min očitavana je optička gustina obojenog biofilma spektrofotometrom na 450nm i 570nm (OD). Svi ispitani izolati zasejani su i očitani u duplikatu. Srednja optička gustina svakog uzorka izračunata je aritmetičkom sredinom dobijenih rezultata merenja (Farran i sar., 2013; Peeters i sar., 2008).

4.2.3.2. Detekcija *icaAD* gena za produkciju biofilma

Identifikacija gena koji kodira produkciju biofilma *ica* u A i D alelnoj formi vršen je metodom PCR prema protokolu po Nasr i saradnika (2012).

Zapremina i sastav smeše za PCR su dati u poglavlju 4.2.1.4.A. Izolacija DNK, uređaji i aparati za PCR opisani su u poglavlju 4.2.1.3. Korišćeni prajmeri, njihova sekvenca i veličina amplifikata predstavljeni su u tabeli 12.

Tabela 12. Prikaz prajmera za PCR dokazivanje gena <i>icaAD</i> i veličine amplifikata			
Set prajmera	Veličina amplifikata(bp)	Sekvenca 5' – 3'	Dokazivanje
<i>icaAD-f</i>	407	TATTCAATTTACAGTCGCAC	Gen za formiranje biofilma, aleli A i D
<i>icaAD-r</i>		GATTCTCTCCCTCTCTGCCA	

Uslovi izvođenja PCR su dati u tabeli 13. Analiza i boljenje ampifikovanih fragmenata DNK u agaroznom gelu opisani su u poglavlju 4.2.1.3.

Tabela 13. Uslovi reakcije PCR za ispitivanje *icaAD* gena

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (minut)	Ciklus
Inicijalna denaturacija	94	3	1
Denaturacija	94	1	35
Povezivanje	58	0:40	
Izduživanje	72	1	
Krajnje izduživanje	72	5	1

4.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema kliničkim izolatima *S. aureus*

Antimikrobna aktivnost karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola ispitana je mikrodilucionom metodom u bujonu kada su određivane vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (eng. *minimum inhibitory concentration* - MIC) i vrednosti minimalne baktericidne koncentracije (eng. *minimum bactericidal concentration* - MBC). Međusobni uticaj ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja na antimikrobnu aktivnost ispitivan je metodom šahovske table u bujonu.

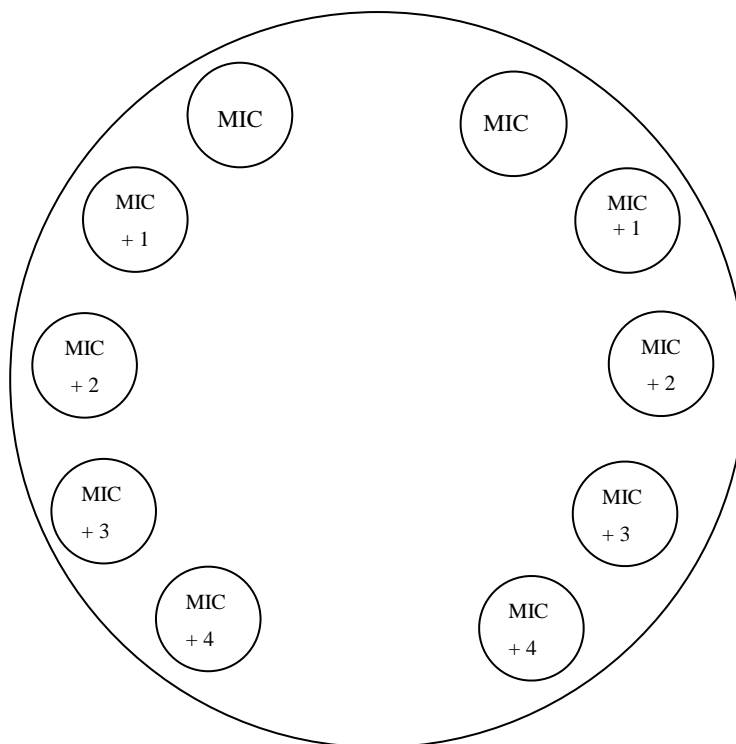
4.2.4.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Određivanje MIC aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola (Essentico, Srbija, udela aktivne supstance 98,9%, gustine 1,098g/ml) prema kliničkim izolatima *S. aureus* ne razlikuje se od metode ispitivanja na kontrolne antibiotika opisane u poglavlju 4.2.2.2. Koncentracija ispitivanih komponenti je bila u rasponu od 1,25µg/ml do 2560µg/ml.

4.2.4.2. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Nakon završenog MIC testa na izolatima stafilokoka, kao i na kontrolnim sojevima, pristupilo se određivanju MBC. Iz bazenčića bez vidljivog porasta, koje određuje vrednost MIC i iz narednih 4 bazenčića veće koncentracije aktivne supstance, uzeto je po 10µl sadržaja i presejano u duplikatu na CAMHA (šema 4). MBC predstavlja

smanjenje broja mikroorganizama za 3 log₁₀ tj.99,9% (NCCLS, 1999). Kako je početni broj bakterija 4-5 x 10⁵ cfu/ml najmanja koncentracija aktivne supstance pri kojoj je beležen porast manje od 5 kolonija predstavlja minimalnu baktericidnu koncentraciju. Svaki uzorak je ispitan u duplikatu.



Šema 4. Inokulacije CAMHA radi dobijanja vrednosti MBC.

4.2.4.3. Ispitivanje antibakterijskog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja u različitim kombinacijama

Za ispitivanje međusobnih interakcija aktivnih komponenti etarskih ulja korišćena je modifikovana metoda šahovske table (Verma, 2007). U testu su korišćene dve sterilne mikrotitracione ploče sa 96 bazenčića za svaku kombinaciju ispitivanih supstanci. U jednu sterilnu mikrotitracionu ploču uliveno je po 50μl CAMHB, osim u prvu i poslednju kolonu. Po 50 μl rastvora aktivne supstance početne koncentracije 2560μg/ml je dodato u prvu i drugu kolonu i istitrirano dvostrukim razblaživanjem zaključno sa predposlednjom kolonom. U drugu mikrotitracionu ploču uliveno je po 100μl CAMHB (Becton, Dickinson i Company, SAD) osim u prvi i poslednji red. Rastvor druge aktivne supstance (B) je uliven u prvi i drugi red, a zatim istitriran dvostrukim razblaženjem zaključno sa predposlednjim redom. Po 50μl prebacivano je iz druge u prvu ploču od

drugog do poslednjeg reda, osim bazenčića u poslednjem redu poslednje kolone. Koncentracije ispitivanih supstanci su se kretale od 20 µg/ml do 1280µg/ml, odnosno od 1,25 µg/ml do 1280µg/ml (šema 5.). Na kraju je uliveno 50µl CAMHB u poslednji bazenčić poslednje kolone koji je služio kao kontrola sterilnosti (K_s). Bakterijski inokulum je pripremljen prema standardu CLSI M7-A7 stavljanjem kolonija sa čvrste podloge u sterilni fiziološki rastvor do koncentracije 1-2 x 10⁸ cfu/ml (McFarland 0,5) i razblaživanjem 1:10 do 1-2 x 10⁷ cfu/ml. Po 5µl inokuluma zasejano je u bazenčiće, što je dalo finalnu koncentraciju od 4-5 x 10⁵ cfu/ml u svim bazenčićima osim u K_s. Bazenčić u prvoj koloni dvanaestog reda služio je kao kontrola porasta (K_p). Prva ploča je inkubirana aerobno 24h na 37°C. Nakon 24h je očitana vrednost MIC kao najmanje razblaženje aktivne supstance gde nema vidljivog porasta u bazenčiću. Šematski prikaz postavljenih koncentracija supstanc A i B u mikrotitracionoj ploči prikazan je na šemi 5. Očitani su MIC čistih supstanci u odgovarajućem redu ili koloni, a zatim su očitani MIC u kombinacijama. Izračunata je frakciona inhibitorna koncentracija (FIC) za svaki red prema matematičkoj formuli:

$$FIC (A) = \frac{\text{Koncentracija supstance A u kombinaciji}}{\text{MIC čiste supstance A}}$$

$$FIC (B) = \frac{\text{Koncentracija supstance B u kombinaciji}}{\text{MIC čiste supstance B}}$$

Izračunata je FIC za celu ploču: ΣFIC = FIC A+ FIC B

Interpretacija rezultata:

Sinergističko delovanje = ΣFIC je manje ili jednako 0,5.

Indiferentno delovanje = ΣFIC je veće od 0,5 i manje ili jednako 4.

Antagonističko delovanje = ΣFIC je veće od 4.

Šema 5. Prikaz koncentracija aktivnih supstanci u testu šahovske table												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	K _p
	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	
B	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	
	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	1280
C	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	
	320	320	320	320	320	320	320	320	320	320	320	640
D	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	
	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	320
E	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	
	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	160
F	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	80
G	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	
	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	40
H	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	K _s

Koncentracije aktivnih supstanci A (zatamljena polja) i B (svetla polja) u testu šahovske table (µg/ml)

4.2.5. Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja na *S. aureus*

Dužina dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja ispitana je praćenjem antibakterijskog efekta prema referentnim sojevima *S. aureus* ATCC 25923 u mleku. Mleko u prahu je rekonstituisano destilovanom vodom (12,75g ad 100ml) i sterilisano u autoklavu (Rypa, Španija). Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, mleko je pripremljeno u količini od 25ml u sterilnim posudama sa navojem (à 60ml Dunavplast, Indija, Srbija). U mleko su dodate aktivne supstance u finalnoj koncentraciji na aritmetičkoj sredini između vrednosti MIC i MBC i bakterijski inokulum. Inokulum je pripremljen od kolonija starih 24h koje su održavane na CAMHA suspendovanih u fiziološkom rastvoru turbiditeta 0,5 McFarlanda što predstavlja $1-2 \times 10^8$ cfu/ml. U mleko je dodato po 133 μ l ovako pripremljenog inokuluma i finalna koncentracija je iznosila 6×10^6 cfu/ml. Radi oponašanja zapaljenskog procesa u živom organizmu, na 48h, ukupno tri puta (drugog, četvrtog i šestog dana) dodavan je inokulum istih karakteristika. Na svakih 24h vršeno je brojanje kolonija (Verma, 2007) na CAMHA. Ukoliko je broj bakterija prelazio 10^8 cfu/ml, vrednost je zaokruživana na 10^8 cfu/ml. Broj bakterija je iskazan u logaritamskim vrednostima.

4.2.6. Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na *S. aureus* u biofilmu

Za ispitivanje delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja korišćena je studijska kolekcija od 20 izolata *S. aureus* i to izolati: 30, 60, 83, 84, 98, 99, 100, 105, 111, 112, 116, 118, 119, 120, 122, 127, 129 koji su najpotentnije proizveli biofilm, kao i kontrolni sojevi ATCC 25923, ATCC 43300 i kontrolni soj Biofilm producent BF. Dejstvo aktivnih komponenti na biofilm ispitano je na formiranim biofilmovima starih 24h. Nakon dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja merena je vrednost ekstinkcije mase biofilмова ili živih ćelija biofilma i upoređivana sa vrednostima ekstinkcije netretiranih biofilмова istog izolata. Dobijenim podacima prikazano je delovanje ispitanih aktivnih materija na masu biofilмова i na žive ćelije u biofilmovima.

4.2.6.1. Utvrđivanje dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma

Nakon 24 h dugog formiranja biofilma postupkom prethodno opisanim u 4.2.4.1.A, u mikrotitracionu ploču ulivena je ispitivana aktivna komponenta u rasponu koncentracija od 80µg/ml do 2560µg/ml. Dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma je ispitano modifikacijom ranije opisanih metoda po Peetersu i saradnicima (2008), Nostru i saradnicima (2007), Antunesu i saradnicima (2011), kao i Farranu i saradnicima (2013).

Kao kontrola umesto aktivnih komponenti dodavani su antibiotici linkomicin, neomicin i kloksacilin. Biofilmovima u mikrotitracionim pločama je posle inkubacije u aerobnim uslovima od 24h sa odgovarajućom komponentom etarskog ulja odnosno antibiotika, dodavan rastvor kristal violeta prema metodi opisanoj u poglavlju 4.2.4.1.B. Smanjenje mase biofilma je određivano poređenjem očitanih vrednosti ekstinkcije u bazenčićima bez dodavanja aktivne komponente/antibiotika sa vrednošću ekstinkcije u bazenčićima sa dodatom aktivnom komponentom etarskog ulja/antibiotikom određene koncentracije. Optička gustina obojenog biofilma je očitavana pomoću spektrofotometra uz upotrebu filtera od 450nm i 570nm (OD). Svi ispitani izolati zasejani su i očitani u duplikatu. Koncentracija aktivne komponente/antibiotika – MIC biofilma koja je dovela do smanjenja ekstinkcije biofilma na polovinu vrednosti ekstinkcije kontrolnog netretiranog biofilma uzeta je kao kritična koncentracija koja dovodi do smanjenja mase biofilma na 50% mase netretiranog biofilma. Smanjenje biofilma je izračunato prema matematičkoj formulaciji:

$$\text{Smanjenje mase biofilma (\%)} = \frac{\text{Ekstinkcija tretiranog biofilma}}{\text{Ekstinkcija netretiranog biofilma}} * 100$$

4.2.6.2. Utvrđivanje baktericidnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na ćelije biofilma

Test eradikacije živih ćelija biofilma je zasnovan na utvrđivanju razlike u broju živih i neživih ćelija biofilma. Razlika se utvrđuje kvantitativno merenjem ekstinkcije produkata degradacije tetrazolijumske soli - metiltiazoltetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich, SAD) (Saising i sar., 2012). Metoda je zasnovana na sposobnosti vijabilnih

ćelija (metabolički aktivnih ćelija), koje sadrže mitohondrijalnu dehidrogenazu, da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT), odnosno da žuto obojeno jedinjenje rastvorljivo u vodi prevedu u ljubičasto plave kristale formazana koji je nerastvorljiv u vodi. Očitavanje reakcije se vrši dodavanjem DMSO i spektrofotometrijskim određivanjem vrednosti ekstinkcije.

Nakon produkcije biofilma starog 24h prema metodi opisanoj u poglavlju 4.2.4.1.A. u mikrotitracionu ploču uliven je bujon sa odgovarajućom koncentracijom ispitujuće aktivne supstance u rasponu od 80µg/ml do 2560µg/ml, istim postupkom koji je primenjivan kod ispitivanja smanjenja mase biofilma opisanim u poglavlju 4.2.6.2. Za obeležavanje i kvantifikaciju živih ćelija u biofilmu upotrebljeno je po 50µl MTT (Sigma-Aldrich, SAD) rastvorenog u PBS (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon inkubacije preko noći, supernatant je odliven, a kristali formiranog formazana su rastvoreni sa 50µl DMSO (Centrophem, Srbija) po bazenčiću i očitani pomoću spektrofotometra sa filterima od 450 i 570nm. Sva ispitivanja su urađena u duplikatu. Smanjenje živih bakterija biofilma mereno je upoređivanjem vrednosti ekstinkcije u bazenčićima bez dodavanja aktivne i ekstinkcije u bazenčićima sa određenom koncentracijom aktivne komponente etarskog ulja. Koncentracija aktivne materije koja je dovela do smanjenja ekstinkcije živih bakterija u biofilmu na polovinu vrednosti ekstinkcije netretiranog biofilma – MBC biofilma uzeta je kao kritična koncentracija koja dovodi do smanjenja broja živih ćelija biofilma na 50% broja ćelija netretiranog biofilma. Smanjenje živih ćelija biofilma je izračunato prema matematičkoj formulaciji:

$$\text{Smanjenje živih ćelija biofilma (\%)} = \frac{\text{Ekstinkcija tretiranog biofilma}}{\text{Ekstinkcija netretiranog biofilma}} * 100$$

4.2.7. Statistička obrada podataka

Svi dobijeni podaci u ovim ispitivanjima obrađeni su metodom deskriptivne statistike, a u cilju obrade podataka koji su se odnosili na kvantitativnu analizu, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

Statističke analize parametrijskih podataka izvršene su pomoću Studentovog t-testa i jednosmerne analize varijanse. Višestruko poređenje sredina utvrđeno je primenom testa

najmanje značajne razlike (LSD). Neprametrijski podaci su ispitani Kruskal –Wallis statističkim testom na postojanje statističke značajnosti između dejstva ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja. Statističkim Danovim testom ustanovljeno je između kojih ispitanih aktivnih komponenti i na kom nivou postoji razlika. Vrednost verovatnoće od 0,05 smatrana je značajnom. Sva izračunavanja izvršena su primenom statističkih programa (Statistica verzija 8.0 i GraphPad Prism verzija 5.0).

5. REZULTATI

5.1. Izolacija i identifikacija

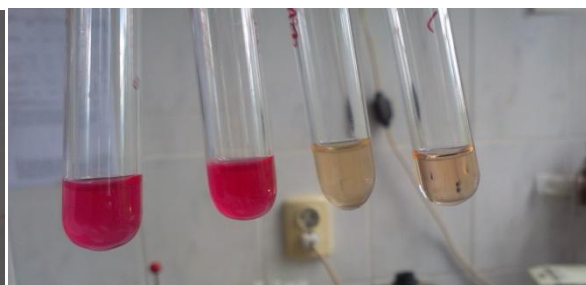
Mikrobiološko ispitivanje vršeno je prema programu redovne kontrole mleka muznih krava holštajn-frizijske rase u periodu od marta do juna 2014. godine. Kontrola mastitisa obuhvatala je određivanje broja somatskih ćelija u mleku (California mastitis test), a svi uzorci sa povećanim brojem somatskih ćelija su i mikrobiološki ispitani. Sa 7 farmi na kojima se drži 8 500 grla, iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u slučajevima kliničkih i supkliničkih mastitisa izolovano je 113 sojeva koji su po svojim karakteristikama odgovarali koagulaza pozitivnim stafilokokama. Od ukupnog broja izolovanih koagulaza pozitivnih stafilokoka, za molekularna ispitivanja prisustva i tipizacije gena korišćeni su samo izolati *S. aureus* potvrđeni metodom PCR.

5.1.1. Fenotipska identifikacija

Izolati su imali karakterističan izgled kolonija nakon 24h inkubacije u aerobnim uslovima na krvnom agaru: kolonije su bile okrugle, glatke, sjajne, bele ili žućkasto pigmentirane, oko kolonija se pružala zona potpune hemolize, a katalaza i koagulaza testovi su bili pozitivni. Na mikroskopskom preparatu izolati su imali tipičan izgled koka (0,5-1 μ m u prečniku) pozitivnih pri bojenju po Gramu najčešće u grupama nalik grozdovima. Skraćeni biohemijski niz koji je primenjen u radu sastojao se od ONPG testa, i ispitivanja fermentacije manitola i maltoze (slike 2 i 3). Za dalji rad odabrani su samo koagulaza pozitivni izolati.



Slika 2. ONPG test. Sa leve strane: prve dve epruvete negativan test, pozitivan treći i neinokulisan test



Slika 3. Test razgradnje šećera (manitol i maltoza). Sa leve strane: prve dve epruvete pozitivan, negativan i neinokulisan test

Rezultati primarne fenotipske identifikacije skraćenim biohemijskim nizom dati su u tabeli 14.

Tabela 14. Rezultati fenotipske identifikacije

<i>S. aureus</i>		<i>S. intermedius</i>		<i>S. hyicus</i>		Ne identifikovano	
Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
51	45,13	49	43,36	3	2,65	10	8,85

Na osnovu primarne fenotipske identifikacije od ukupno 113 izolata, 51 izolat (45,13%) se odlikovao osobinama karakterističnim za *S. aureus*, dok je 49 izolata (43,36%) primarno identifikovano kao *S. intermedius*, 3 izolata (2,65%) su identifikovana kao *S. hyicus* dok su ostalih 10 izolata (8,85%) opisani kao ostali koagulaza pozitivni pripadnici roda *Staphylococcus*.

5.1.2. Molekularna identifikacija *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus*

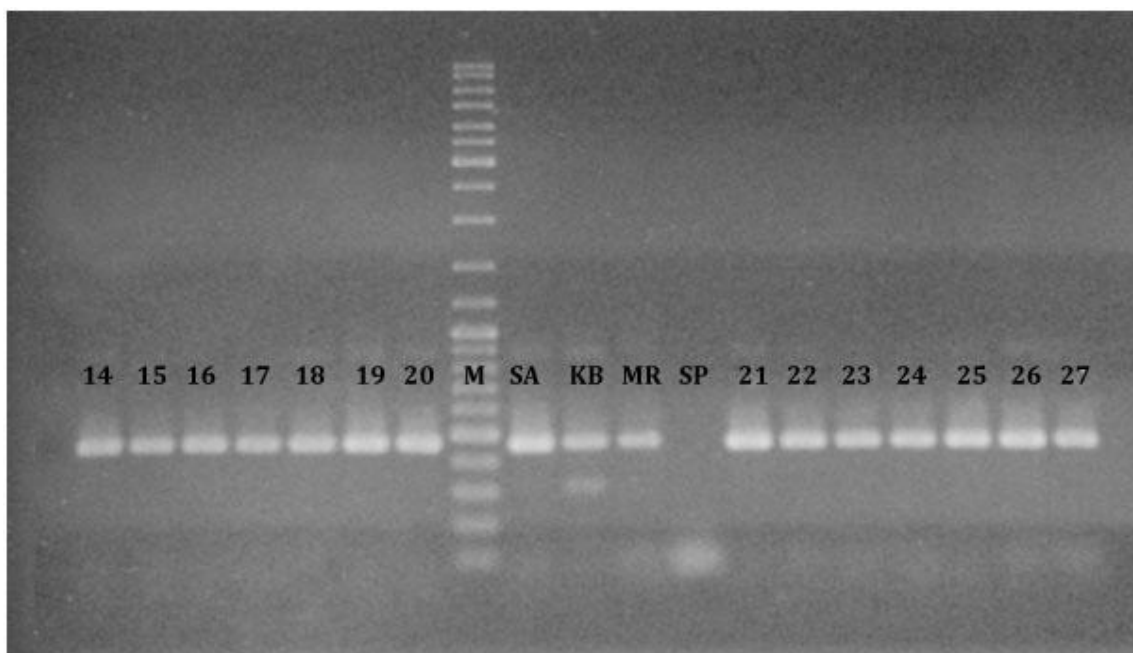
Molekularna identifikacija zasnovana na razlici *nuc* gena kod *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus*, bila je uspešna kod 103 od ukupno 113 ispitanih izolata. Fotografija agaroznog gela nakon PCR, elektroforeze i bojenja prikazana je na slici 4. Rezultati molekularne identifikacije prikazani su u tabeli 15.

Tabela 15. Rezultati molekularne identifikacije

<i>S. aureus</i>		<i>S. intermedius</i>		<i>S. hyicus</i>		Ne identifikovano	
Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
103	91,15	0	0	0	0	10	8,85

Upoređivanjem fenotipske i genotipske identifikacije pokazalo se da je primenom metode mPCR potvrđena biohemijska identifikacija *S. aureus* u 47 slučajeva (41,59%), dok je u 44 slučaja (38,94%) mPCR je pokazao identifikaciju *S. aureus* koji je prethodnom biohemijskom identifikacijom svrstan u *S. intermedius* ili *S. hyicus*. U 12 slučajeva (10,62%) biohemijski niz nije dao primarnu identifikaciju vrste ali je primenom metode mPCR ustanovljeno da je reč o *S. aureus*. Tokom ispitivanja 4 izolata (3,54%) biohemijski je identifikovano kao *S. aureus* što nije potvrđeno mPCR

reakcijom, a 6 izolata (5,41%) su i biohemijski i mPCR svrstani u ostale vrste roda *Staphylococcus*.



Slika 4. Prikaz završene elektroforeze mPCR za identifikaciju *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus* M – marker SA – *S. aureus* ATCC 25923 KB-*S. aureus* kontrolni soj za proizvodnju biofilma MR- *S. aureus* ATCC 43300 SP- slepa proba

U tabeli 16 su prikazane učestalosti identifikacije *S. aureus* kratkim biohemijskim nizom dok se svi ostali rezultati vode pod oznakom ostali.

Tabela 16. Meknemar χ^2 test korelacija metoda identifikacije

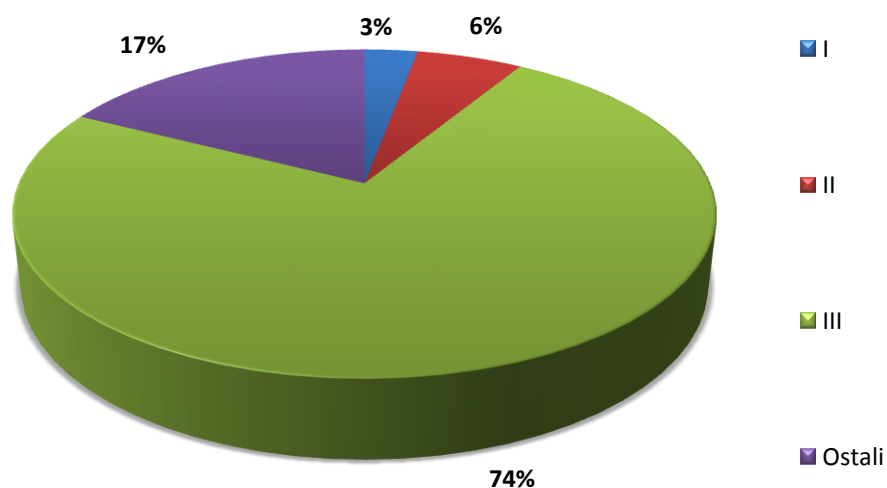
Fenotipski	PCR		Zbir
	<i>S. aureus</i>	Ostali	
<i>S. aureus</i>	47	4	51
Ostali	56	6	62
Zbir	103	10	113

Statističkom obradom rezultata dobijenih dobijenih fenotipskom i genotipskom identifikacijom prema $\bar{\chi}^2$ testu po Meknemaru dobijena je vrednost $\chi^2 = 46,81$. Utvrđena je statistički vrlo značajna ($p < 0,01$) razlika u identifikaciji *S. aureus* korišćenjem mPCR i kratkog biohemijskog niza, što potvrđuje značaj molekularnih

metoda u identifikaciji stafilokoka. Od 10 PCR neidentifikovanih izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, prema fenotipskim karakteristikama odnosno prema rezultatima biohemijskih reakcija to su bili: 5 izolata *S. aureus*, 4 izolata *S. intermedius* i 1 izolat *S. hyicus*.

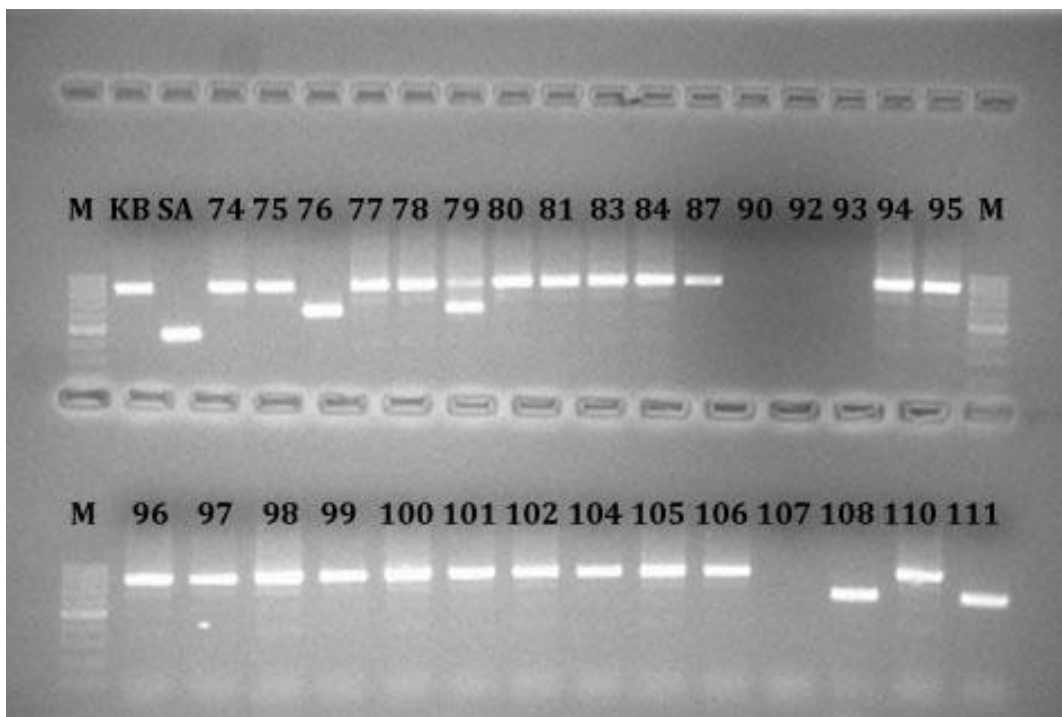
5.1.3. Detekcija gena za produkciju koagulaze

U cilju utvrđivanja genske osnove produkcije koagulaze izvršeno je ispitivanje alelne forme gena koji kodira koagulazu (*coa*). Opseg ispitivanja prethodno navedenim prajmerima potvrdila je postojanje *coa* gena u 3 izoalelne forme i to I (627bp), II (710bp) i III (910bp). Na osnovu dobijenih rezultata utvrđivala se i srodnost ispitanih izolata *S. aureus*. U grafikonu 2 prikazana je učestalost izoalelnih formi *coa* gena.



Grafikon 2. Zastupljenost alelnih formi tipova koagulaze

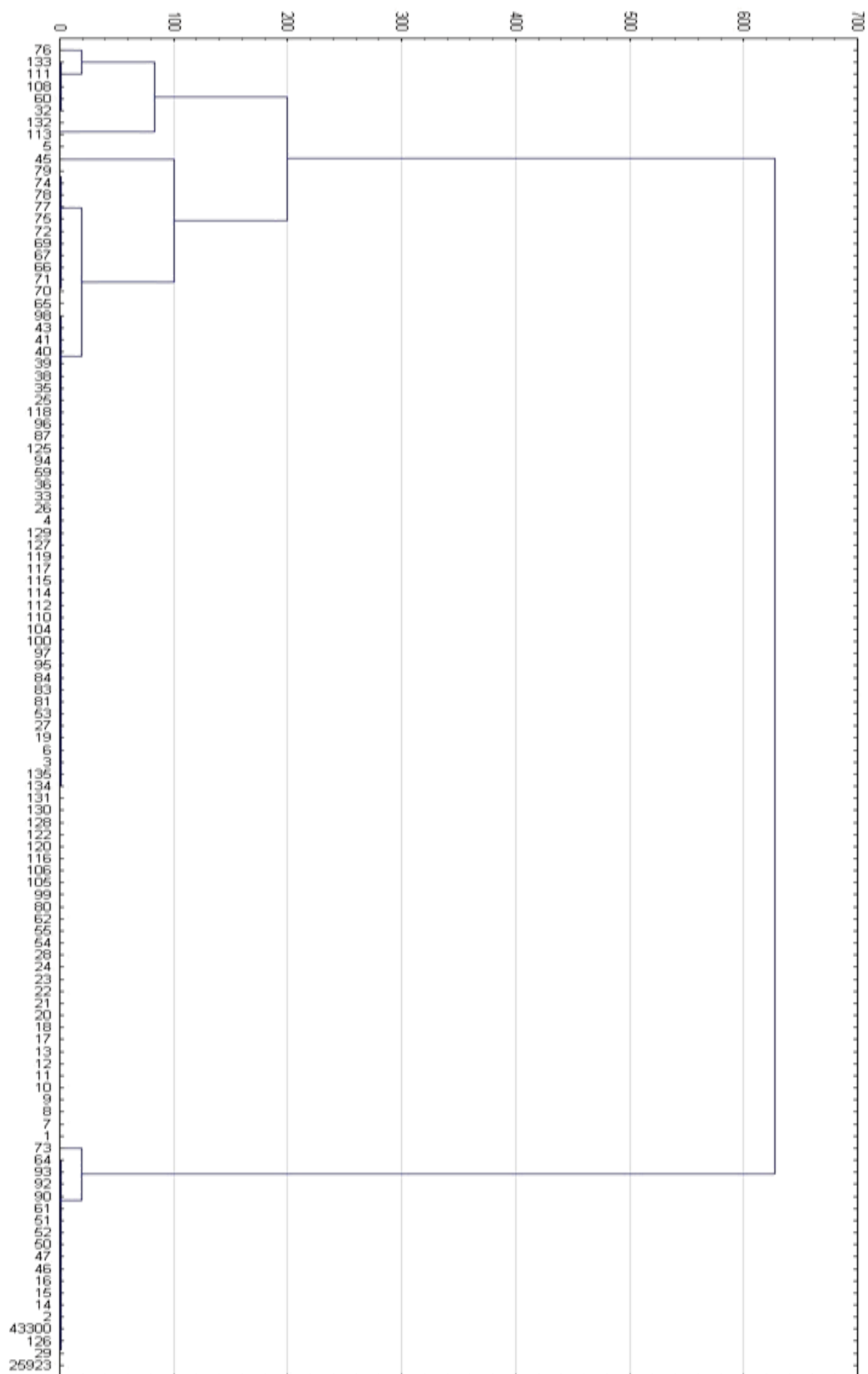
Fotografija PCR elektroforeze za identifikaciju tipa koagulaze prikazana je na slici 5.



Slika 5. Prikaz elektroforeze PCR za identifikaciju tipa koagulaze
M – marker KB-*S. aureus* kontrolni soj za proizvodnju biofilma SA- *S. aureus* ATCC 25923

Pri ispitivanju *coa* gena svih *S. aureus* sojeva potvrđenih PCR metodom, najučestaliji nalaz je bila III izoalelna forma kod 76 (73,77%) izolata, zatim II kod 6 (5,83%) izolata i I kod 3 (2,91%) izolata. Ostali izolati - njih 16 (15,53%) pripadali su izoalelnim formama koje su van opsega korišćenih prajmera i koji se ne mogu utvrditi bez opsežnijeg ispitivanja, dok su 2 (1,94%) izolata davala dvostruki rezultat.

Izračunavanjem dendrograma međusobne povezanosti izolata *S. aureus* dobijen je veliki klaster koji obuhvata većinu izolata uslovljen tipom koagulaze i odstupanjima u fermentaciji ispitivanih šećera i prisustva enzima β galaktozidaze. Na marginama dendrograma se nalaze kontrolni sojevi ATCC 25923 i ATCC 43300 koji vode poreklo od ljudi. Izolati distribuirani u grupi oko kontrolnih sojeva su izolati kojima se nije mogao utvrditi tip koagulaze primenjenim metodama. Manji broj izolata spada u grupu izolata koji čine različite potklustere jer su posedovale manje zastupljene tipove koagulaze, a neki od njih su i nespecifično reagovali na kratkom biohemijskom testu.



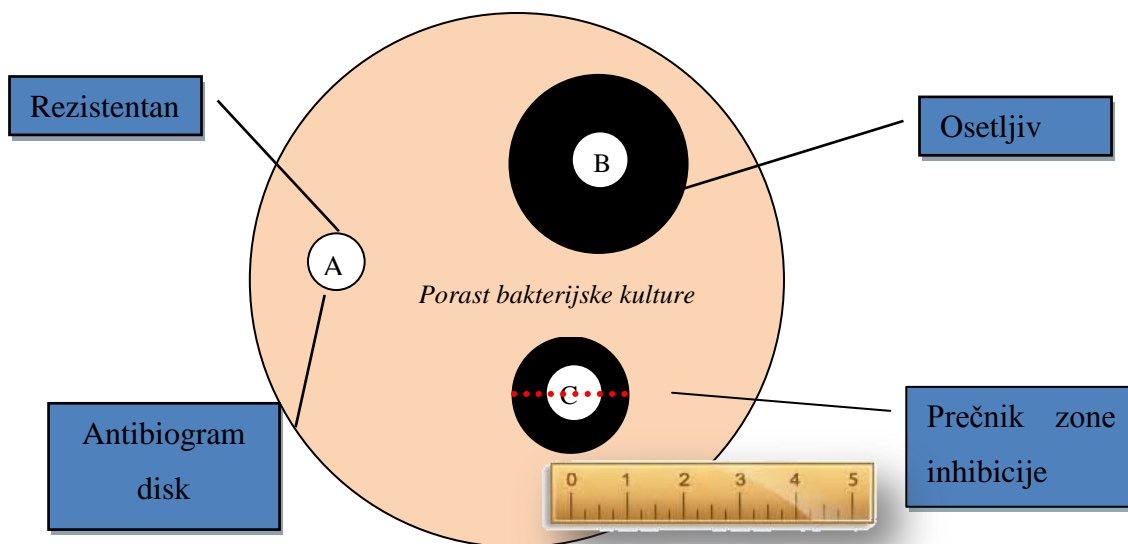
Grafikon 3. Dendrogram međusobne povezanosti izolata *S. aureus* na osnovu Euklidove distance rezultata ispitivanja biohemijskih i genetičkih osobina

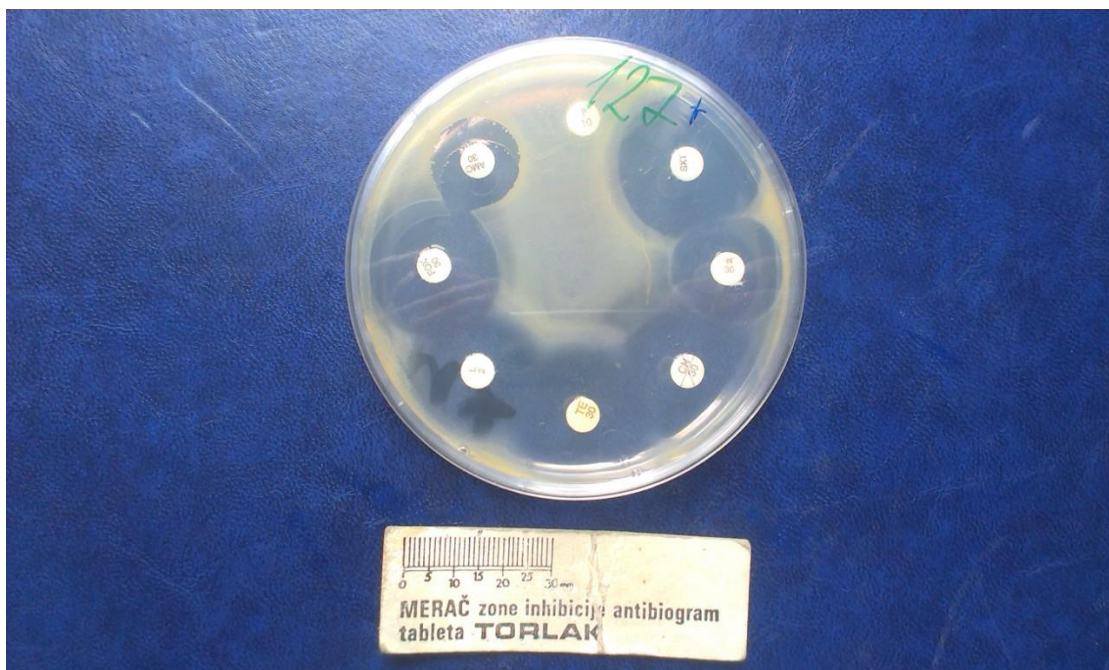
5.2. Ispitivanje osetljivosti kliničkih izolata *S. aureus* na antimikrobne supstance

Pre ispitivanja dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja izvršeno je ispitivanje osetljivosti svih izolata *S. aureus* iz mleka krava obolelih od supkliničkih i kliničkih mastitisa na uobičajne antimikrobne supstance koje se koriste u terapiji na teritoriji Republike Srbije i to primenom dve metode, disk difuzione i mikrodilucione metode u bujonu.

5.2.1. Ispitivanje osetljivosti metodom disk difuzije

Disk difuziona metoda se zasniva na merenju prečnika inhibicije rasta uzročnika oko diska sa antibiotikom i koristi se kao osnovna mikrobiološka metoda u izboru adekvatnog antibiotika za terapiju mastitisa. Prilikom statističke obrade rezultata, zone inhibicije od 0-7mm su tumačene kao 0mm, a 30 i preko 30mm kao 30mm. Na slici 6 prikazana je šema i fotografija disk difuzione metode.





Slika 6. Šematski prikaz i fotografija ispitivanja osetljivosti disk difuzionom metodom

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih sojeva *S. aureus* prema antimikrobnim sredstvima prikazani su u tabeli 17.

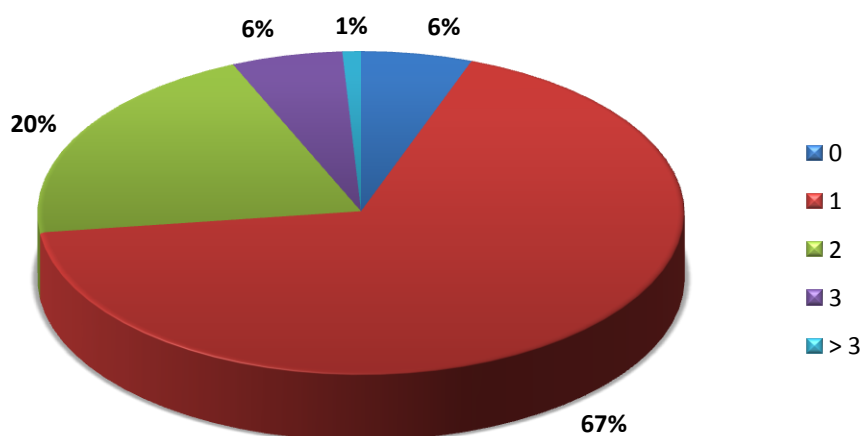
Tabela 17. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata disk difuzionom metodom

Antibiotik	Osetljivo		Intermedijarno osetljivo		Rezistentno	
	n	%	N	%	n	%
Penicilin	12	10,62	0	0	101	96,19
Cefoksitin	107	94,69	0	0	6	5,71
Amoksisicilin-klavulanska kiselina*	99	87,61	0	0	14	13,33
Cefaleksin*	96	84,96	8	7,08	9	8,57
Tetraciklin	106	93,81	3	2,65	4	3,81
Linkomicin**	108	95,58	0	0,00	5	4,42
Neomicin*	91	80,53	16	14,16	6	5,71
Trimetoprim-sulfametoksazol	112	99,12	1	0,88	0	0

*preporuka proizvođača antibiogram diskova **preporuka (Petrovski i sar., 2015)

Ispitivanjem izolata *S. aureus* disk difuzionom metodom prema 8 antimikrobnih sredstava, koji se najčešće koriste kod mastitisa krava, utvrđena je osetljivost kod 6 odnosno 5,31% izolata, što je prikazano na grafikonu 4. Rezistencija prema jednom, odnosno osetljivost prema 7 hemoterapeutika ispoljilo je 72 odnosno 63,72% izolata i to uglavnom prema penicilinu G. Na dve ispitane antimikrobne supstance rezistenciju je ispoljilo 22 (19,47%) izolata. Rezistenciju na 3 anitibiotika pokazala su 6 izolata što čini (5,31%). Na više od 3 ispitana antibiotika, rezistenciju je pokazao 1 izolat (0,88%), koji je osim rezistencije na β laktamske antibiotike pokazao i rezistenciju na tetraciklin.

Intermedijarnu osetljivost je pokazalo ukupno 23, što čini 20,32% izolata, i to najčešće na neomicin 16 odnosno 14,16% izolata. Šest izolata su bila intermedijarno osetljiva na 2 antibiotika dok je ostalih 17 izolata intermedijarno osetljivo na jedan antimikrobni preparat.



Grafikon 4. Rezistentni izolati prema broju antimikrobnih supstanci

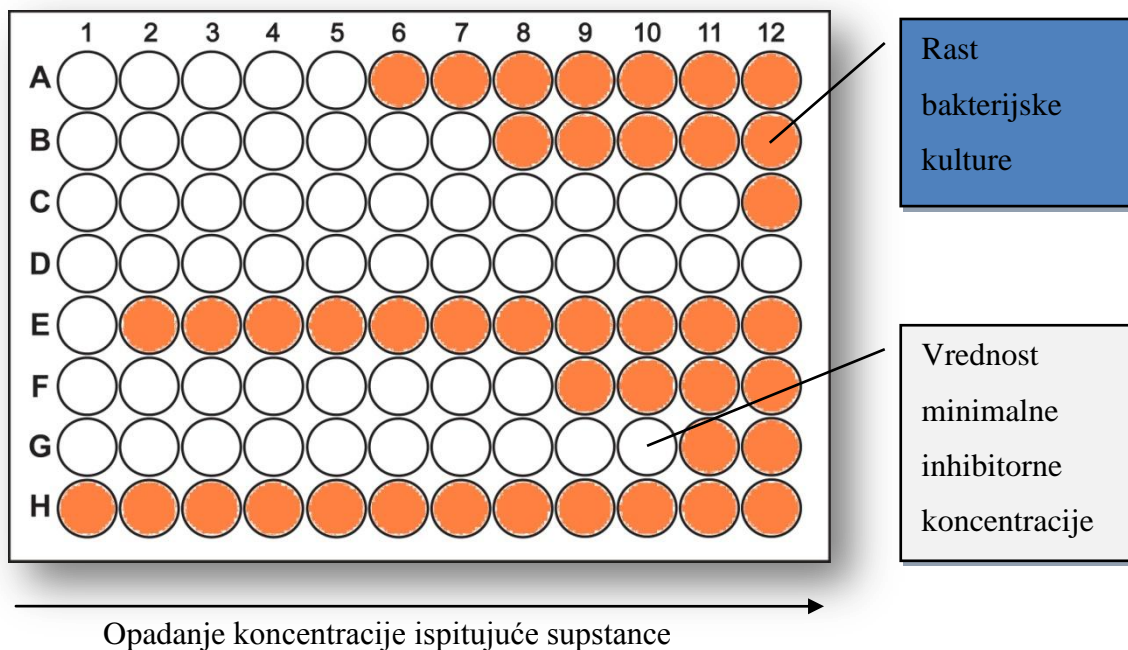
Ispitivanjem osetljivosti izolata *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka na penicilin G ustanovljena je rezistencija kod 96,19% sojeva. Prečnik zone inhibicije cefoksitina u proseku je iznosio 25,96mm, dok je rezistenciju pokazalo 6 izolata (5,71%), od kojih 2 (1,77%) su pokazala rezistenciju i na tetraciklin. Na kombinaciju amoksicilina i klavulanske kiseline rezistenciju je pokazalo 14 izolata (13,33%) uz srednju vrednost

zone inhibicije od 23,93mm. Na cefaleksin rezistentno je bilo 9 izolata (8,57%), a u ispitujućoj kolekciji srednja vrednost zone inhibicije je bila 21,10mm.

Rezistenciju prema tetraciklinu je ispoljilo 4 izolata (3,81%) a srednja vrednost zone inhibicije je bila 23,93mm. Na neomicin je rezistentno 6 izolata (5,71%), a srednja vrednost zone inhibicije je iznosila 18,44mm. Ispitivani izolati su dali srednju vrednost zone inhibicije od 19,98mm prema linkomicinu. Na kombinaciju trimetoprima sa sulfametoksazolom nije bilo rezistencije uz srednju vrednost zone inhibicije od 27,44mm.

5.2.2. Ispitivanje osetljivosti mikrodilucionom metodom u bujonu

Ispitivanjem osetljivosti *S. aureus* mikrodilucionom metodom u bujonu dobijeni su rezultati za kontrolne antibiotike: linkomicin, neomicin i tetraciklin (slika 7). Od antibiotika delovanje u najmanjoj koncentraciji je ispoljio kloksacilin u koncentraciji od $0,31 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$, zatim linkomicin ($0,98 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$) i neomicin ($1,78 \pm 0,86 \mu\text{g/ml}$). Kloksacilin je pokazao MIC50 u koncentraciji $0,06 \mu\text{g/ml}$, zatim linkomicin ($0,25 \mu\text{g/ml}$) i na kraju neomicin ($0,5 \mu\text{g/ml}$) što je prikazano u tabeli 18.





Slika 7. Šematski prikaz i fotografija ispitivanja osetljivosti difuzionom metodom u bujonu

Tabela 18. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *S. aureus* mikrodilucionom metodom u bujonu

	Linkomicin	Neomicin	Kloksacilin
Srednja vrednost	0,98	1,78	0,31
Geometrijska sredina	0,37	0,41	0,03
Minimum	≤0,06	≤0,06	≤0,06
Maksimum	64	64	32
MIC50	0,25	0,5	0,06
MIC90	0,5	1	0,06
Modus	0,5	1	≤0,06
Standardna devijacija	6,241	8,849	3,123
Standardna greška	0,61	0,86	0,30

Najveću homogenost kod antibiotika imao je kloksacilin čija se najčešće izmerena vrednost MIC $\leq 0,06\mu\text{g/ml}$ poklopila sa 97,14% izolata, zatim slede linkomicin sa MIC $0,5\mu\text{g/ml}$ u 46,67% izolata i neomicin sa vrednošću MIC od $1\mu\text{g/ml}$ u 39,05% izolata. Minimalnu baktericidnu koncentraciju kontrolnih antibiotika pokazao je kloksacilin sa $3,23\mu\text{g/ml}$, zatim linkomicin $83,81\mu\text{g/ml}$ i neomicin $98,21\mu\text{g/ml}$.

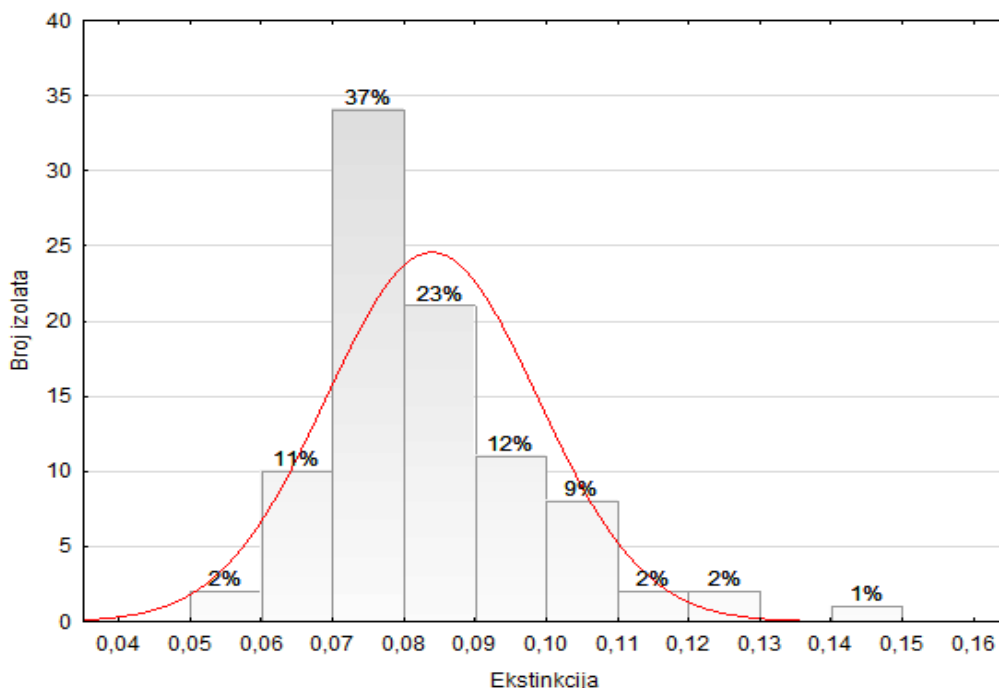
5.3. Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma

5.3.1. Ispitivanje prinosa mase biofilma izolata *S. aureus*

Ispitivanje izolata *S. aureus* na proizvodnju biofilma izvršeno je sa ciljem sagledavanja sposobnosti produkcije biofilma. Svim izolatima je kvantifikovan prinos biofilma tokom 24h bojenjem kristal violetom i merenjem ekstinkcije dobijenog biofilma. U tabeli 19 zbirno su prikazane vrednosti produkcije biofilma ispitanih izolata. Distribucija izolata prema prinosu mase biofilma, prikazana je na grafikonu 5

Tabela 19. Rezultati ispitivanja produkcije biofilma izolata *S. aureus*

Minimum	Maksimum	Srednja vrednost	Koeficijent varijacije
0,056	0,144	0,084	17,65 %

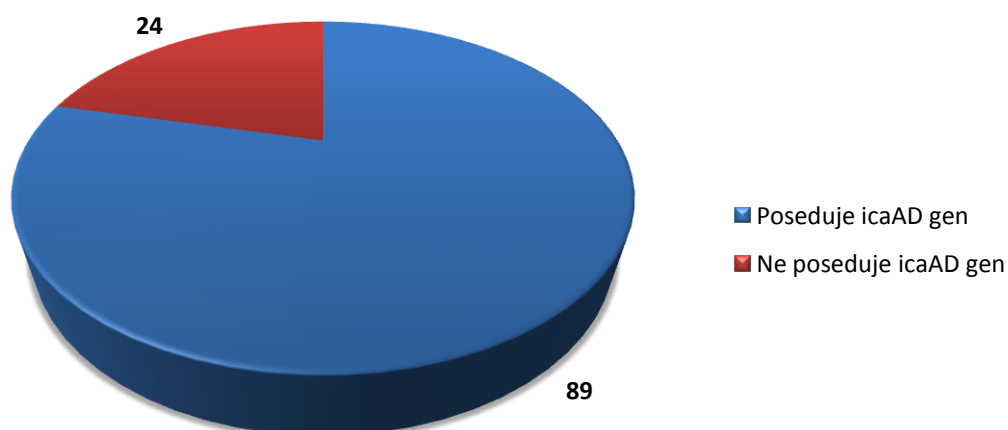


Grafikon 5. Distribucija izolata prema sposobnosti stvaranja biofilma

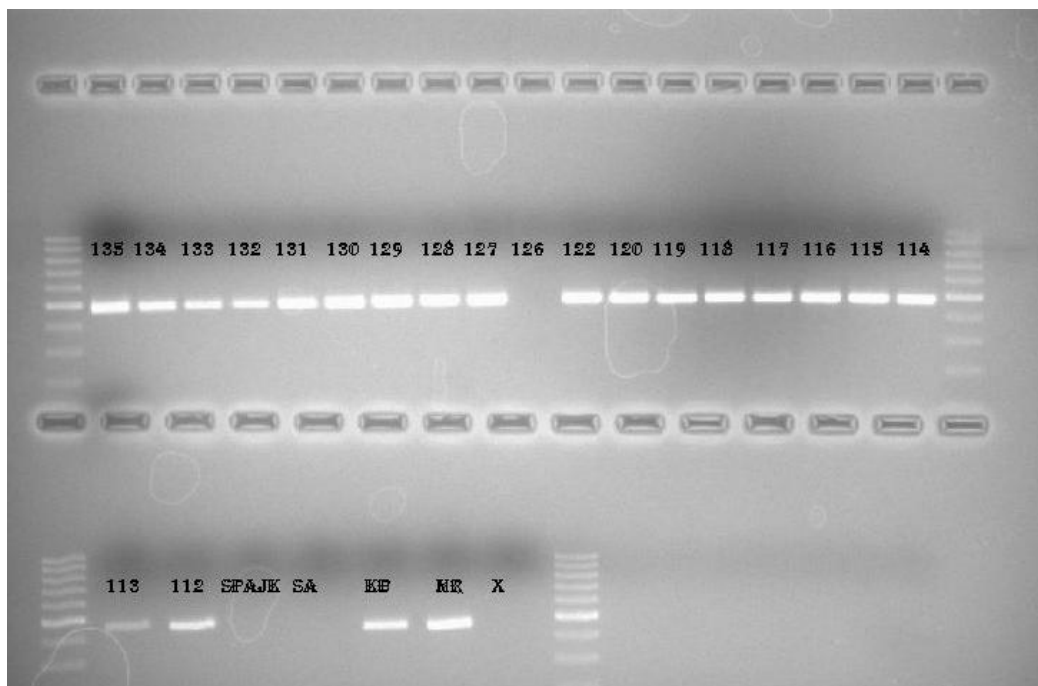
Distribucija izolata *S. aureus* prema sposobnosti stvaranja biofilma ukazuje da je najveći broj izolata imao ekstinkciju 0,07 do 0,08 i da je 14% izolata imalo ekstinkciju preko 0,1. Fenotipskim ispitivanjem biomase biofilma dobijeni su rezultati na osnovu kojih je izvršen izbor najpotentnijih izolata za testove dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma i za ispitivanje dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na žive ćelije biofilma.

5.3.2. Identifikacija *icaAD* gena za produkciju biofilma

Pored fenotipskog ispitivanja biofilma, sprovedeno je i ispitivanje prisustva *ica* gena u alelnim formama A i D primenom PCR metode, a dobijeni rezultati prikazani su na grafikonu 6. i slici 8. Alelne forme A i D *ica* gena utvrđene su kod 89 (78,76%) izolata, a kod 14 izolata pored tipične trake prilikom elektroforeze ustanovljena je i nespecifična traka (12,39%). Negativan nalaz *icaAD* genskog lokusa je zabeležen kod 24 izolata (21,24%).



Grafikon 6. Nalaz *icaAD* gena kod ispitivanih izolata *S. aureus*



Slika 8. Fotografija elektroforeze ispitivanja prisustva gena za produkciju biofilma AD *ica* gena (izolati, SPAJK – spojena dнк *Escherichia .coli*, *Enterococcus faecalis* i *Streptococcus agalataiae*, SA-*S. aureus* ATCC 25923, MR-*S. aureus* ATCC 43300, KB-*S. aureus* producent biofilma)

5.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema kliničkim izolatima *S. aureus*

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema *S. aureus* je izvršeno korišćenjem više metoda. Mikrodilucionom metodom u bujonu određena je vrednost MIC i MBC, a međusobni odnos ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja na antimikrobnu aktivnost ispitan je metodom šahovske table u bujonu. Dužina antimikrobnog delovanja određena je time-kill metodom u mleku. Delovanje aktivnih komponenti na biofilm proučavano je ispitivanjem koncentracija koje smanjuju masu biofilma i ispitivanjem minimalne baktericidne koncentracije aktivnih komponenti koja dovodi do smanjenja živih bakterijskih ćelija biofilma (MIC netretiranog biofilma i MBC netretiranog biofilma).

5.4.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Dobijeni rezultati ispitivanja antimikrobnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema svim sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava prikazani su u tabeli 20.

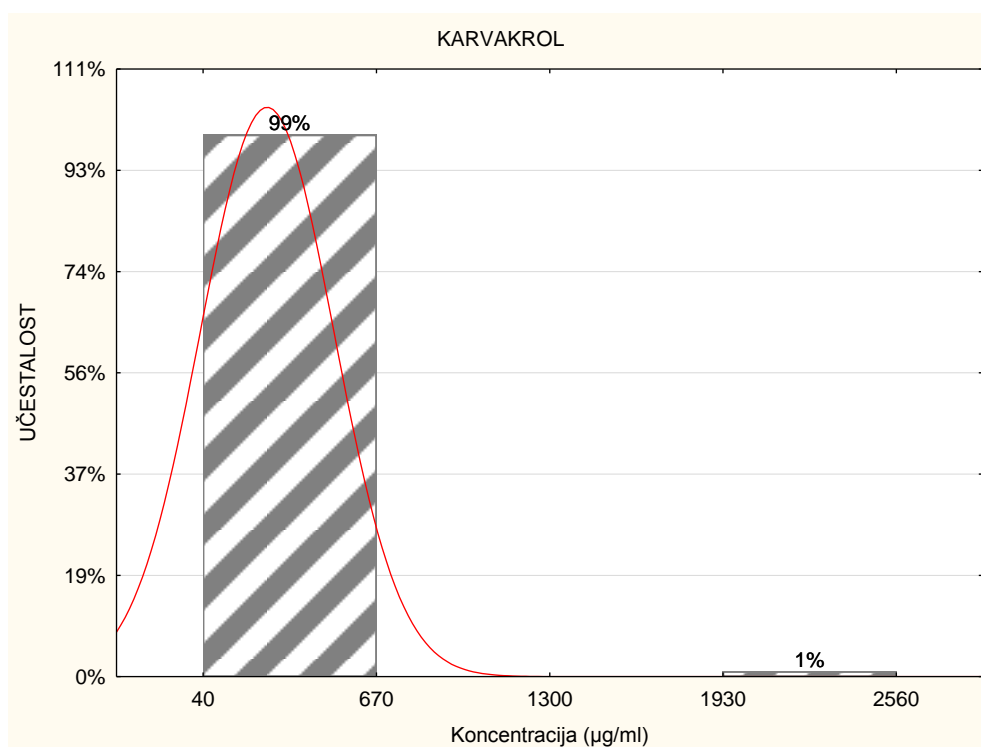
Tabela 20. Prikaz vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ispitivanih aktivnih supstanci

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
Srednja vrednost	237,7	271,6	161,5	306,5
Geometrijska sredina	206,7	234,6	134,8	269,5
Minimum	40	40	40	20
Maksimum	640	2560	2560	2560
MIC50	320	320	160	320
MIC90	320	320	160	320
Modus	320	320	160	320
Standardna devijacija	110,4	244,3	239,9	240,4
Standardna greška	10,77	23,84	23,41	23,46

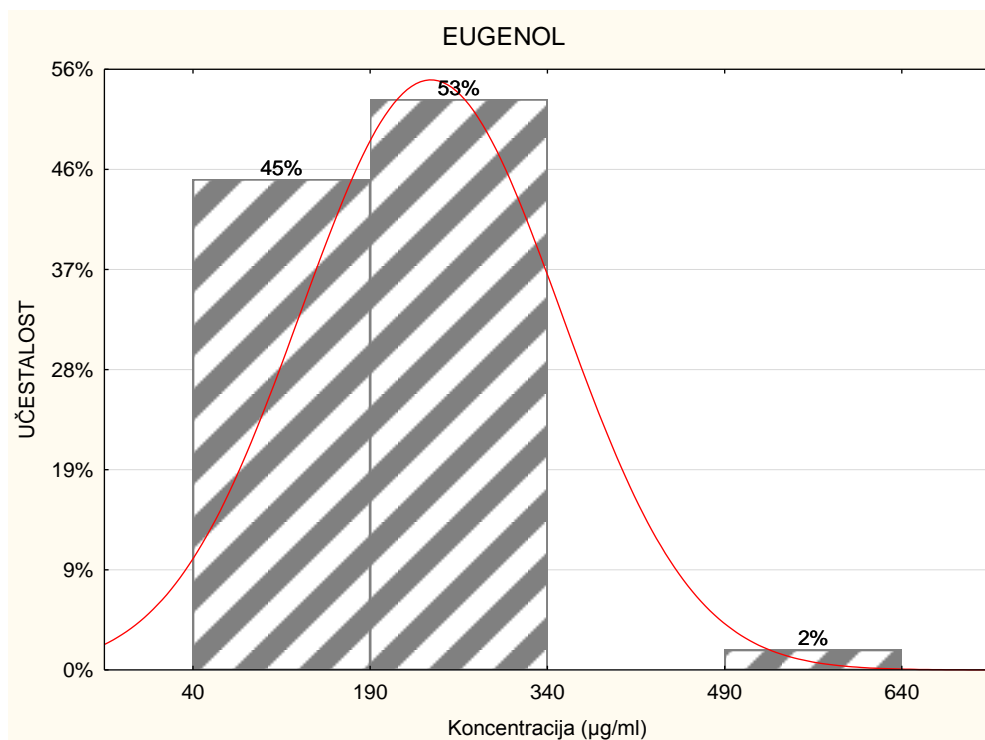
Ispitivanjem antimikrobnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja najpotentnije dejstvo je ustanovljeno kod cinamaldehida sa srednjom vrednošću od $161,5 \pm 23,41 \mu\text{g/ml}$, zatim kod karvakrola sa $237,7 \pm 10,77 \mu\text{g/ml}$ i eugenola sa srednjom vrednošću od $271,6 \pm 23,84 \mu\text{g/ml}$ (tabela 20). Najveću srednju vrednost minimalne inhibitorne koncentracije, odnosno najslabije antimikrobno dejstvo, pokazao je timol sa $306,5 \pm 23,46 \mu\text{g/ml}$. Minimalna inhibitorna koncentracija koja deluje na 50% izolata (MIC50) je najmanja kod cinamaldehida $160 \mu\text{g/ml}$, dok su ostale tri komponente etarskih ulja prilično ujednačene sa $320 \mu\text{g/ml}$. Vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije koje deluju na 90% izolata (MIC90) su jednake vrednostima MIC50.

Homogenost dobijenih vrednosti se ogleda u udelu izolata čija se vrednost MIC poklapa sa najučestalijom vrednošću (modusom), što je u slučaju karvakrola 56,19% izolata, eugenola 52,38% izolata, cinamaldehida 70,48% izolata, dok se MIC timola poklapa sa modusom kod 74,29% izolata.

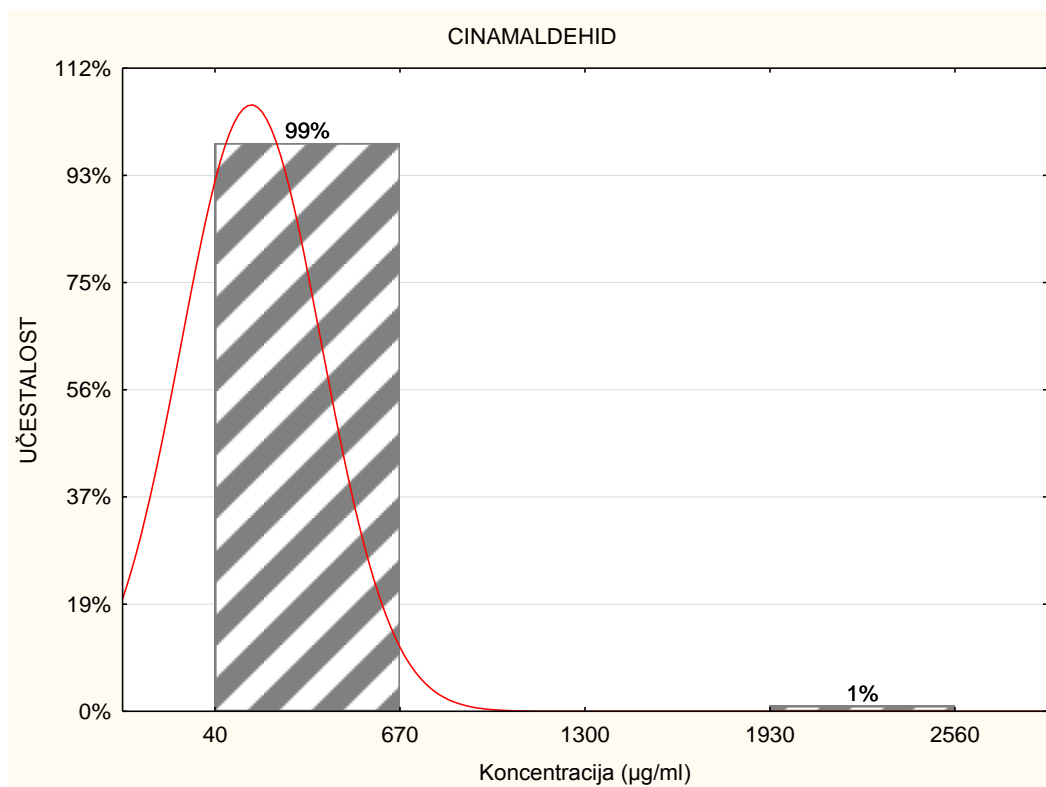
Distribucija minimalne inhibitorne koncentracije je prikazana normalnim krivama na grafikonima 7, 8, 9 i 10. Većina izolata su grupisani oko MIC50 vrednosti.



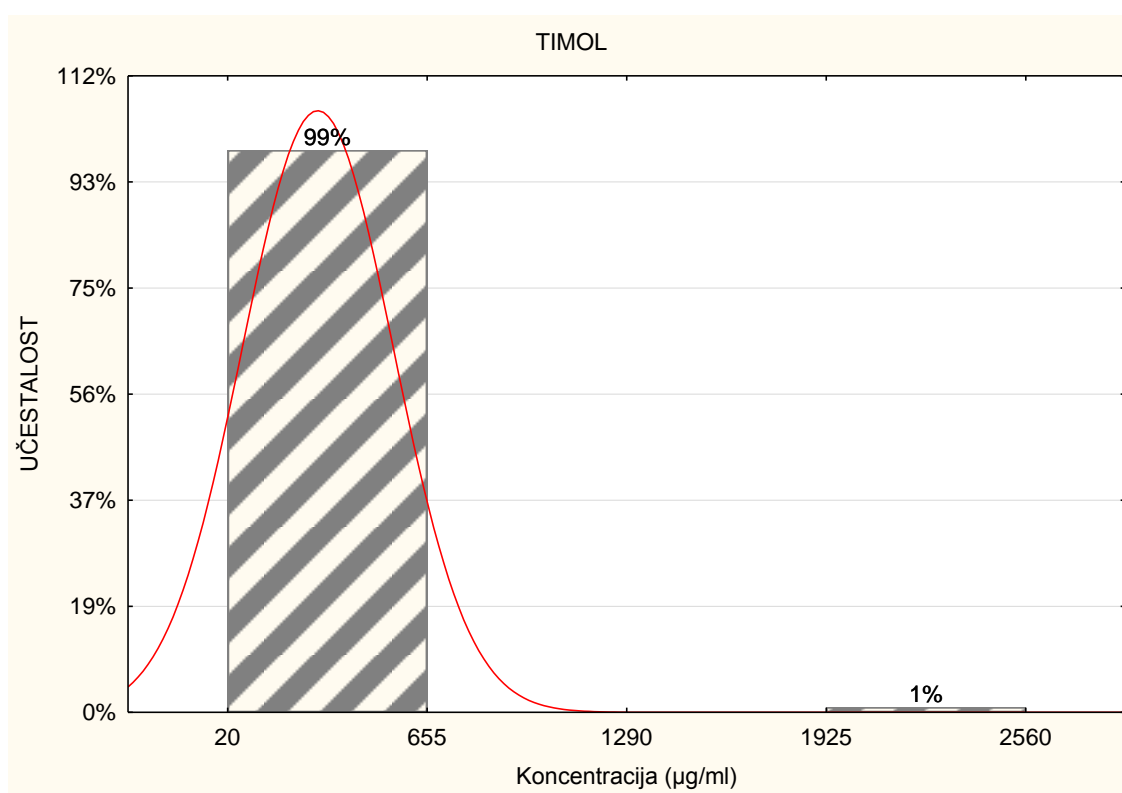
Grafikon 7. Distribucija minimalne inhibitorne koncentracije karvakrola



Grafikon 8. Distribucija minimalne inhibitorne koncentracije eugenola



Grafikon 9. Distribucija minimalne inhibitorne koncentracije cinamaldehida



Grafikon 10. Distribucija minimalne inhibitorne koncentracije timola

Fridmanovim statističkim testom ustanovljeno je postojanje statističke značajnosti između dejstva ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja na nivou $p < 0,01$. Statističkim Danovim testom je ustanovljena statistički značajna razlika na nivou od $p < 0,01$ između: eugenola i cinamaldehyda, karvakrola i cinamaldehyda i timola i cinamaldehyda, dok je statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$ ustanovljena u dejstvu eugenola i timola. Statistička razlika nije ustanovljena između dobijenih rezultata MIC eugenola i karvakrola, kao ni između timola i karvakrola što je prikazano u tabeli 21.

Tabela 21. Prikaz statističke značajnosti u međusobnom poređenju aktivnosti aktivnih supstanci u ispitivanju minimalne baktericidne koncentracije (MIC)

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
Karvakrol		NS	**	NS
Eugenol	NS		**	*
Cinamaldehyd	**	**		**
Timol	NS	*	**	

NS – bez statistički značajne razlike * * - statistička značajna razlika ($p < 0,05$)

** - statistički vrlo značajna razlika ($p < 0,01$)

5.4.2. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Ispitivanje minimalne baktericidne koncentracije je vršeno na studijskoj kolekciji koja se koristila za ispitivanje dejstva biofilmova. Izgled Petrijeve ploče u ispitivanju MBC prikazan je na slici 9. Među ispitivanim aktivnim komponentama etarskih ulja najpotentije baktericidno dejstvo pokazao je cinamaldehyd sa srednjom vrednošću od $680 \mu\text{g/ml}$, zatim slede karvakrol sa $857,4 \mu\text{g/ml}$ i eugenol $1086,2 \mu\text{g/ml}$. Najveću srednju vrednost za minimalnu baktericidnu koncentraciju pokazao je timol sa $1106,5 \mu\text{g/ml}$, što je prikazano u tabeli 22.



Slika 9. Brojanje kolonija pri izračunavanju minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Tabela 22. Prikaz uporednih vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ispitivanih aktivnih supstanci

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
MIC	237,7	271,6	161,5	306,5
MBC	857,4	1086,2	680,0	1106,5
Odnos MBC / MIC	3,607	3,999	4,211	3,610

5.4.3. Ispitivanje antibakterijskog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja u različitim kombinacijama

Za ispitivanje međusobnog uticaja aktivnih komponenti etarskih ulja korišćena je metoda šahovske table. Ispitano je ukupno 4 aktivne komponente etarskih ulja, svih 6 kombinacija aktivnih supstanci tako da je svaka od supstanci ispitana u kombinaciji sa ostalim supstancama. Prilikom ispitivanja svakog para supstanci korišćeno je po 77 različitih kombinacija koncentracija, što ukupno daje 462 ispitane kombinacije različitih aktivnih komponenti i različitih koncentracija. Koncentracije pojedinačnih ispitanih

supstanci su se kretale od 20 µg/ml do 1280µg/ml, odnosno od 1,25 µg/ml do 1280µg/ml.

Ispitivanjem antibakterijskog dejstva kombinacija etarskih ulja u različitim koncentracijama dobijeno je 50 vrednosti individualnih frakcionih inhibitornih koncentracija (FIC). Ukupno je otkriveno 7 sinergističkih kombinacija, od čega su 6 imale granični aditivni sinergizam sa vrednošću FIC od 0,5, dok je jedino kombinacija karvakrola i eugenola u koncentracijama od po 20µg/ml sa vrednošću FIC 0,312 ukazala na postojanje jakog supraaditivnog sinergizma.

Karvakrol i eugenol su ispoljili srednju vrednost FIC 0,739. Najniži FIC, odnosno najbolje sinergističko slaganje koje je bilo na graničnoj vrednosti, iznosio je 0,312 pri 20µg/ml karvakrola i 80µg/ml eugenola. Vrednost FIC od 0,5 je postignuta pri kombinaciji 20µg/ml karvakrola i 40µg/ml eugenola. Ove dve aktivne komponente dale su FIC od 1,06 pri kombinaciji od 5µg/ml karvakrola i 320µg/ml eugenola, što je prikazano u šemi 6.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
A.													Karvakrol
B.													
C.									1,06	1,03	1,02		
D.								0,62				320	
E.							0,5						
F.						0,62							
G.							0,31						
H.						80							
Eugenol													

Šema 6. Šematski prikaz dobijenih rezultata u ispitivanju antibakterijskog dejstva karvakrola i eugenola

U kombinaciji karvakrola i cinamaldehida nije zabeležen sinergizam, a vrednost FIC je iznosila 0,58. Za pojedinačne kombinacije vrednost FIC je imala vrednost od 0,5 u kombinacijama od 1,25µg/ml i 2,5µg/ml cinamaldehida sa 40µg/ml karvakrola a najlošije slaganje je dobijeno pri kombinaciji 160µg/ml cinamaldehida i 20µg/ml karvakrola sa FIC 0,75, što je prikazano na šemi 7.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
A.													Cinamaldehid
B.													
C.													
D.													
E.													
F.				0,75	0,63	0,56	0,53	0,52	0,51	0,50	0,50	80	
G.			0,75										
H.			640										
Karvakrol													

Šema 7. Šematski prikaz dobijenih rezultata u ispitivanju antibakterijskog dejstva karvakrola i cinamaldehida.

Kombinacija karvakrola i timola je imala srednju vrednost FIC od 0,54. Najbolje slaganje je ispoljila kombinacija 20 μ g/ml karvakrola i 40 μ g/ml timola uz vrednost FIC 0,5, a najlošiji rezultat bio je 0,625 u kombinaciji 20 μ g/ml timola i 40 μ g/ml karvakrola. Ova kombinacija je ispoljila približno uniforman rezultat u svim ispitivanim kombinacijama, što se može videti u šemi 8.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
A.													Timol
B.													
C.													
D.													
E.													
F.							0,63	0,56	0,53	0,52	0,51	80	
G.						0,5							
H.					160								
Karvakrol													

Šema 8. Šematski prikaz dobijenih rezultata u ispitivanju antibakterijskog dejstva karvakrola i timola

U kombinaciji eugenola i cinamaldehida dobijene su vrednosti koje ukazuju na blaže sinergističko dejstvo, vrednosti FIC su bile blizu granice sinergizma 0,556 pri kombinaciji od 160 μ g/ml cinamaldehida i 20 μ g/ml eugenola, ali je vrednost FIC išla i do 2,03 pri 10 μ g/ml cinamaldehida i 640 μ g/ml eugenola, što je prikazano šemom 9.

Ukupna srednja vrednost kombinacija u svim ispitanim koncentracijama je iznosila 1,19.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
A.													Cinamaldehyd
B.								2,03	2,02	2,02	2,01		
C.							1,13						
D.					0,75	0,63	0,63					320	
E.				0,75									
F.				0,63									
G.				0,56									
H.				320									
Eugenol													

Šema 9. Šematski prikaz dobijenih rezultata u ispitivanju antibakterijskog dejstva eugenola i cinamaldehyda

U kombinaciji eugenola i timola srednja vrednost FIC je iznosila 1,252. Pojedinačno se kretala u rasponu od 0,63 u kombinaciji od 80µg/ml timola i 40 µg/ml eugenola do 4,25 pri 20µg/ml timola i 1280µg/ml eugenola, što je prikazano šemom 10.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
A.						4,25							Timol
B.						2,25		2,06	2,03				
C.						1,03				1,02	1,01		
D.					1,00							320	
E.					0,75								
F.					0,63								
G.					0,75								
H.					160								
Eugenol													

Šema 10. Šematski prikaz dobijenih rezultata u ispitivanju antibakterijskog dejstva eugenola i timola

U kombinaciji cinamaldehyda i timola vrednost FIC je iznosila 0,535µg/ml a pojedinačne vrednosti su se kretale u rasponu od 0,5 u kombinacijama od 1,25µg/ml cinamaldehyda i 40µg/ml timola, kao i kombinaciji od 80 cinamaldehyda i 20µg/ml

timola. Najveću vrednost FIC 0,63 je imala kombinacija od 40 µg/ml cinamaldehyda i 40µg/ml timola što je prikazano na šemi 11.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
A.													Cinamaldehyd
B.													
C.													
D.													
E.									0,52				
F.						0,63	0,56	0,53		0,51	0,50	80	
G.					0,50								
H.				320									
Timol													

Šema 11. Šematski prikaz dobijenih rezultata u ispitivanju antibakterijskog dejstva cinamaldehyda i timola

Pregled vrednosti dobijenih frakcionih inhibitornih koncentracija (FIC) značajnijih kombinacija ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja prikazan je u tabeli 23.

Tabela 23. Vrednosti dobijenih frakcionih inhibitornih koncentracija (FIC) u značajnijim kombinacijama aktivnih komponenti etarskih ulja.

Vrednost FIC	Broj kombinacija	Aktivna supstance (µg/ml)	
< 0,5	1	Karvakrol (20)	Eugenol (80)
= 0,5	6	Karvakrol (20)	Eugenol (40)
		Karvakrol (40)	Cinamaldehyd (1,25)
		Karvakrol (40)	Cinamaldehyd (2,5)
		Karvakrol (40)	Timol (20)
		Cinamaldehyd (1,25)	Timol (40)
		Cinamaldehyda (80)	Timol (20)
0,51 - 1	27		
1,01 - 4	15		
>4	1	Eugenol (1280)	Timol (20)

5.5. Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja na *S. aureus*

Ispitivanje dužine dejstva aktivnih supstanci pokazuje u kom vremenskom periodu se očekuje dejstvo, odnosno kada se očekuje slabljenje dejstva aktivne materije. Aktivnost komponenti etarskih ulja u funkciji vremena ispitivana je dilucionom metodom u mleku kao ciljnom medijumu za delovanje protiv infekcije. Koncentracije ispitanih aktivnih komponenti su odabrane tako da ne dovode do baktericidnog efekta, a reinokulacijom uzročnika 2., 4., i 6. dana simuliran je priliv bakterija iz inficiranog vimena u mleko.

Rezultati ispitivanja dužine dejstva aktivnih supstanci prikazani su slikom 9, tabelom 24, i grafikonom 11.

Broj bakterija u kontroli bez aktivnih materija je porastao u toku 48h na preko $8 \log_{10}$ bakterija/ml. Antibiotik linkomicin je nakon 24h delovao u zadatoj koncentraciji kada je smanjio broj bakterija ispod nivoa detekcije. Narednog dana, odnosno 48h nakon početka ispitivanja, broj bakterija je dostigao nivo početnog inokuluma, a u narednih 24h prešao je $8 \log_{10}$ cfu/ml.

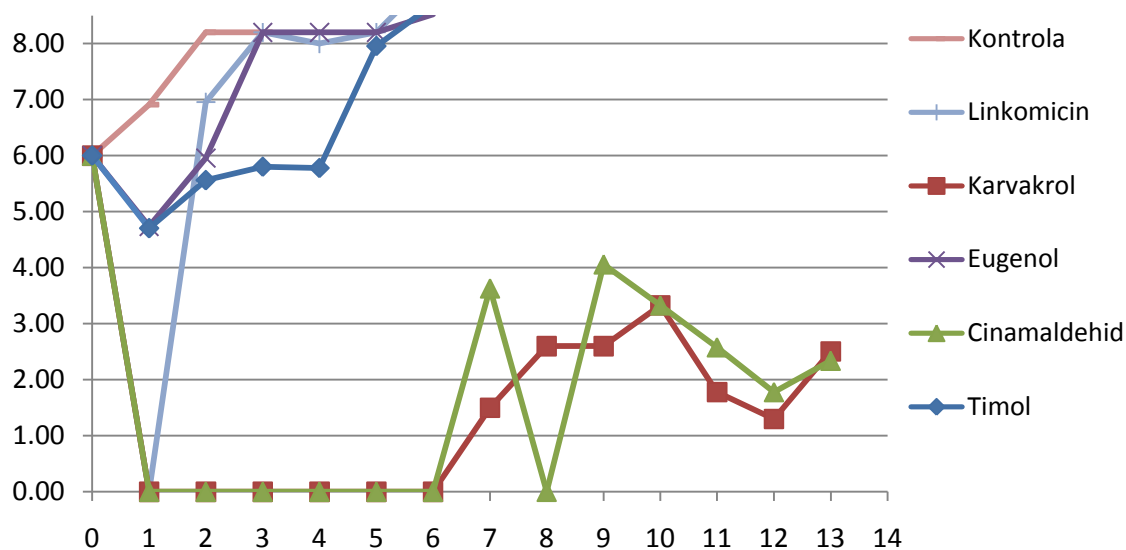


Slika 9. Ispitivanje dužine dejstva antimikrobnih supstanci

Tabela 24. Broj bakterija (cfu log10) u zavisnosti od dužine inkubacije i aktivne materije

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol	Llinkomicin	Kontrola
0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
1	0,00	4,74	0,00	4,70	0,00	6,91
2*	0,00	5,96	0,00	5,56	6,96	8,20
3	0,00	8,20	0,00	5,80	8,20	8,20
4*	0,00	8,20	0,00	5,78	8,00	
5	0,00	8,20	0,00	7,96	8,20	
6*	0,00	8,52	0,00	8,70	9,21	
7	1,50		3,63			
8	2,60		0,00			
9	2,60		4,06			
10	3,33		3,33			
11	1,78		2,58			
12	1,30		1,78			
13	2,51		2,34			

* - reinokulacija $6 \cdot 10^6$ cfu/ml



Grafikon 11. Dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja na *S. aureus*

Karvakrol je u prvih 24h inkubacije sveo broj bakterija ispod nivoa detekcije i taj nivo je održavan do treće reinokulacije, odnosno šestog dana ispitivanja. Tokom sedmog dana ogleda, broj bakterija se popeo na 2,6 \log_{10} , što su vrednosti očitane 8. i 9. dana, a desetog dana broj bakterija dostiže maksimum od 3,3 \log_{10} cfu/ml, nakon čega se smanjuje na 1,3 \log_{10} cfu/ml. Poslednjeg dana broj bakterija je iznosio 2,51 \log_{10} cfu/ml. Eugenol je smanjio početni inokulum sa 6 \log_{10} cfu/ml na 4,74 \log_{10} cfu/ml nakon 24h, ali nakon prve reinokulacije nije pokazao antimikrobno dejstvo i tokom narednog brojanja, odnosno nakon 72h od početka ispitivanja, broj bakterija je dostigao 8 \log_{10} cfu/ml.

Cinamaldehyd je oborio broj bakterija ispod nivoa detekcije u prvih 24h i taj nivo je ostao sve do 7. dana, kada je nakon reinokulacije zapažen porast broja bakterija na 3,63 \log_{10} cfu/ml. Nakon 24h inkubacije od treće reinokulacije, odnosno 8. dana ispitivanja broj bakterija se ponovo sveo ispod nivoa detekcije. Tokom devetog dana ispitivanja broj bakterija je dostigao maksimalnu vrednost od 4,06 \log_{10} cfu/ml. Do završetka ispitivanja broj bakterija je lagano opadao do 1,78 \log_{10} cfu/ml ali nije spao ispod nivoa detekcije. Jedino je tokom 13. dana ogleda došlo je do spontanog porasta broja bakterija na 2,34 \log_{10} cfu/ml.

Timol je smanjio broj bakterija nakon 24h inkubacije na $4,70 \log_{10}$ cfu/ml, a onda je vrednost broja bakterija lagano rasla da bi pri brojanju 5. dana ogleada dosegnut nivo početnog inokuluma od $6 \log_{10}$ cfu/ml. Tokom 6. dana ogleada broj bakterija je prešao $8 \log_{10}$ cfu/ml. Tokom trajanja ogleada timol nije uspeo da spusti koncentraciju bakterija ispod nivoa detekcije

Tokom ispitivanja dužine dejstva antimikrobnih supstanci primećena je pojava grušanja mleka usled enzimske aktivnosti bakterija.



Slika 10: Formiranje gruša usled enzimske aktivnosti bakterija tokom ispitivanja dužine dejstva antimikrobnih supstanci.

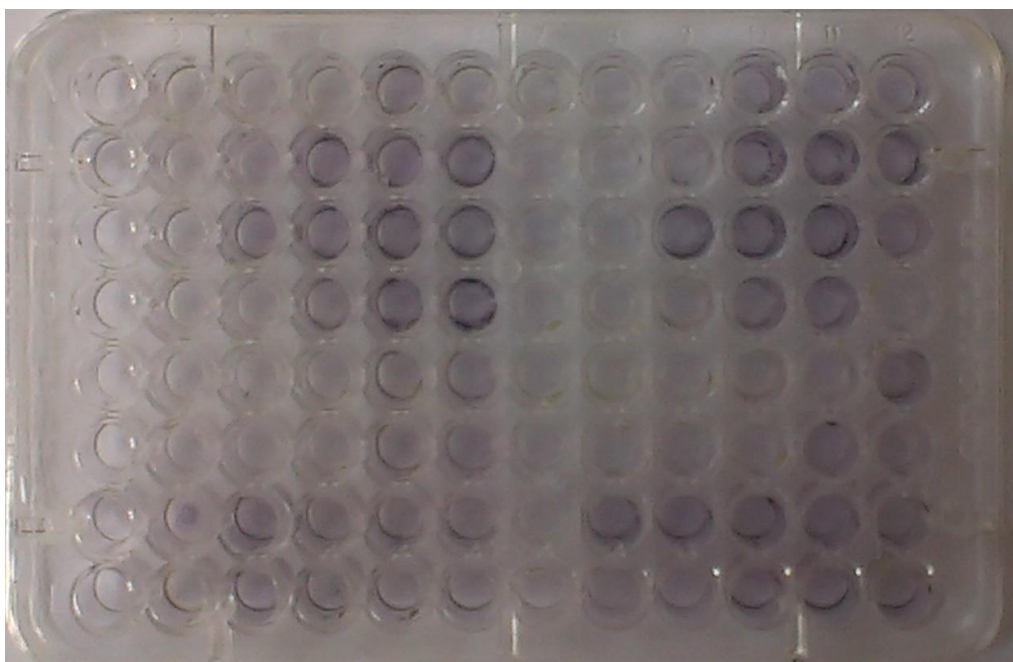
5.6. Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na *S. aureus* u biofilmu

Ispitivanje dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na biofilm *S. aureus* izvršeno je utvrđivanjem inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma *S. aureus* kao i utvrđivanjem njihovog baktericidnog dejstva na ćelije biofilma *S. aureus*.

Uticao aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola na masu i ćelije biofilma ispitan je na studijskoj kolekciji od 20 sojeva *S. aureus* izolovanih od supkliničkog mastitisa krava (sojevi označeni brojevima 30, 60, 83, 84, 98, 99, 100, 105, 111, 112, 116, 118, 119, 120, 122, 127, 129) kao i kontrolnih sojeva ATCC 25923, ATCC 43300 i kontrolnog soja sa intenzivnom produkcijom biofilma (BF).

5.6.1. Utvrđivanje dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma

Dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma ispitivano je na formiranom biofilmu starom 24h. Nakon inkubacije biofilma sa dodatom aktivnom komponentom etarskih ulja u trajanju od 24h, vršeno je merenje vrednosti ekstinkcije biofilma koja je zatim upoređivana sa vrednošću ekstinkcije netretiranog biofilma istog izolata. Rezultati ispitivanja inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma *S. aureus* prikazani su na slikama 11, 12 i tabelama 25 i 26.



Slika 11. Fotografija ispitivanja MIC biofilma – inhibicija formiranja biomase biofilma pod dejstvom ispitivanih aktivnih supstanci



Slika 12. Fotografije ispitivanja MIC biofilma tokom bojenja i nakon ispiranja

Tabela 25. Rezultati ispitivanja delovanja aktivnih komponenti na masu biofilma - MIC biofilma ($\mu\text{g/ml}$)

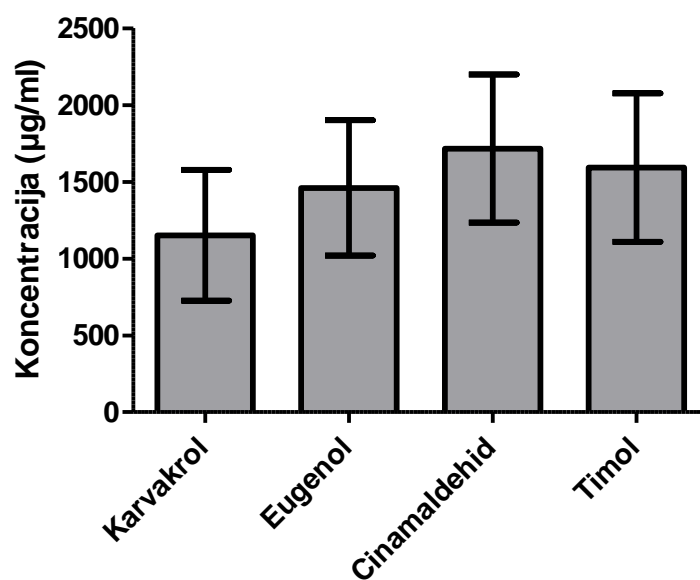
Redni broj	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol	Linkomicin	Neomicin	Kloksacin
1	640	1280	80	640	≥ 8	≥ 8	0,25
2	640	1280	1280	1280	4	≥ 8	≥ 2
3	1280	1280	≥ 2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	≥ 2
4	160	80	80	80	0,5	0,5	0,0125
5	1280	2560	2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	≥ 2
6	160	80	80	80	0,5	0,5	0,5
7	1280	2560	2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	≥ 2
8	640	1280	2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	≥ 2
9	1280	1280	1280	640	≥ 8	≥ 8	≥ 2
10	≥ 2560	≥ 2560	2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	2
11	2560	≥ 2560	≥ 2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	≥ 2
12	640	1280	2560	640	8	8	≥ 2
13	640	1280	1280	2560	≥ 8	≥ 8	2
14	160	640	≥ 2560	≥ 2560	≥ 8	4	0,25
15	640	2560	≥ 2560	1280	≥ 8	≥ 8	≥ 2
16	≥ 2560	≥ 2560	2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	≥ 2
17	640	1280	1280	640	2	≥ 8	≥ 2
18	160	80	160	640	≥ 8	≥ 8	1
19	2560	160	640	320	4	2	≥ 2
20	≥ 2560	≥ 2560	≥ 2560	≥ 2560	≥ 8	≥ 8	≥ 2

Minimalna koncentracija aktivne supstance pri kojoj vrednost ekstinkcije pada na polovinu vrednosti ekstinkcije netretiranog biofilma uzeta je kao kritična koncentracija aktivne supstance koja deluje na masu biofilma – MIC biofilma.

Posmatrano kroz MIC vrednosti biofilma ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja, najpotentnije delovanje na masu biofilma imali su karvakrol sa srednjom vrednošću od $1152\mu\text{g/ml}$, eugenol sa $1460\mu\text{g/ml}$ a zatim slede timol sa $1592\mu\text{g/ml}$ i cinamaldehyd sa $1716\mu\text{g/ml}$, što je prikazano u tabeli 26 i grafikonu 12.

Tabela 26. Pregled koncentracija aktivnih komponenti etarskih ulja u ispitivanju delovanja na masu biofilma - MIC biofilma ($\mu\text{g/ml}$)

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
Srednja vrednost	1152	1460	1716	1592
Geometrijska sredina	787.9	937	1076	1076
Minimum	160	80	80	80
Maksimum	≥ 2560	≥ 2560	≥ 2560	≥ 2560
MIC50	640	1280	2560	1280
MIC90	2560	2560	≥ 2560	≥ 2560
Standardna devijacija	910.4	940.5	1031	1033
Standardna greška	203.6	210.3	230.6	231.1
Koeficijent varijacije (%)	79,03%	64,41%	60,09%	64,91%



Grafikon 12. Dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja na masu biofilma - MIC biofilma ($\mu\text{g/ml}$)

Statističkim upoređivanjem dobijenih rezultata između aktivnih komponenti Kruskal – Wallis testom nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0,47$). Usled varijacija u koncentracijama koje deluju na biofilm kod različitih izolata, nije pronađena statistički značajna razlika između dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja što je prikazano u tabeli 27.

Tabela 27. Prikaz statističke značajnosti u međusobnom poređenju aktivnosti aktivnih supstanci u testu smanjenja biofilma - MIC biofilma

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
Karvakrol		NS	NS	NS
Eugenol	NS		NS	NS
Cinamaldehyd	NS	NS		NS
Timol	NS	NS	NS	

NS – bez statistički značajne razlike

Odnos srednjih vrednosti MIC i MIC biofilma prikazani su u tabeli 28.

Tabela 28. Odnos srednjih vrednosti MIC biofilma i MIC ($\mu\text{g/ml}$)

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
MIC biofilma	1152	1460	1716	1592
MIC	237,7	271,6	161,5	306,5
MIC biofilma/MIC	4,85	5,38	10,63	5,19

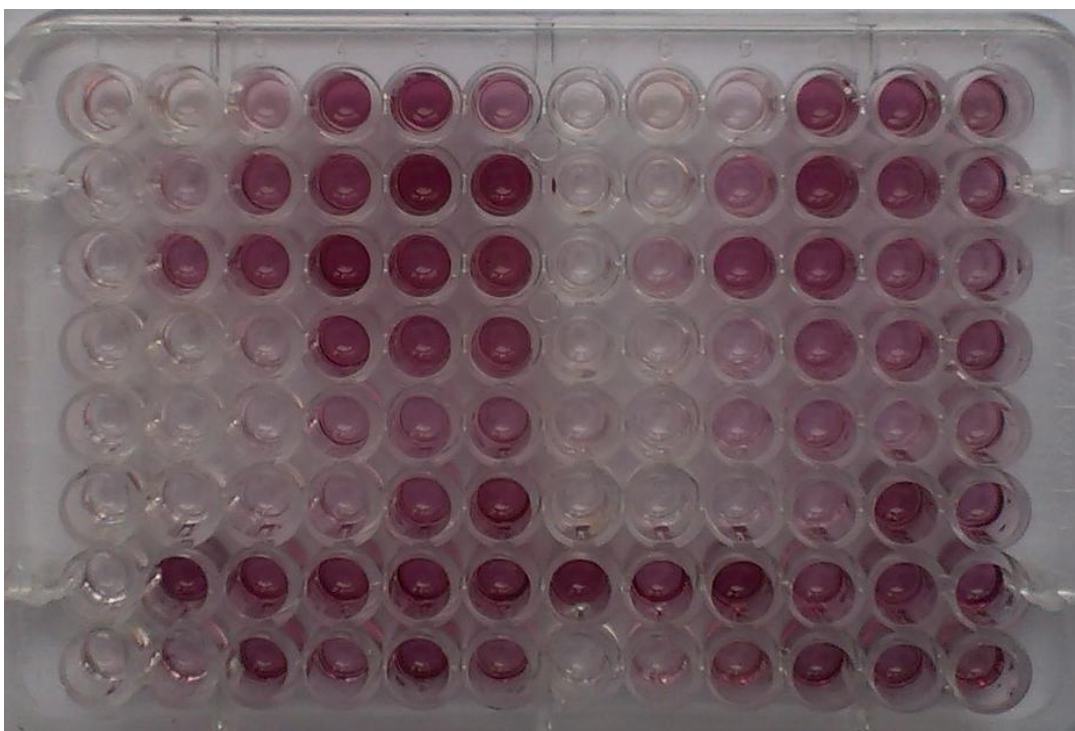
Razlika u odnosu srednjih vrednosti MIC i MIC biofilma je najmanje kod karvakrola zatim timola i eugenola, dok je najveća razlika zabeležena pri dejstvu cinamaldehyda.

5.6.2. Utvrđivanje baktericidnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na ćelije biofilma

Baktericidno dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja ispitano je merenjem ekstinkcije formazana koji nastaje prilikom redukcije metiltetrazolijuma (MTT) u živoj bakterijskoj ćeliji. Minimalna koncentracija aktivne supstance koja je dovela do

smanjenja broja ekstinkcije živih bakterijskih ćelija za 50% uzeta je kao koncentracija koja pokazuje baktericidno dejstvo na ćelije biofilma – MBC biofilma.

Rezultati ispitivanja dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja utvrđivanjem inhibitorynog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na žive bakterije biofilma *S. aureus* prikazani su u na slici 13 i tabelama 29 i 30.



Slika 13. Fotografija ispitivanja MBC biofilma pred očitavanje ekstinkcije

Tabela 29. Baktericidne koncentracije aktivnih komponenti etarskih ulja u ispitivanju delovanja na ćelije biofilma - MBC biofilma

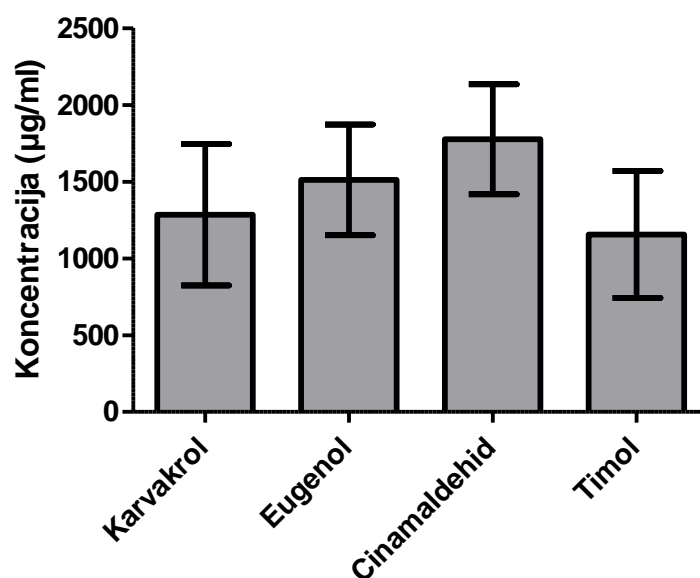
Redni broj	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol	Linkomicin	Neomicin	Kloksacin
1	≥2560	1280	≥2560	1280	≥8	≥8	≥2
2	640	1280	1280	640	≥8	8	≥2
3	2560	2560	1280	1280	8	8	≥2
4	640	1280	1280	640	≥8	≥8	≥2
5	≥2560	≥2560	≥2560	≥2560	≥8	≥8	≥2
6	640	1280	1280	640	≥8	≥8	≥2
7	640	640	1280	640	2	4	≥2
8	640	1280	2560	640	≥8	8	≥2
9	640	1280	1280	640	2	≥8	≥2
10	640	1280	1280	640	2	1	0,06
11	≥2560	≥2560	≥2560	≥2560	≥8	2	≥2
12	640	1280	2560	640	0,5	1	≥2
13	320	640	640	320	1	0,25	≥2
14	1280	1280	2560	1280	8	4	≥2
15	≥2560	≥2560	≥2560	≥2560	≥8	0,25	≥2
16	640	1280	1280	640	2	0,25	2
17	≥2560	≥2560	≥2560	≥2560	≥8	≥8	≥2
18	≥2560	≥2560	≥2560	≥2560	≥8	≥8	≥2
19	320	160	320	320	≥8	≥8	≥2
20	80	640	1280	80	2	≥8	1

Tabela 30. Zbirni prikaz vrednosti baktericidne koncentracije ispitanih aktivnih komponenti etarskih ulja na ćelije biofilma - MBC biofilma

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
Srednja vrednost	1284	1512	1776	1156
Geometrijska sredina	905.1	1280	1576	844.5
Minimum	80,00	160,0	320,0	80,00
Maksimum	≥2560	≥2560	≥2560	≥2560
MBC50	640	1280	1280	640
MBC90	≥2560	≥2560	≥2560	≥2560
Standardna devijacija	985.1	769	766.3	884.2
Standardna greška	220.3	172	171.3	197.7
Koeficijent varijacije (%)	76,72%	50,86%	43,15%	76,49%

U testu ispitivanja baktericidne koncentracije ispitivanih supstanci na ćelije biofilma dobijene su vrednosti minimalne koncentracije aktivne supstance MBC biofilma pri kojoj vrednost ekstinkcije iznosi polovinu vrednosti ekstinkcije netretiranog biofilma (kontrolne).

Posmatrano kroz MBC vrednosti biofilma ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja, najpotentnije baktericidno delovanje na ćelije biofilma imali su timol sa srednjom vrednošću od 1156µg/ml, karvakrol od 1284µg/ml, eugenol sa 1512µg/ml i na kraju cinamaldehyd sa 1776µg/ml. Vrednosti koncentracije aktivnih supstanci koje su delovale na viabilne ćelije biofilma prikazane su na grafikonu 13. Srednje vrednosti koncentracije kontrolnih antibiotika za MBC biofilma isnosile su za linkomicin 10,18µg/ml, za neomicin 9,04µg/ml i za kloksacilin 6,95µg/ml.



Grafikon 13. Vrednosti baktericidne koncentracije ispitanih aktivnih komponenti etarskih ulja na ćelije biofilma - MBC biofilma.

Statističkim poređenjem dobijenih podataka Fridmanovim testom u ispitivanju baktericidnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na ćelije biofilma, MBC biofilma, nije dobijena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između ispitanih komponenti, što je prikazano u tabeli 31.

Tabela 31. Prikaz statističke značajnosti u međusobnom poređenju aktivnosti aktivnih supstanci na viabilne ćelije biofilma - MBC biofilma

	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehid	Timol
Karvakrol		NS	NS	NS
Eugenol	NS		NS	NS
Cinamaldehid	NS	NS		NS
Timol	NS	NS	NS	

NS – bez statistički značajne razlike

Odnos vrednosti MBC i MBC biofilma prikazani su u tabeli 32, dok je odnos MIC biofilma i MBC biofilma prikazan u tabeli 33.

Tabela 32. Odnos srednjih vrednosti MBC i MBC biofilma ($\mu\text{g/ml}$)				
	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
MBC biofilma	1284	1512	1776	1156
MBC	857,4	1086,2	680,0	1106,5
MBC biofilma / MBC	1,50	1,39	2,61	1,04

Razlika u odnosu MBC i MBC biofilma je najmanje izražena pri delovanju timola, zatim slede karvakrol i eugenol, dok je najveća razlika nastala pri dejstvu cinamaldehyda.

Tabela 33. Odnos srednjih vrednosti MBC i MBC biofilma ($\mu\text{g/ml}$)				
	Karvakrol	Eugenol	Cinamaldehyd	Timol
MBC biofilma	1284	1512	1776	1156
MIC biofilma	1152	1460	1716	1592
MBC/MIC	1,11	1,04	1,03	0,73

6. DISKUSIJA

6.1. Izolacija i identifikacija *S. aureus*

Pre više od 40 godina *S. aureus* je opisan kao vrlo značajan uzročnik mastitisa goveda koji dovodi do značajnih problema u proizvodnji mleka. Na žalost, taj trend je aktuelan i u savremenim proizvodnim uslovima jer je *S. aureus* i dalje u svetu najčešći izolovani patogen kod supkliničkih i hroničnih mastitisa krava (Philpot, 1979; Nielsen, 2009; Tiezzi i sar., 2015)

Broj izolovanih koagulaza pozitivnih stafilokoka, pre svega *S. aureus*, u ovom istraživanju prikupljenih sa 7 farmi iz okoline Beograda sa ukupno 8500 mlečnih krava, potvrđuje ranije naveden stav da je i danas najznačajniji uzročnik mastitisa u Srbiji upravo *S. aureus* (Vakanjac i sar., 2010; Zutic., 2012; Magaš i sar., 2013; Rajic Savic i sar., 2014).

Tokom prve faze ispitivanja, fenotipskom identifikacijom kratkim biohemijskim nizom ustanovljen je veliki broj izolata *S. intermedius*. Iznenađujući broj izolata *S. intermedius* se pojavio u prvoj polovini prikupljenih izolata, tako da je u početku bilo više izolata identifikovanih kao *S. intermedius* nego kao *S. aureus*. U stručnoj literaturi je sporadično opisivani problem identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokoka iz mleka krava (Pottumarthy i sar., 2004; Smeltzer i Beenken, 2013).

Vrlo značajna razlika u fenotipskom i molekularnom pristupu identifikaciji potiče od ONPG testa. Problem je uočen prilikom molekularne identifikacije izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka, kada se pojavilo značajno odstupanje dobijenih rezultata od prethodne fenotipske odnosno biohemijske identifikacije vrsta. Iako su prilikom izvođenja ONPG testa redovno vršene interne kontrole kvaliteta rezultata primenom pozitivne i negativne kontrole, referentnih sojeva *E. coli* ATCC 25922 odnosno *S. aureus* ATCC 25923, očitani rezultati ove biohemijske reakcije doveli su do pogrešne identifikacije i proglašenja većeg broja izolata kao *S. intermedius* a ne kao *S. aureus*. Analizom većeg broja radova može se zaključiti da kratak biohemijski niz ne predstavlja uvek preciznu osnovu za identifikaciju *S. aureus*, što nameće potrebu izvođenja proširenog niza reakcija ili primene i drugih metoda identifikacije, kao što su serološke i tehnika molekularne biologije. U danas često primenjivanoj identifikacije *S. aureus* po Šljajferu iz 1986. godine izostavljen je ONPG test, a sama šema se zasniva na

bojenju po Gramu, ispitivanju reakcija katalaze, oksidaze, koagulaze plazme kunića, hijaluronidaze, fermentacije saharoze, maltoze, manitola, manoze i trehaloze, ispitivanja osetljivost na furazolidon, novobiocin kao i rezistencije na bacitracin (Aarestrup i sar. 1995). Uočeni problem sa ONPG testom je doveo do izmene protokola identifikacije koagulaza pozitivnih *Staphylococcus* spp. u laboratoriji za bakteriologiju i mikologiju katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

Danas se sve češće u identifikaciji mikroorganizama primenjuje PCR metoda, koja se zasniva na umnožavanju specifičnog dela genoma u velikom broju kopija i čija veličina fragmenata na elektroforezi se nedvosmisleno povezuje sa odgovarajućom vrstom. Kod *Staphylococcus* vrsta osim *nuc* gena za otkrivanje termostabilne nukleaze, može se identifikacija zasnivati i na drugim genima, *fem* gen ili geni 16 ili 23s subjedinice ribozoma (Rajic Savic i sar., 2014). Pored PCR metode, može se koristiti i MALDI-ToF metoda, koja se zasniva na specifičnoj laserskoj jonizaciji uzorka uz spektrofotometrijsko ispitivanje nastalih produkata. Zbog svoje vrlo visoke specifičnosti i sve niže cene, PCR metoda uz sekvencioniranje dobijenih produkata će verovatno ostati metoda izbora duže vremena.

Ostaje mogućnost da su dobijeni rezultati pozitivne ONPG reakcije posledica karakteristike određenih izolata *S. aureus* iz mleka odnosno mastitisa krava koji poseduju enzim β galaktozidazu i vrše razgradnju O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozida kao analoga laktoze. Opisivanje ONPG pozitivnih izolata *S. aureus* kod životinja nije u domenu ovog ispitivanja, ali je interesantna tema za buduća istraživanja. Nalaz ONPG pozitivnih *S. aureus* predstavlja problem i za automatske identifikacione sisteme koji se oslanjaju na ovaj test, i prema podacima iz literature Vitek 2 GP system (bioMérieux, France) je pogrešno identifikovao *Staphylococcus* vrstu poreklom od životinja kod 13,7% ispitanih izolata (Tse i sar., 2012).

Polimorfizam *coa* gena

Gen *coa* koji kodira slobodnu koagulazu, važan faktor virulencije u patogenezi oboljenja uzrokovanih stafilokokama, odlikuje se polimorfizmom. Ova karakteristika se može iskoristiti za razvrstavanje kliničkih izolata *S. aureus* u više tipova što pruža uvid u njihovu međusobnu povezanost i olakšava epizootiološku odnosno epidemiološku analizu sojeva (Kalorey i sar., 2007). Tipiziranje *coa* gena urađeno je prajmerima koji

omogućavaju da se otkriju 3 izoalelne forme i to I (627bp), II (710bp) i III (910bp). Kao najučestaliji nalaz kod ispitivanih izolata *S. aureus* utvrđena je III izoalelna forma kod 76 (73,77%) izolata, zatim II kod 6 (5,83%) izolata i I 3 (2,91%) izolata. Ostali izolati - njih 16 (15,53%) pripadali su izoalelnim formama koje su van opsega korišćenih prajmera i koji se ne mogu utvrditi bez opsežnijeg ispitivanja, dok su 2 (1,94%) izolata davala dvostruki rezultat.

Izradom dendrograma međusobne povezanosti izolata *S. aureus*, dobijen je veliki klaster koji obuhvata većinu izolata što je uslovljeno tipom koagulaze, fermentacijom ispitivanih šećera i prisustva enzima β galaktozidaze. Na marginama dendrograma se nalaze kontrolni sojevi ATCC 25923 i ATCC 43300 koji inače vode poreklo od ljudi. Izolati distribuirani u grupi oko kontrolnih sojeva su izolati kojima se nije mogao utvrditi tip koagulaze primenjenim metodama.

Nalazi drugih autora opisuju drugačiju distribuciju izoalelnih formi *coa* gena. U Indiji je kod izolata *S. aureus* poreklom od mastita krava najzastupljeniji I tip koagulaze, što su objavili Kalorey i saradnici 2007. godine. U radu koji potiče iz Turske, Aslantas i saradnici (2007) su imali najveći broj izolata sa PCR produktima u rasponu od 890bp do 970bp, što odgovara III izoalelnoj formi i dobijenim rezultatima u ovom ispitivanju u Srbiji. U radu istog navedenog autora navodi se manji broj izolata sa dvostrukim elektroforetskim trakama, što je u skladu i sa našim nalazom. U radu Gharib i saradnika iz 2013. godine utvrđena je različita zastupljenost izoalelnih formi poreklom od ljudi i životinja, među četiri izoalelna tipa koagulaze kod životinja je najčešće opisana izoalelna forma od 648bp, dok je 20% izolata pokazivalo dvostruku ili trostruku liniju na elektroforezi.

6.2. Ispitivanje osetljivosti izolata *S. aureus* prema antimikrobnim sredstvima

Ispitivanje osetljivosti izolata izvršeno je prema paleti antimikrobnih lekova koji se koriste u Srbiji. Osetljivosti izolata *S. aureus* prema svih 8 antimikrobnih sredstava koja se najčešće koriste kod mastitisa krava utvrđena je kod 6 odnosno 5,31% izolata. Rezistencija prema jednom, odnosno osetljivost prema 7 hemoterapeutika ispoljilo je 72 odnosno 63,72% izolata i to uglavnom prema penicilinu G. Na dva ispitana antimikrobna sredstva rezistenciju je ispoljilo 22 (19,47%) izolata. Rezistenciju na 3

antibiotika pokazala su 6 izolata što čini 5,31%. Na više od 3 ispitana antibiotika, rezistenciju je pokazao 1 izolat (0,88%), koji je osim rezistencije na β laktamske antibiotike ispoljio rezistenciju na tetraciklin. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je utvrđena multipla rezistencija *S. aureus* prema 3 i više antimikrobnih sredstva samo kod 7, odnosno kod 6,19 % izolata. Na osnovu ovih rezultata može se izvesti zaključak da multipla rezistencija, kod izolata *S. aureus* poreklom od krava obolelih od mastitisa, ne predstavlja problem u Srbiji, a što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Krnjaić, 2000; Ašanin i sar., 2012; Rajic Savic i sar., 2014). Iako u svetu postoje izveštaji o multirezistentnim izolatima, smatra se da multipna rezistencija izolata *S. aureus* nije pandemijski problem u medicini i da se javlja sporadično u epidemijским talasima (Chamers i DeLeo, 2009).

U ovom istraživanju u Srbiji je u visokom procentu (96,19%) ustanovljena rezistencija samo prema jednom antibiotiku penicilinu G, što je u saglasnosti sa ranijim nalazima autora iz Srbije (Krnjaić, 2000; Ašanin i sar., 2012; Rajic Savic i sar., 2014). U savremenim standardima (CLSI, 2014; EUCAST, 2016) penicilin G se pored cefoksitina koristi kao antibiotik na osnovu koga se tumači osetljivost izolata roda *Staphylococcus* na najveći broj β laktamskih antibiotika. Imajući u vidu veliki broj nalaza rezistencije stafilokoka na penicilin G kako u Srbiji, tako i u svetu, njegova terapijska primena u lečenju mastitisa je vrlo ograničena jer nije terapijski efikasan (Krnjaić, 2000; Rajic Savic i sar., 2014; Arslan i sar., 2009; Moon i sar., 2007).

Na farmama krava u okolini Beograda koje su bile obuhvaćene ovim ispitivanjem izolovano je 6 sojeva MRSA, što predstavlja 5,71% svih izolata *S. aureus*. Prisustvo MRSA u mleku usled njegovog zoonotskog potencijala predstavlja rizik po zdravlje ljudi i to ne samo od infekcija i intoksikacija nego i od prenošenja gena rezistencije drugim patogenim bakterijama ljudi. I do sada se smatralo da je prevalencija MRSA iz mleka u Srbiji niska i da varira od 0% (Krnjaić, 2000; Ašanin i sar., 2012; Rajic Savic i sar., 2014) do 5,9% (Zutic, 2012). Kao epidemiološki i epizootiološki veoma interesantna tema prisustvo i raširenost MRSA u mleku je ispitivana širom sveta, i nalazi variraju u zavistnosti od podneblja, perioda ispitivanja i broja prikupljenih uzoraka. Prevalencija MRSA kod mlečnih grla, mleka, supklinički i kliničkih manifestnih mastitisa krava iznosi od 0% do 17,53% ispitanih izolata *S. aureus* (Petrovski i sar., 2015; Gentilini i sar., 2000; Asfour i Darwish, 2011).

Veća prevalencija MRSA iz mleka krava obolelih od mastitisa nego što je dobijena u ovom radu u Srbiji, zabeležena je u Italiji kod 9,2% sojeva *S. aureus*, 9,32% u Belgiji, 14,4% u Slovačkoj i 17,47% u Turskoj (Luini i sar., 2015; Vanderhaeghen i sar., 2010; 2014; EFSA i ECDC, 2015; Turutoglu i sar., 2006).

Niža prevalencija MRSA od ustanovljene u ovom radu utvrđena je u Turskoj od 1,30% i u Kini 2,73% (Arslan i sar., 2009; Moon i sar., 2007). U Holandiji na farmama, je prisustvo MRSA u mleku utvrđeno kod 0% - 7,4% ispitivanih farmi, odnosno 0%-1,98% četvrti vimena (Vanderhaeghen i sar., 2010). Juhász-Kaszanyitzky (2007) je na osnovu detaljne analize zaključio se da u Mađarskoj MRSA izoluje veoma retko u uzorcima mleka krava obolelih od subkliničkih mastitisa. Interesanto je da MRSA nije uočen među izolatima *S. aureus* od krava obolelih od mastitisa sa Novog Zelanda, SAD i Argentine (Petrovski i sar., 2015; Gentilini i sar., 2000).

Zemlje zapadne Evrope i industrijski razvijene zemlje su ranije beležile veću stopu pojave MRSA od zemalja gde je prisutnija ekstenzivna poljoprivreda. Prvi opisani slučaj MRSA iz mleka potiče iz Belgije (Devriese i sar., 1972). Danas, međutim, dolazi do značajnih promena u ovoj distribuciji prevalencije. Razvijene zemlje su uvele programe sistemske prevencije i kontrole MRSA kod životinja i ljudi, dok je dostupnost i potrošnja antibiotika u nerazvijenim zemljama mnogostruko povećana (EFSA i ECDC, 2015). U Srbiji se od 2011.godine prema godišnjem Pravilniku o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja vrši nadzor MRSA kod svinja (Sl. Glasnik RS 24/11). Prilikom ispitivanja mleka krava iz Srbije u ovom ispitivanju, pronađeno je 14 sojeva, odnosno 13,33% svih izolata *S. aureus*, koji su ispoljili rezistenciju na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom. U prethodnom istraživanju sojeva *S. aureus* izolovanih iz mleka nije utvđena rezistencija prema amoksicilinu sa klavulanskom kiselinom (Krnjaić, 2000).

Svakako treba istaći veoma širok opseg vrednosti prevalencije rezistencije na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, što odražava različitu zastupljenost ove kombinacije u terapiji goveda. Slično kao i u slučaju MRSA, rezistencija na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom nije zabeležena na Novom Zelandu, SAD i Argentini (Petrovski i sar., 2015; Gentilini i sar., 2000). U Egiptu je rezistencija nešto viša nego u Srbiji i iznosi 15,15%. Drugačiji rezultati rezistencije *S. aureus* poreklom od krava

obolelih od mastitisa na ovu antimikrobnu kombinaciju opisani su u Turskoj i kreću se od 6,8%, (Turutoglu i sar., 2006) do čak 85,7% (Arslan i sar., 2009).

Kloksacilin je penicilinski antibiotik koji je stabilan na beta laktamaze i koristi se u terapiji pri zasušenju. U ovom ispitivanju svi izolati *S. aureus* su *in vitro* osetljivi na kloksacilin, čak i ukoliko su MRSA, dok je u Turskoj 2,5% izolata *S. aureus* bilo rezistentno na kloksacilin pri 1,2% rezistencije na meticilin (Arslan i sar., 2009). Iako spada u posebnu grupu penicilina stabilnih na β laktamaze, retko se pojedinačno testira osetljivost *S. aureus* na kloksacilin već se tumači prema osetljivosti izolata na cefoksitin (CLSI, 2014; EUCAST 2016) i zato nema mnogo podataka u literaturi o rezistenciji na kloksacilin.

Prilikom ispitivanja osetljivosti izolata *S. aureus* na neomicin kao aminoglikozidni antibiotik utvrđen je nizak nivo rezistencije i to kod 6 (5,71%) izolata. Imajući u vidu da se vrlo često kombinuju aminoglikozidni i β laktamski antibiotici ohrabruje nizak nivo rezistencije, pri čemu je samo jedan od rezistentnih izolata i MRSA. Ranije ustanovljene učestalosti rezistencije na gentamicin i neomicin u Srbiji variraju od 0% preko 10,5% do 22,2% (Krnjaić, 2012; Ašanin i sar., 2012; Rajić Savić, 2014). Literaturni podaci često opisuju značajno viši nivo rezistencije na aminoglikozide nego što pokazuju rezultati u Srbiji.

Povezanost rezistencije na meticilin i aminoglikozidne antibiotike kod *S. aureus* je čest problem u svetu. Tako je na primer, polovina MRSA izolovanih u slučajevima mastitisa goveda rezistentno je i na gentamicin u Brazilu (Silva i sar., 2014), isto je i u Turskoj (Turutoglu i sar., 2009), dok je preko jedne četvrtine (27,27%) izolata *S. aureus* rezistentnih na β laktamate bilo rezistentno i na neomicin u Egiptu (Asfour i Darwish, 2011), dok je u Kini 28,01% MRSA uzročnika mastitisa krava rezistentno na gentamicin, a 16,95% na neomicin (Moon i sar., 2007).

Ispitivanjem osetljivosti izolata *S. aureus* na tetraciklin utvrđeno je da je rezistentno 4, odnosno 3,81% izolata. Ovim ispitivanjem je potvrđeno da kod *S. aureus* iz mleka u Srbiji rezistencija na tetraciklin nije značajna, što je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja (Krnjaić, 2012; Ašanin i sar., 2012; Rajić Savić, 2014). Na Novom Zelandu rezistencija na tetraciklin kod izolata *S. aureus* iz mleka nije pronađena, a u SAD ona iznosi $6,7\% \pm 2,91\%$ (Petrovski i sar., 2015). Širom sveta sprovedenim ispitivanjima utvrđen je i viši nivo rezistencije izolata *S. aureus* kod mastitisa krava na tetraciklin koji

se kretao od 22,41% u Kini (Moon i sar., 2007), 57,58% u Egiptu (Asfour i Darwish, 2011), 61,2% u Turskoj (Turutoglu i sar., 2006) pa čak i do 100% u Brazilu (Silva i sar., 2014).

Rezultati dobijeni ispitivanjem osetljivosti na linkomicin su pokazali da su svi izolati bili osetljivi. Verovatni razlog tome leži da je u pitanju antibiotik koji nije u široj primeni u Srbiji. U drugim zemljama masovnije je primena ovog antibiotika u terapiji mastitisa krava i prevalencija izolata *S. aureus* rezistentnih na linkomicin se kreće od 22,3% u Turskoj (Turutoglu i sar., 2006) do 94,7% ± 2.61% u SAD i 99,1% ± 0.92% u Novom Zelandu (Petrovski i sar., 2015).

U našem ispitivanju, na uzorku od preko sto izolata *S. aureus*, prema broju rezistentnih i interemedijarno osetljivih izolata redosled preporučenih antimikrobnih sredstava za terapiju mastitisa krava je: sulfametoksazol sa trimetoprimom > linkomicin > tetraciklin > cefaleksin > neomicin > amoksicilin sa klavulanskom kiselinom > penicilin.

Sama prevalencija izolata rezistentnih prema određenim antimikrobnim sredstvima je posledica dostupnosti i primene lekova kod muznih krava, a time i selektivnog pritiska na populaciju bakterija na farmama. Prema dobijenim rezultatima ovog ispitivanja osetljivosti izolata *S. aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava prema antimikrobnim sredstvima može se zaključiti da se, izuzev penicilina G se svi drugi antibiotici i hemoterapeutici odlikuju visokom terapijskom efikasnošću.

6.3. Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma

Sposobnost određenog klona *S. aureus* da izazove mastitis krava značajno zavisi od sposobnosti da formira biofilm (Melchior i sar., 2006). Produkcija biofilma obezbeđuje preživljavanje bakterijama, izbegavanje imunskog odgovora organizma i/ili antimikrobne terapije i doprinosi uspostavljanju hroničnog toka mastitisa. Osetljivost bakterijske ćelije u biofilmu na antibiotike je smanjena usled nemogućnosti ulaska lekova u jonizovanoj formi, prisustva enzima koji ih razgrađuju i ređe deobe bakterija (O'Toole i sar., 2000; Raza i sar., 2013).

Analiza dobijenih rezultata fenotipskih ispitivanja biofilmova je veoma komplikovana usled različitog pristupa odnosno dizajna istraživanja kao i primenjene metode praćenja biomase i viabilnosti ćelija. Pored toga treba istaći da i iste bakterije čak u istim uslovima ne formiraju uvek podjednako biofilm. Na ovaj problem ukazuju i Szweđa sa

saradnicima (2012) koji su kod 132 izolata *S. aureus* od mastitisa krava utvrdili prisustvo *ica* gena odgovornog za stvaranje biofilma, a fenotipski manifestnu produkciju biofilma su ustanovili samo kod 76 izolata, odnosno 57,6% ispitivanih sojeva.

Fenotipskim ispitivanjem produkcije biofilma utvrđeno je da srednja vrednost ekstinkcije mase biofilma iznosila 0,084 u opsegu minimalne do maksimalne vrednosti od 0,056 do 0,144. Najveći broj izolata, njih 60%, formiralo je biofilm ekstinkcije mase biofilma od 0,07 do 0,09. Iznad ove grupe srednje vrednosti ekstinkcije, produkcijom veće mase biofilma odlikovalo se 26% ispitanih izolata na kojima je u kasnijem radu i ispitivano dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja. U Srbiji je do sada sposobnost formiranja biofilma kod izolata *S. aureus* iz mleka opisana jedino u radu Milanove i saradnika (2015) koji su ovu njihovu karakteristiku ustanovili kod svih 70 ispitanih izolata.

Od ukupno 113 izolata, ispitanih u ovom radu 89 je posedovalo *ica* gen. Imajući u vidu fenotipsku potvrdu produkcije biofilma kod svih izolata kao i detekciju *ica* gena kod 88,76% izolata može se zaključiti da je sposobnost stvaranja biofilma ključna za infekciju i dugotrajniju kolonizaciju epitela vimena. Radovi drugih autora takođe opisuju vrlo visoku prevalenciju biofilm produkujućih *S. aureus* kod mastitisa krava i u drugim državama. Tako je u Brazilu utvrđena sposobnost stvaranja biofilma kod 98,9% izolata *S. aureus* od supkliničkih mastitisa krava (da Castro Melo, 2013). U drugom ispitivanju u Brazilu od 110 izolata *S. aureus* iz mleka *ica* gene posedovalo je 96,3% izolata poreklom od junica i 98,8% od starijih krava (Castelani i sar., 2015).

Nešto niža prevalencija biofilm produkujućih izolata *S. aureus* u odnosu na ovo istraživanje u Srbiji je opisana u Turskoj gde je *ica* gen utvrđen kod 66% izolata (Ciftci i sar., 2009), odnosno u Kini gde je od 137 izolata *ica* gen u A, B, C ili D alelnoj formi posedovalo 70,8% izolata (Li, 2012).

6.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema kliničkim izolatima *S. aureus*

Kao što je i ranije opisano, u cilju sveobuhvatnog sagledavanja potencijala antimikrobne aktivnosti aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema *S. aureus* njihovo delovanje je ispitivano primenom više metoda.

Mikrodilucionom metodom u bujonu određena je vrednost MIC, a zatim i presejavanjem i MBC, kod je međusobni odnos ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja na antimikrobnu aktivnost ispitan metodom šahovke table u bujonu. Dužina antimikrobnog delovanja određena je time-kill metodom u mleku pri koncentracijama koje su niže od baktericidnih, a delovanje aktivnih komponenti na biofilm ispitan je delovanjem na masu i viabilne bakterijske ćelije biofilмова starih 24h – MIC biofilma i MBC biofilma.

6.4.1. Određivanje minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Postoji značajna razlika u pojavi i intenzitetu antimikrobnih svojstva kompletnih etarskih ulja i njihovih aktivnih komponenti u korist čistih aktivnih komponenti etarskih ulja, koja se odlikuju nižim vrednostima minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracijama MIC i MBC (Choi i sar. 2012; Dal Pozzo i sar., 2012; Soković i sar., 2010). Tako, na primer, aktivne komponente timol i karvakrol pokazuju jaču bakteriostatsku i baktericidnu aktivnost u odnosu na sama etarska ulja origana, majčine dušice i meksičkog origana u kojima se nalaze (Dal Pozzo i sar., 2011).

U okviru ispitivanja ustanovljeno je da su sve ispitane komponente etarskih ulja pokazale određen stepen antimikrobne aktivnosti. Karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol su na sojeve *S. aureus* u slučajevima mastitisa krava delovali u višim koncentracijama u odnosu na kontrolne antibiotike, što potvrđuje njihovu značajno nižu efikasnost u odnosu na linkomicin, neomicin i kloksacilin. Tako su se srednje vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija - MIC za ispitane aktivne komponente etarskih ulja kretale okvirno od 160 μ g/ml do 300 μ g/ml, a srednje vrednosti MIC za kontrolne antibiotike su bile okvirno od 0,3 μ g/ml do 1,8 μ g/ml što čini razliku od 100 do 1000 puta.

U literaturnim podacima u kojima se poredi antibakterijsko delovanje etarskih ulja ili aktivnih komponenti etarskih ulja sa antibioticima, na primer rad Choi i saradnika (2012), vrednosti MIC aktivnih komponenti etarskih ulja višestruko prevazilaze MIC antibiotika, odnosno aktivne komponente slabije deluju od antibiotika i do 1000 puta. To je u potpunosti u skladu sa rezultatima našeg rada. Rezultati MIC etarskih ulja ili njihovih aktivnih komponenti se često objavljuju bez upoređivanja sa kontrolnim

antibiotikom (Ananda Baskaran, i sar. 2009; Burt i sar., 2005; Jia i sar., 2011), ali i te vrednosti višestruko prelaze granične vrednosti rezistencije na antibiotike prema standardima (CLSI, 2014; EUCAST, 2016) i po više stotina ili hiljada puta.

Na osnovu analize dobijenih MIC vrednosti aktivnih komponenti etarskih ulja u ovom radu u Srbiji, uočeno je da se ,vrednosti ne razlikuju kod osetljivih i rezistentnih izolata *S. aureus* prema određenom antibiotiku, na primer kod osetljivih i rezistentnih sojeva prema amoksicilinu sa klavulanskom kiselinom. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima većeg broja drugih autora (Dal Pozzo i sar., 2011; Dal Pozzo i sar., 2012; Choi i sar., 2012; Yap i sar., 2014). Imajući u vidu ovu karakteristiku, Das i saradnici su 2016. godine preporučili upotrebu eugenola kao rezervne antimikrobne supstance kod terapije infekcija uzrokovanih vankomicin rezistentnim sojevima *S. aureus*. Osetljivost bakterija na etarska ulja i njihove aktivne komponente se verovatno zasniva na specifičnom i potpuno drugačijem mehanizmu dejstva od mehanizma dejstva antibiotika. Antimikrobno delovanje ovih prirodnih supstanci nije u potpunosti proučeno, ali usled dokazane sposobnost nekih etarskih ulja da dovedu do inhibicije sinteze ćelijskog zida bakterija, blokiranja transkripcije, produkcije β laktamaza, formiranja biofilma ili rada efluks pumpe postoji mišljenje da se ona mogu primeniti u terapiji infekcija izazvanih rezistentnim mikroorganizmima (Yap i sar., 2014; Cuaron i sar., 2013; Hammer i Carson, 2011).

Srednja vrednost MIC cinamaldehida iznosila je $161,5 \pm 23,41 \mu\text{g/ml}$ a MIC₅₀, vrednost minimalne inhibitorne koncentracije koja je dovela do inhibicije rasta 50% ispitivanih sojeva izolata *S. aureus* supkliničkog mastitisa, je bila $160 \mu\text{g/ml}$. Srednja vrednost MIC karvakrola je bila $237,7 \pm 10,77 \mu\text{g/ml}$, eugenola $271,6 \pm 23,84 \mu\text{g/ml}$ a timola $306,5 \pm 23,46 \mu\text{g/ml}$. MIC₅₀ je bila jednaka za karvakrol, eugenol i timol, i iznosila je $320 \mu\text{g/ml}$.

Potentnost aktivnih komponenti etarskih ulja, odnosno ispoljena antimikrobna aktivnost u zavisnosti od srednje vrednosti MIC, ustanovljena u ovom ispitivanju od najefikasnijeg do najmanje efikasnog bila je u sledećem redosledu: cinamaldehyd > karvakrol > eugenol > timol.

Utvrđene srednje vrednosti MIC karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola u našem ispitivanju su u najvećem broju slučajeva niže nego što su MIC vrednosti dobijene u istraživanjima drugih autora, odnosno aktivne komponente etarskih ulja izolovane iz

lokalnih biljaka ispoljile su jače antibakterijsko dejstvo nego što je opisano u većini dostupne literature.

Dok je u ovom ispitivanju srednja MIC vrednost karvakrola iznosila 237,7 μ g/ml, Gallucci i saradnici (2010) su utvrdili više od 1,5 puta višu MIC vrednost od 400 μ g/ml do 1600 μ g/ml. Prema podacima Dal Pozzo i saradnika (2011) srednja MIC vrednost karvakrola iznosila je 800 μ g/ml, što je 3,5 puta viša vrednost od vrednosti utvrđene u ovom radu. Značajno bolji rezultati u ovom radu na sudijskoj populaciji su postignuti nego rezultati iz SAD, gde su Ananda Baskaran i saradnici (2009) dobili vrednosti MIC u rastvoru karvakrola od 0,5% što je približno oko 5000 μ g/ml.

Srednja MIC vrednost eugenola u ovom istraživanju je iznosila 271,6 μ g/ml. U odnosu na druge aktivne komponente etarskih ulja, eugenol je nešto potentniji od timola, ali slabiji od karvakrola i cinamaldehida. Rastvor eugenola od 0,6% (oko 6000 μ g/ml) prema istraživanju Ananda Baskaran i saradnika (2009) dovodio je do inhibicije rasta *S. aureus* poreklom iz mleka, što je vrednost koja je viša za oko 20 puta u odnosu na vrednost dobijenu u našem radu. U radu Gallucci i saradnika (2010) ispitani sojevi *S. aureus* su ispoljili osetljivost na eugenol u koncentracijama od 3500 μ g/ml do 14000 μ g/ml, što predstavlja najvišu vrednost MIC eugenola prema *S. aureus* u drugim radovima.

Najpotentnije antibakterijsko dejstvo je ispoljio cinamaldehyd sa srednjom vrednošću od 161,5 μ g/ml, odnosno da bi sprečio porast 50% ispitanih izolata, bila je dovoljna koncentracija od 160 μ g/ml. Nasuprot ovakvom našem nalazu, u istraživanju koje je izvedeno u Brazilu ustanovljeno je da je za sprečavanje porasta 50% izolata *S. aureus* poreklom iz mleka krava obolelih od mastitisa iz Brazila, potrebno čak 800 μ g/ml cinamaldehyda (Dal Pozzo i sar., 2012). U rezultatima koje je dobio Jia (2011) sa saradnicima, vrednost MIC za *S. aureus* poreklom od ljudi je od 625 μ g/ml do 1250 μ g/ml cinamaldehyda. Visoke vrednosti MIC dobijene su u SAD (Ananda Baskaran i sar., 2009) gde je ustanovljeno da MIC cinamaldehyda prema *S. aureus* iznosi 0,1%, što predstavljeno u jedinicama koje su korišćene u našem ispitivanju iznosi približno 1000 μ g/ml što je oko tri puta više od vrednosti koju smo mi ustanovili. Visoki MIC cinamaldehyda u ovom radu se može objasniti specifičnim izborom rastvarača i disperzije tj. emulzije aktivne komponente u mleku. U našem istraživanju za rastvaranje koncentrovanih aktivnih komponenti etarskih ulja je korišćen DMSO, dok je u ovom

istraživanju u SAD korišćen PBS. Takođe sama tehnologija dobijanja aktivnih komponenti etarskih ulja verovatno utiče na odstupanja u antimikrobnoj aktivnosti.

Niže koncentracije od naših MIC, odnosno od 0,25 do 0,5µg/ml za cinamaldehyd utvrdila je na referentnom soju *S. aureus* Soković sa saradnicima (2010). Od ispitanih aktivnih komponenti etarskih ulja u ovom radu, najmanje potentno dejstvo je ispoljio timol sa srednjom MIC vrednošću 306,5µg/ml. U radu Dal Pozzo i saradnika (2011) dejstvo timola je opisano u koncentraciji od 400µg/ml, dok je u radu Choi i saradnika (2012) timol delovao na izolate iz mleka u srednjoj MIC koncentraciji od 3000µg/ml. U radu Bakkali i saradnika (2008) se navodi vrednost MIC za karvakrol u rasponu od 700µg/ml do 1400µg/ml, dok Gallucci i saradnici (2010) navode da su izolati *S. aureus* ispoljili osetljivost na timol u koncentracijama od 800µg/ml do 3700µg/ml, što je 2,5 puta viša koncentracija od one utvrđene u našem radu. Visoke vrednosti MIC je dobio i Ananda Baskaran sa saradnicima (2009) u rastvoru od 0,6%, odnosno oko 6000µg/ml.

Među retkim radovima gde su opisane niže koncentracije od onih dobijenih u našem radu, su rezultati Soković i saradnika (2010) koji su utvrdili MIC za timol od 0,25 do 0,5µg/ml i Choi i saradnika (2012) sa koncentracijom MIC od 100µg/ml. Međutim obe vrednosti su postignute na referentnim sojevima *S. aureus*.

U okviru ovog rada u Srbiji, sprovedeno je i ispitivanje baktericidnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja i utvrđena srednja MBC je bila najniža za cinamaldehyd 680µg/ml, viša za karvakrol sa 857,4µg/ml i eugenol sa 1086,2µg/ml, i na kraju najviša za timol sa 1106,4µg/ml.

Pored toga što se odlikovao najpotentnijim baktericidnim dejstvom od svih komponenti etarskih ulja obuhvaćenim ovim istraživanjem, cinamaldehyd je delovao u nižim MBC od dobijenih vrednosti u radovima drugih autora. Prema dostupnim podacima iz literature, raspon utvrđenih MBC prema izolatima *S. aureus* iz uzoraka mleka krava obolelih od mastitisa kretao se od 2238µg/ml u istraživanju Dal Pozzo i saradnika (2011) do približno 4500µg/ml u radu Ananda Baskaran i saradnika (2009). U rezultatima koje su objavili drugi istraživači za *S. aureus* poreklom od ljudi, vrednosti MBC cinamaldehyda su se kretale u rasponu od 2500µg/ml do 5000µg/ml (Jia i sar., 2011).

U našem ispitivanju srednja MBC vrednost karvakrola iznosila je 857,4µg/ml, što je 14 puta potentnije dejstvo u odnosu na MBC vrednost od približno 12 000 µg/ml

ustanovljenu od strane Ananda Baskaran i saradnika (2009). U istoj studiji ustanovljeni su slični rezultati i za eugenol odnosno MBC od 14000 μ g/ml. To znači da smo mi u našem istraživanju sa dobijenim MBC eugenola od 1068,2 μ g/ml pokazali 13 puta potentnije dejstvo ove komponente.

Nakon analize u našem istraživanju dobijenih MBC i MIC vrednosti aktivnih komponenti etarskih ulja uočava se da je međusobni odnos njihovih vrednosti između 3,5 do 4 puta, odnosno da vrednosti MIC čine oko 22-30% vrednosti MBC, što odgovara razmaku od 2 bazenčića u mikrotitracionoj ploči.

U drugim radovima utvrđeni odnos MBC i MIC, kako kod aktivnih komponenti etarskih ulja tako i kod antibiotika, iznosio je između 2 do 4 puta (Dal Pozzo i sar., 2011; Dal Pozzo i sar., 2012; Ananda Baskaran i sar., 2009; Jia i sar., 2011).

Upoređujući vrednosti odnosa MBC i MIC od najveće ka najmanjoj razlici redosled je: cinamaldehyd < eugenol < timol < karvakrol. Srednja vrednost MBC je veća u odnosu na srednju vrednost MIC kod cinamaldehyda za 4,21 put, kod eugenola za 3,99 puta, dok su timol i eugenol imali najmanje razlike u koncentracijama koje postižu baktericidno u odnosu na inhibitorno dejstvo i to za 3,61 odnosno 3,60 puta. Dobijene vrednosti odnosa MBC i MIC se statistički ne razlikuju značajno, a i u skladu su sa rezultatima drugih autora.

6.4.2. Ispitivanje antibakterijskog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja u različitim kombinacijama

U ispitivanju međusobnog uticaja aktivnih komponenti etarskih ulja i njihove zajedničke antimikrobne aktivnost korišćena je metoda šahovske table. Da bi se ispitala svaka supstanca u kombinaciji sa ostalim supstancama korišćeno je ukupno 6 kombinacija aktivnih supstanci. Prilikom ispitivanja svakog para supstanci korišćeno je po 77 različitih kombinacija tako da su koncentracije pojedinačnih supstance bile u opsegu od 20 μ g/ml do 1280 μ g/ml, odnosno od 1,25 μ g/ml do 1280 μ g/ml. Od ukupno ispitanih 462 kombinacija različitih koncentracija dobijeno je 50 vrednosti individualnih frakcionih inhibitornih koncentracija (FIC). Ukupno je otkriveno 7 sinergističkih kombinacija.

Najniža vrednost FIC od 0,312 pri kombinaciji 20 μ g/ml karvakrola i 80 μ g/ml eugenola ukazuje na sinergističko dejstvo koje se nije ispoljilo u odnosu datih aktivnih materija u

drugim koncentracijama. U drugih šest kombinacija dobijene su pojedinačne vrednosti FIC na granici sinergizama (FIC=0,5). Kombinacije i koncentracije aktivnih komponenti etarskih ulja koje su postigle granični sinergistički efekat su: karvakrol 20µg/ml + eugenol 40µg/ml, karvakrol 40µg/ml + cinamaldehyd 1,25µg/ml, karvakrol 40µg/ml + cinamaldehyd 2,5µg/ml, karvakrol 40µg/ml + timol 20µg/ml, cinamaldehyd 1,25µg/ml + timol 40µg/ml i cinamaldehyd 80 µg/ml + timol 20µg/ml.

Uočava se da je od sedam kombinacija koje ispoljavaju sinergizam najzastupljeniji karvakrol u njih 5. Cinamaldehyd je zastupljen u četiri kombinacije, timol u tri, a eugenol u dve, uključujući navedenu kombinaciju koja ispoljava jak aditivni efekat. Jedina od kombinacija aktivnih komponenti kod koje je otkriven antagonistički FIC od 4,25 je bila kombinacija timola i eugenola u koncentracijama od 20µg/ml odnosno 1280µg/ml.

Iako se prema metodi Verma iz 2007. godine sinergizam potvrđuje FIC vrednostima manjim od 0,5, primećeno je da i u slučajevima FIC vrednosti između 0,5 i 1,0 postoji određeni stepen združenog dejstva aktivnih komponenti. Međutim, date kombinacije imaju slabije dejstvo u odnosu na aditivni ili supraaditivni sinergizam vrednosti od 0,5 ili manjim. Kombinacije koje daju vrednosti od 0,5 ukazuju na prost aditivni sinergizam i obe ispitivane aktivne supstance bi imale isti učinak da su primenjene same u duplo većoj koncentraciji. Vrednosti koje su niže od 0,5 ukazuju na međusobno visoko potencirano antimikrobno zajedničko dejstvo aktivnih komponenti, koje se naziva supraaditivni sinergizam, i koji je uočen u već prethodno pomenutoj kombinaciji karvakrola u koncentraciji od 20µg/ml i eugenola u koncentraciji od 80µg/ml.

Visoka vrednost FIC 4,25, kombinacije 20µg/ml timola i 1280µg/ml eugenola, ukazuje na njihov blagi antagonizam, dok je u svim ostalim ispitanim koncentracijama i kombinacijama aktivnih komponenti etarskih ulja dokazan je njihov sinergistički ili indiferentan odnos u antibakterijskom delovanju na *S. aureus*. Može se zaključiti da se karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol mogu u preparatima kombinovati bez negativnih posledica po antimikrobno dejstvo.

Veliki broj radova širom sveta se bavio izučavanjem antimikrobnih svojstava etarskih ulja, njihovog sastava i sinergističkog dejstva aktivnih komponenti. U nefrakcionisanim etarskim uljima ukupna aktivnost je rezultat kompleksnih interakcija između različitih klasa jedinjenja kao što su fenoli, aldehidi, ketoni, alkoholi, estri, etri, ugljovodonici itd.

Prema podacima iz literature fenolni monoterpeni i fenilpropanoidi kada se udružuju sa drugim komponentama značajno povećavaju njihovu antimikrobnu aktivnost (Bakkali i sar., 2008). Većina studija je bila usmerena na međusobnu interakciju fenola, uglavnom monoterpena (timol, karvakrol) i fenilpropanoida (eugenol), dok su ređe sprovedena ispitivanja interakcije fenola sa drugim komponentama etarskih ulja, seskviterpenima i ugljovodonicima (Thormar i sar., 2011). U nekim slučajevima, autori su upoređivali i upoređivanje antimikrobne aktivnosti kompletnog etarskog ulja sa aktivnošću određenih aktivnih komponenti. Ovakva istraživanja su pokazala da aktivne komponente imaju niži MIC odnosno efikasnije dejstvo od kompletnog etarskog ulja određene biljke (Sokovic i sar., 2010; Dal Pozzo i sar., 2011). Navedene studije su pokazale da aktivne komponente koje sadrže aldehide ili fenole, kao što su cinamaldehyd, citral, karvakrol, eugenol ili timol pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost, a zatim slede jedinjenja na bazi terpenskih alkohola, ketona ili estara kao što su: p-mircen, α -tujon ili geranil acetat, dok su isparljiva etarska ulja sa terpen ugljovodonicima skoro neaktivna (Bakkali i sar., 2008; Bassole i Juliani, 2012). Antibakterijska aktivnost biljaka rodova *Thimus* i *Origanum* se pripisuje prisustvu fenolnih komponenti, timola i karvakrola (Bošković i sar., 2013; Dal Pozzo i sar., 2011). Antimikrobna aktivnost cimeta je direktna posledica visokog sadržaja cinamaldehyda. U bosiljku najjači antibakterijski sastojci su eugenol (19%) i linalul (54%), mada se ne može zanemariti njihov sinergistički efekat.

U radu Nazera i saradnika (2005) ispitivan je antibakterijski efekat 7 aromatičnih supstanci uključujući karvakrol, eugenol i timol, kako pojedinačno tako i u kombinacijama. Ogljed je vršen korišćenjem faktorijelnog frakcionog dizajna koji dozvoljava poređenje pojedinačnih aktivnih komponenti sa kombinacijama od po dve ili po tri aktivne supstance. Prema rezultatima ove studije najpotentnije aktivne komponente etarskih ulja bile su timol i karvakrol. U kombinacijama različitih aktivnih komponenti etarskih ulja posebno se istakao timol u potenciranju zajedničkog antimikrobnog dejstva (Nazer i sar., 2005). Bassole i Juliani (2012) u preglednom radu posvećenom antimikrobnom delovanju kombinacija aktivnih komponenti etarskih ulja na *S. aureus* zaključili su da se po pravilu kombinacija karvakrola i timola odlikuje aditivnim i supra aditivnim sinergizmom, cinamaldehyda i eugenola aditivnim sinergizmom, a karvakrola i eugenola antagonizmom. Autori su posebnu pažnju obratili na razjašnjenje različitih rezultata ispitivanja zajedničkog delovanja kombinacija aktivnih komponenti etarskih

ulja na *S. aureus*, koja su po svemu sudeći posledica razlika u primenjenim metodama ispitivanja kao i različitom sastavu i posledično drugačijim antimikrobnim svojstima etarskih ulja biljaka iste vrste odnosno hemotipa.

Veoma interesantnu temu naučnih istraživanja predstavlja ispitivanje međusobnog odnosa odnosno mogućeg sinergizma antibiotika i aktivnih komponenti etarskih ulja. Choi i saradnici su 2012. godine opisali sinergizam u antimikrobnom dejstvu amoksicilina i norfloksacina u kombinaciji sa etarskim uljem origana i limunove trave.

Na tržištu pojedinih zemalja postoje preparati za intramamarnu primenu kod krava poput Phyto-Mast ili Captor Gel koji sadrže etarska ulja biljaka. Imajući u vidu da u sastavu navedenih preparata dominiraju nefrakcionisana etarska ulja raznih biljaka, i da se aktivne komponente odlikuju višestruko potentnijim antimikrobnim dejstvom u odnosu na etarska ulja, dodavanje čistih aktivnih komponenti etarskih ulja u formulaciju nameće se kao adekvatan put postizanja još boljeg antibakterijskog efekta preparata u terapiji mastitisa izazvanim *S. aureus*.

6.5. Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja

Utvrđivanje dužine efekta antimikrobnih supstanci odnosno farmakokinetičkih svojstava se vrši u koncentracijama koje ne ispoljavaju baktericidni efekat. Ukoliko aktivna supstanca ispoljava svoju aktivnost u dužem vremenskom periodu, interval između aplikacija leka može biti duži, pa tako na primer antibiotik kloksacilin, koji se karakteriše veoma dugim vremenom polueliminacije, kao intramamarna suspenzija se primenjuje jednokratno prilikom zasušenja.

Prilikom ispitivanja dužine efekta (time-kill test) u mleku odabrana je doza koja neće dovesti do baktericidnog efekta sa ciljem da se detaljnije sagleda kinetika aktivne komponente odnosno u kontroli antibiotika. Svakom reinokulacijom simuliran je priliv umnoženih bakterija iz inficiranog intersticijuma vimena. Cinamaldehyd i karvakrol su se odlikovali višestruko potentnijim aktivnim dejstvom i značajno dužim efektom u odnosu kako na preostale dve aktivne komponente etarskih ulja, eugenol i timol, tako i na kontrolni antibiotik linkomicin. Dejstvo tokom celog dvonedelnog ogleada ispoljili su i karvakrol i cinamaldehyd, timol je ispoljio dejstvo tokom prvih 5 dana, a eugenol samo prva dva dana ogleada odnosno do prve reinokulacije. Kratkoročno dejstvo je ispoljio i

kontrolni antibiotik linkomicin, koji je očekivano inhibirao bakterije nakon 24h od početka ogleđa, ali već narednog dana broj bakterija je dosegao početni nivo. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da cinamaldehyd i karvakrol imaju dug poluživot u mleku i da je naučno opravdan nastavak ispitivanja njihovih kako antimikrobnih tako i farmakokinetičkih svojstava.

Prema podacima iz dostupne literature time-kill test je izvođen u bujonu kao tečnom medijumu. Sama dinamika brojnosti populacije bakterija je praćena u periodu od jednog do tri dana, pri čemu je ispitivano je dejstvo razlićitih sintetskih ili polusintetskih antibiotika, a u nekoliko radova ulje čajnog drveta. Ananda Baskaran i saradnici (2009) su upotrebili mleko kao medijum za ispitivanje dućine antimikrobnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja. U navedenom radu autori su dobili rezultate veoma slične našim. U testu su koristili koncentracije rastvora od 0,45% (4500µg/ml) i 0,7% (7000µg/ml) i pri tome pokazali da cinamaldehyd zadržava dejstvo i nakon 14 dana inkubacije uz tri reinokulacije (2., 4. i 6. dana).. U navedenom istraživanju korišćene su doze koje su jednake ili veće od ustanovljenih MIC vrednosti. Primenom ovih visokih koncentracija očekivao se dugotrajan efekat u zavisnosti od određenih fizićko-hemijskih osobina same supstance: rastvorljivosti, gubljenja antimikrobne aktivnosti ili izdvajanje komponente iz emulzije. Koncentracija cinamaldehyda od oko 1000µg/ml u ovom ispitivanju je nakon 24h smanjila početni inokulum od 6 log₁₀ cfu/mL na manje od 1 log₁₀ cfu/mL odnosno 10000 puta (Ananda Baskaran i sar., 2009). U našem ispitivanju, sa višestruko nižom koncentracijam aktivne komponente, dobijeni su podjednako dobri rezultati antimikrobne aktivnosti prema *S. aureus*, čiji je broj nakon inkubacije od 24 h sa cinamaldehydom bio ispod limita kvantifikacije. U istraživanju Yossa i saradnika (2012) ustanovljeno je da cinamaldehyd pokazuje baktericidno dejstvo nakon 6h u koncentracijama od priblićno 800 i 1000 µg/ml odnosno 800ppm i 1000ppm. U istom radu su i opisane promene na površini bakterijske ćelije vizualizovane elektronskim mikroskopom.

Imajući u vidu po pravilu kratko dejstvo antibiotika s jedne strane, a antimikrobno delovanje cinamaldehyda i karvakrola u trajanju od najmanje dve nedelje sa druge strane, jasno je da je naše istraživanje prućilo osnov za nastavak ispitivanja ovih aktivnih komponenti etarskih ulja ne samo *in vitro* nego i *in vivo* radi pripreme nove

formulacije i primene efikasnijih preparata sa protrahiranim dejstvom kod mastitisa krava.

6.6. Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na *S. aureus* u biofilmu

Ovaj deo istraživanja bio je usmeren na utvrđivanje dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola na smanjenje mase biofilma i dejstvo na žive ćelije biofilma.

Najpotentnije delovanje u redukciji biomase na 50% mase netretiranog biofilma, imali su sa srednjom vrednošću MIC biofilma karvakrol 1152 μ g/ml, zatim eugenol 1460 μ g/ml, timol 1592 μ g/ml i na kraju cinamaldehyd 1716 μ g/ml.

Najpotentnije delovanje u redukciji broja živih ćelija biofilma na 50% broja ćelija netretiranog biofilma, imali su sa srednjom vrednošću MBC biofilma timol 1156 μ g/ml, zatim karvakrol 1284 μ g/ml, eugenol 1512 μ g/ml i na kraju cinamaldehyd 1776 μ g/ml.

Poređenjem dobijenih rezultata ustanovljeno je da je došlo do značajnog povećanja minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije svih ispitivanih aktivnih komponenti etarskih ulja kod biofilma u odnosu na planktonske ćelije. Aktivne komponente etarskih ulja slabije su delovale kod biofilma, što je potvrđeno izračunavanjem MIC biofilm/MIC odnosno MBC biofilm/MBC odnosa, koji su bili kod karvakrola 4,85 i 1,50, eugenola 5,38 i 1,39, cinamaldehyda 10,63 i 2,61, kao i timola 5,19 i 1,04. Ove vrednosti ukazuju koliko puta je slabije antimikrobno dejstvo na *S. aureus* u biofilmu u odnosu na planktonsku formu *S. aureus*.

Najveće povećanje MIC i MBC vrednosti između planktonske i forme biofilma od 10,63 odnosno 2,61 puta ustanovljeno je kod cinamaldehyda, što ukazuje na njegovo slabije delovanje kako na masu tako i na vijabilnost ćelija biofilma u odnosu na druge aktivne komponente etarskih ulja kod kojih nije uočen tako značajan pad dejstva. Imajući u vidu najnižu MIC vrednost biofilma cinamaldehyda prema planktonskoj formi *S. aureus* postavlja se pitanje efikasnosti ove aktivne komponente kod infekcija kod kojih su prisutne forme biofilma. Niže smanjenje MIC i MBC vrednosti biofilma karvakrola i timola, odnosno komparativno više antimikrobno dejstvo u odnosu na cinamaldehyd, nameće kao mogućnost kombinaciju ovih aktivnih komponenti etarskih

ulja sa cinamaldehydom, a time i postizanje sveobuhvatnog antibakterijskog delovanja protiv obe forme *S. aureus*.

Dobro delovanje karvakrola je potencirano osobinom da u biofilmovima deluje specifično na *S. aureus* čak i kada se biofilm sastoji i od bakterija druge vrste što je u svom radu opisao Knowles sa saradnicima 2005. godine. I rezultati u ovom ispitivanju u Srbiji, ukazuju na izuzetno potentno dejstvo aktivne komponente karvakrola na biofilm *S. aureus* kod koga je izračunat i najniži MIC biofilma/MIC odnos od 4,85 puta, odnosno najniže smanjenje antibakterijskog dejstva na formu biofilma u odnosu na planktonsku.

Fux i saradnici (2004) kao i Gomes i saradnici (2011) su ustanovili da su razlike u MIC vrednostima kod planktonske i biofilm forme aktivnih komponenti etarskih ulja drastično manje u odnosu na antibiotike, kod kojih ovo drastično smanjenje kod biofilma može da bude i preko 1000 puta. Tokom ispitivanja sprečavanja formiranja biofilma Jia i saradnici (2011) su zaključili da cinamaldehyd direktno utiče na smanjenje debljine slojeva bakterija u biofilmu i da prouzrokuje pad ekspresije *serA* gena, jednog od gena regulacije proizvodnje biofilma.

Efekat koncentracije odnosno doze je zabeležen u našem istraživanju. U subletalnim koncentracijama aktivnih komponenti etarskih ulja primećen je u određenim slučajevima porast broja ćelija biofilma i mase biofilma koji je bio veći nego u kontroli. Bujniji rast biofilma je zabeležen pre svega kod cinamaldehyda u niskim koncentracijama. To je u skladu sa mišljenjem Stepanovića i saradnika (2004), kao i McLandsborough i saradnika (2006) da je produkcija biofilma intenzivnija pod dejstvom stresogenih faktora.

Upoređujući rezultate dobijene u ovom ispitivanju u Srbiji sa radovima drugih autora može se zaključiti da treba nastaviti sa istraživanjima antimikrobnog dejstva etarskih ulja i njihovih aktivnih komponenti u cilju pronalaženja efikasnog i potentnog sredstva u borbi protiv sve šire prisutnih infekcija izazvanih bakterijama u formi biofilma.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. U odnosu na fenotipizaciju, molekularna identifikacija *nuc* gena primenom reakcije vezane polimeraze obezbeđuje tačnu i bržu identifikaciju koagulaza pozitivnih *Staphylococcus* vrsta.
2. Kod izolata *S. aureus* poreklom od krava sa supkliničkim i kliničkim mastitisom izuzetno je retka multipla rezistencija prema antimikrobnim sredstvima. Na tri i više antibiotika rezistencija je utvrđena kod 7 od ukupno 113 ispitivanih izolata, odnosno kod 6,19%.
3. Izuzev penicilina G prema kome je rezistencija utvrđena kod 96,16% ispitanih izolata, rezistencija prema drugim antibioticima i hemoterapeuticima pojavljuje se sporadično, i to u rasponu od 0% do 13,33%.
4. Sposobnost formiranja biofilma determinisana *icaAD* genom utvrđena je u velikom procentu, kod 88,76% ispitanih izolata, što ukazuje da ova karakteristika predstavlja jedan od ključnih faktora virulencije *S. aureus* kod mastitisa krava.
5. Na osnovu utvrđenih vrednosti minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija, ispitivane aktivne komponente etarskih ulja ispoljile su antimikrobno dejstvo prema izolatima *S. aureus* u sledećem opadajućem nizu: cinamaldehyd > karvakrol > eugenol > timol. Srednje vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) su iznosile kod cinamaldehyda 161,5µg/ml, karvakrola 320µg/ml, eugenola 271,6µg/ml i timola 306,5µg/ml. Najpotentnije baktericidno dejstvo pokazao je cinamaldehyd sa srednjom vrednošću MBC od 680µg/ml, zatim karvakrol sa 857,4µg/ml, eugenol 1086,2µg/ml i na kraju timol sa 1106,5µg/ml.
6. Utvrđena je statistički vrlo značajna razlika u antimikrobnom dejstvu cinamaldehyda u odnosu na ostale ispitane aktivne komponente etarskih ulja ($p < 0,01$), dok je značajna statistička razlika utvrđena između antimikrobnog dejstva eugenola i timola ($p < 0,05$).
7. Aktivne komponente etarskih ulja karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol su podjednako efikasno delovale na izolate *S. aureus* osetljive i rezistentne prema

određenim antibioticima, što imajući u vidu stalni globalni porast rezistencije potencira njihovu primenu kao antimikrobnih sredstava.

8. Određene kombinacije i koncentracije aktivnih komponenti etarskih ulja odlikuju se sinergističkim dejstvom, koje je bilo najizraženije kod karvakrola i eugenola u koncentraciji od 20 µg/ml, odnosno 80µg/ml.
9. Aktivne komponente karvakrol i cinamaldehyd se odlikuju izuzetno dugim antibakterijskim dejstvom na izolate *S. aureus* u trajanju od najmanje 14 dana i više je nego opravdano nastaviti in vitro i in vivo ispitivanja u cilju pripreme nove formulacije efikasnijih preparata sa protrahiranim dejstvom kod mastitisa krava.
10. Aktivne komponente etarskih ulja karvakrol i timol odlikovale su se najpotentnijem delovanjem u redukciji biomase odnosno broja viabilnih ćelija biofilma *S. aureus*.
11. Imajući u vidu najpotentnije dejstvo cinamaldehyda prema planktonskoj formi *S. aureus* kao i karvakrola i timola prema biomasi i viabilnim ćelijama biofilma, nameće se kao mogućnost kombinacija ovih aktivnih komponenti etarskih ulja u cilju postizanja sveobuhvatnog antibakterijskog delovanja.

8. LITERATURA

- 1) AARESTRUP, F. M., JENSEN, L. B. 2002. Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. *Veterinary microbiology*, 89, 83-94.
- 2) AARESTRUP, F. M., WEGENER H.C., ROSDAHL V.T. 1995. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Veterinary microbiology*, 45, 135-150.
- 3) ALIMIS, A. Z. L. I. M. S. S. 2014a. *Humani lekovi* [Online]. Available: <http://www.alims.gov.rs> [Accessed 11.09.2014].
- 4) ALIMIS, A. Z. L. I. M. S. S. 2014b. *Veterinarski lekovi* [Online]. Available: <http://www.alims.gov.rs> [Accessed 25.06.2014].
- 5) ALVAREZ-ASTORGA, M., CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C., MORENO, B., DEL, M., GARCIA-FERNANDEZ, C. 2002. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat science*, 62, 45-50.
- 6) AMORENA, B., BASELGA, R., ALBIZU, I. 1994. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine*, 12, 243-249.
- 7) AMORENA, B., GRACIA, E., MONZON, M., LEIVA, J., OTEIZA, C., PEREZ, M., ALABART, J. L., HERNANDEZ-YAGO, J. 1999. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 44, 43-55.
- 8) ANANDA BASKARAN, S., KAZMER, G. W., HINCKLEY, L., ANDREW, S. M., VENKITANARAYANAN, K. 2009. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *Journal of dairy science*, 92, 1423-1429.
- 9) ANTUNES, A. L. S., BONFANTI, J. W., PEREZ, L. R. R., PINTO, C. C. F., FREITAS, A. L. P. D., MACEDO, A. J., BARTH, A. L. 2011. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Memoria instituto Oswaldo Cruz*, 106, 51-55.
- 10) ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., SPEZIALE, P., MONTANARO, L., COSTERTON, J. W. 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33, 5967-82.
- 11) ARSLAN, E., ÇELEBI, A., AÇIK, L., UÇAN, U. S. 2009. Characterisation of coagulase positive *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis using protein and plasmid patterns. *Turkish journal veterinary animimal science*, 6, 493-500.
- 12) AŠANIN, J. AKSENTIJEVIĆ, K., ŽUTIĆ, M., KATIĆ, V., KRNJAIĆ, D., MILIĆ, N., AŠANIN, R., MIŠIĆ, D. 2012. Ispitivanje osjetljivosti *Staphylococcus* vrsta na neke antibakterijske lekove primenom disk difuzione i mikrodilucione metode u bujonoj. *Veterinarski glasnik* 66 (3-4) 199 – 210.
- 13) ASFOUR, H. A. E., DARWISH, S. F. 2011. Phenotypic and genotypic detection of both *mecA*- and *blaZ*-genes mediated p-lactam Resistance in *Staphylococcus* Strains Isolated from Bovine Mastitis. *Global veterinaria* 6, 39-50.
- 14) ASLANTAS, Ö., DEMIR, C., TÜRÜTÖGLU, H.,CANTEKIN, Z., ERGÜN, Y.,DOĞRUEK, G. 2007. Coagulase Gene Polymorphism of *Staphylococcus aureus* Isolated from Subclinical Bovine Mastitis. *Turkish journal veterinary animimal science* 31 (4): 253-257.
- 15) BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils--a review. *Food and chemical toxicology : An international journal published for the British industrial biological research association* 46, 446-475.

- 16) BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., ZADOKS, R. N. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science*, 89, 1877-95.
- 17) BARSOUMIAN, A. E., MENDE, K., SANCHEZ, C. J., JR., BECKIUS, M. L., WENKE, J. C., MURRAY, C. K., AKERS, K. S. 2015. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. *BMC Infectious Disease*, 15, 1-7.
- 18) BASSOLE, I. H., JULIANI, H. R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989-4006.
- 19) BENNEDSGAARD, T. W., THAMSBORG, S. M., VAARST, M., ENEVOLDSEN, C. 2003. Eleven years of organic dairy production in Denmark: herd health and production related to time of conversion and compared to conventional production. *Livestock production science*, 80, 121-131.
- 20) BOŠKOVIĆ, M., BALTIĆ, M., JANJIĆ, J., DOKMANOVIĆ, M., IVANOVIĆ, J., MARKOVIĆ, T., MARKOVIĆ, R. 2013. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja na *Salmonella* spp. u mesu i proizvodima od mesa. *Lekovite sirovine*, 39 – 52.
- 21) BRINKMANN, J., MARCH, S., HÖLLER, B., WINCKLER, C. 2007. Udder health in organic dairy herds – Influence of lactational stage and number of lactations on the treatment incidence of clinical mastitis. 9. *Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau*. Hohenheim: Universität Hohenheim.
- 22) BURT, S. A., RENE, V., HENK, P. H., ANDEDWIN, J. A. V. 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol on *E.coli* with food stabilasers. *Journal of food protection*, 68, 919-926.
- 23) CASTELANI, L., PILON, L. E., MARTINS, T., POZZI, C. R., ARCARO, J. R. 2015. Investigation of biofilm production *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. *Animal science journal*, 86, 340-344.
- 24) CERCA, N., JEFFERSON, K. K., MAIRA-LITRAN, T., PIER, D. B., KELLY-QUINTOS, C., GOLDMANN, D. A., AZEREDO, J., PIER, G. B. 2007. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infection and immunity*, 75, 3406-3413.
- 25) CHAMBERS, H. F. I DELEO, F. R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews microbiology*, 7, 629-41
- 26) CHENG, D., ZHU, S. U., YIN, Z., DING, W., MU, Z., SU, Z., SUN, H. 2010. Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *African journal of microbiology research*, 4, 1110-1116.
- 27) 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*, 134-139.
- 28) CIFTCI, A., FINDIK, A., ONUK, E. E., SAVASAN, S. 2009. Detection of methicillin resistance and *slime* factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis, *Brazilian journal of microbiology*; 40(2): 254–261.
- 29) CLSI, C. A. L. S. I. 2006. M7-A7 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Seventh edition. Clinical and laboratory standards institute (CLSI) 950 West Valley road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2006. .
- 30) CLSI, C. A. L. S. I. 2012. M02-A11 performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and laboratory standards institute (CLSI) 950 West Valley road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2012. .

- 31) CLSI, C. A. L. S. I. 2014. M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 950 West Valley road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- 32) CROES, S., DEURENBERG, R. H., BOUMANS, M. L., BEISSER, P. S., NEEF, C., STOBBERINGH, E. E. 2009. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiology*, 9, 229.
- 33) CUARON, J. A., DULAL, S., SONG, Y., SINGH, A. K., MONTELONGO, C. E., YU, W., NAGARAJAN, V., JAYASWAL, R. K., WILKINSON, B. J., GUSTAFSON, J. E. 2013. Tea tree oil-induced transcriptional alterations in *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy research*, 27, 390-396.
- 34) CUNY, C., FRIEDRICH, A., KOZYTSKA, S., LAYER, F., NUBEL, U., OHLSEN, K., STROMMENGER, B., WALTHER, B., WIELER, L., WITTE, W. 2010. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International journal of medical microbiology* 300, 109-117.
- 35) CUPARA, S., ČUPIĆ, V., MILOVANOVIĆ, O., RADOVANOVIĆ, A., KIPIC, M. 2015. Homeopatija u humanojoj i veterinarskoj medicini. *Veterinarski glasnik*, 69, 281 - 290.
- 36) CUSATO, S., GAMEIRO, A. H., CORASSIN, C. H., SANT'ANA, A. S., CRUZ, A. G., FARIA JDE, A., DE OLIVEIRA, C. A. 2013. Food safety systems in a small dairy factory: implementation, major challenges, and assessment of systems' performances. *Foodborne pathogens and disease*, 10, 6-12.
- 37) DAL POZZO, M., LORETO, É. S., SANTURIO, D. F., ALVES, S. H., ROSSATTO, L., VARGAS, A. C. D., VIEGAS, J., COSTA, M. M. D. 2012. Antibacterial activity of essential oil of cinnamon and trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus* spp. isolated from clinical mastitis of cattle and goats. *Acta scientiae veterinariae*, 40.
- 38) DAL POZZO, M., SANTURIO, D. F., ROSSATTO, L., VARGAS, A. C., ALVES, S. H., LORETO, E. S., VIEGAS, J. 2011. Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, 63, 1229-1232.
- 39) DAS, B., MANDAL, D., DASH, S. K., CHATTOPADHYAY, S., TRIPATHY, S., DOLAI, D. P., DEY, S. K., ROY, S. 2016. Eugenol provokes ROS-mediated membrane damage-associated antibacterial activity against clinically isolated multidrug-resistant *staphylococcus aureus* strains. *Infectious diseases (Auckl)*, 9, 11-9.
- 40) DE CASTRO MELO, P., FERREIRA, L., M., FILHO, A., N., ZAFALON, L., F., VICENTE, H., I., G., DE SOUZA, V. 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian journal of microbiology*, 44, 1, 119-124.
- 41) DE NEELING, A. J., VAN DEN BROEK, M. J., SPALBURG, E. C., VAN SANTEN-VERHEUVEL, M. G., DAM-DEISZ, W. D., BOSUIZEN, H. C., VAN DE GIESSEN, A. W., VAN DUIJKEREN, E., HUIJSDENS, X. W. 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary microbiology*, 122, 366-372.
- 42) DEVRIESE, L. A., VAN DAMME, L. R., FAMEREE, L. 1972. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Journal of veterinary medicine. Series B*, 19, 598-605.
- 43) EBRAHIMI, A., TAHERI, A. 2009. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord, Iran *Iranian journal of veterinary research*, 10.
- 44) EFSA, E. F. S. A., ECDC, E. C. F. D. P. A. C. 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*.

- 45) EFSA, E. F. S. A., ECDC, E. C. F. D. P. A. C. 2015. EU Summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, 2, 178.
- 46) EM, E. S., AR, A. A., AM, M., AA, E. A. 2014. Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in Rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*.
- 47) EUROPEAN COMMISSION, E. 2010. Evolution of the market situation and the consequent conditions for smoothly phasing out the milk quota system report from the European Commission to the European Parliament and the Council.
- 48) EUROPEAN UNION COUNCIL 1999. Council Regulation (EC) No 1804/1999 of supplementing Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs to include livestock production. *Official journal of the European Communities*, L222/1.
- 49) EUROSTAT. 2015. *Organic farming statistic* [Online]. Eurostat. Available: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Organic_farming_statistics#Further_Eurostat_information [Accessed 28.12.2015].
- 50) FARRAN, C. E., SEKAR, A., BALAKRISHNAN, A., SHANMUGAM, S., ARUMUGAM, P., GOPALSWAMY, J. 2013. Prevalence of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* in the healthy skin of individuals in Tamil Nadu, India. *Indian journal of medical microbiology*, 31, 19-23.
- 51) FDA, F. A. D. A. 2016. *The national list of allowed and prohibited substances* [Online]. FDA USA. Available: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&SID=9874504b6f1025eb0e6b67cadf9d3b40&rgn=div6&view=text&node=7:3.1.1.9.32.7&idno=7> [Accessed 28.02.2016. 2016].
- 52) FRANK, L. A., KANIA, S. A., HNILICA, K. A., WILKES, R. P., BEMIS, D. A. 2003. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222, 451-454.
- 53) FUX, C. A., WILSON, S., STOODLEY, P. 2004. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *Journal of bacteriology*, 186, 4486-4491.
- 54) GANDRA, E. A., FERNANDEZ, M. A., SILVA, J. A., SILVA, W. P. D. 2011. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase positive *Staphylococci*. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 4, 946-949.
- 55) GALLUCCI, N., OLIVA, M., CAREZZANO, E., ZYGADLO, J., DEMO, M. 2010. Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non-producing staphylococci. *Molecular medicinal chemistry*, 21, 132-136.
- 56) GHARIB, A., ATTIA, M., A., A., BENDARY M., M. 2013. Detection of the coag gene in *Staphylococcus aureus* from different sources by polymerase chain reaction. *International journal of microbiological research*, 4 (1): 37-42.
- 57) GARABADU, D., SHAH, A., SINGH, S., KRISHNAMURTHY, S. 2014. Protective effect of eugenol against restraint stress-induced gastrointestinal dysfunction: potential use in irritable bowel syndrome. *Pharmaceutical biology*, 1-7.
- 58) GARRETT, T. R., BHAKOO, M., ZHANG, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in natural science*, 1049-1056.
- 59) GENTILINI, E., DENAMIÉL, G., LLORENTE, P., GODALY, S., REBUELTO, M., DEGREGORIO, O. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of dairy science*, 83, 1224-1227.
- 60) GHARIB, A. A., ATTIA, M. A. A., BENDARY, M. M. 2013. Detection of Coa gene in *S. aureus* from different sources by PCR. *International Journal of Microbiological Research*, 4, 37-42.
- 61) GHARSA, H., SLAMA, K. B., GOMEZ-SANZ, E., GOMEZ, P., KLIBI, N., ZARAZAGA, M., BOUDABOUS, A., TORRES, C. 2015. Characterisation of nasal

- Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. *Equine veterinary journal*, 47, 463-466.
- 62) GOMES, F., LEITE, B., TEIXEIRA, P., OLIVEIRA, R. 2011. Strategies to control *Staphylococcus epidermidis* biofilms. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.) *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex.
 - 63) GORDON, R. J., LOWY, F. D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of america*, 46 suppl 5, s350-s359.
 - 64) GÖTZ, F., BANNERMAN, T., SCHLEIFER, K.-H. 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: DWORKIN (ed.) *The Prokaryotes*.
 - 65) GUSTAFSON, J. E., LIEW, Y. C., CHEW, S., MARKHAM, J., BELL, H. C., WYLLIE, S. G., WARMINGTON, J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters of applied microbiology*, 26, 194-8.
 - 66) GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*, 124, 91-97.
 - 67) GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food microbiology*, 26, 142-150.
 - 68) HAMMER, K. A., CARSON, C. F. 2011. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (ed.) *Lipids and essential oils*. New Delhi, India: John Wiley, Sons, Ltd.
 - 69) HASSAN, A. N., BIRT, D. M., FRANK, J. F. 2004. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. *Journal of food protection*, 67, 322-327.
 - 70) HAYANI, K. C., MATHEW, R., OYEDELE, T., HULTEN, K. G. 2008. Neonatal necrotizing fasciitis due to community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *The Pediatric infectious disease journal*, 27, 480-481.
 - 71) HELDMAN, D. M. 2005. *Modern food microbiology*, New York, USA, Springer science.
 - 72) HERMANS, K., DEVRIESE, L. A., HAESEBROUCK, F. 2004. *Staphylococcus*. In: GYLES, C. L., PRESCOTT, J. F., SONGER, J. G., THOEN, C. O. (eds.) *Pathogenesis of bacterial infection in animals*. Ames: Blackwell Publishing.
 - 73) HILLERTON, J. E., BERRY, E. A. 2005. Treating mastitis in the cow--a tradition or an archaism. *Journal of applied microbiology*, 98, 1250-1255.
 - 74) HOWARD, P., PULCINI, C., LEVY HARA, G., WEST, R. M., GOULD, I. M., HARBARTH, S., NATHWANI, D., ON BEHALF OF THE, E. S. G. F. A. P., STEWARDSHIP, I. S. C. G. O. A. 2014. An international cross-sectional survey of antimicrobial stewardship programmes in hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*.
 - 75) HRISTOV, S., STANKOVIC, B., RELIC, R. 2005. Klinički i subklinički mastitis u krava. *Biotechnology in Animal Husbandry*. Belgrade, Serbia: Institute for animal husbandry.
 - 76) HSOUNA, A. B., TRIGUI, M., MANSOUR, R. B., JARRAYA, R. M., DAMAK, M., JAOUA, S. 2011. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International journal of food microbiology*, 148, 66-72.
 - 77) HUBER, W. G. 1970. The public health hazards associated with the non-medical and animal health usage of antimicrobial drugs. *Pure and applied chemistry*, 21, 377-388.
 - 78) IMANI, F. A., TAVAKOLI, H., NADERI, A. 2010. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. *Iranian journal of microbiology*, 2, 137-142.

- 79) INOUE, S., UCHIDA, K., NISHIYAMA, Y., HASUMI, Y., YAMAGUCHI, H., ABE, S. 2007. Combined effect of heat, essential oils and salt on fungicidal activity against *Trichophyton mentagrophytes* in a foot bath. *Nihon ishinkin gakkai zasshi*, 48, 27-36.
- 80) IWG-SCC, I. W. G. O. T. S. C. C. E. 2015. *The general guidelines for reporting novel SCCmec/SCC elements* [Online]. International working group on the staphylococcal cassette chromosome elements. available: <http://www.sccmec.org> [Accessed 18.09.2015].
- 81) JANOSI, S., BALTAY, Z. 2004. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. *Acta Vet Hung*, 52, 173-183.
- 82) JENKINSON, H. F., LAPPIN-SCOTT, H. M. 2001. Biofilms adhere to stay. *Trends in microbiology*, 9, 9-10.
- 83) JIA, P., XUE, Y. J., DUAN, X. J., SHAO, S. H. 2011. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters of applied microbiology*, 53, 409-416.
- 84) JUHÁSZ-KASZANYITZKY, É. 2007. MRSA Transmission between cows and humans. *Emerging infectious diseases*, 13, 630-632.
- 85) KALOREY, D. R., SHANMUGAM, Y., KURKURE, N. V., CHOUSALKAR, K. K., BARBUDDHE, S. B. 2007. PCR based detection of *S. aureus* virulence factors from mastitis. *Journal of veterinary science*, 8, 151 - 154.
- 86) KASZANYITZKY, E. J., JANOSI, S., EGYED, Z., AGOST, G., SEMJEN, G. 2003. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. *Acta veterinaria Hungarica*, 51, 451-464.
- 87) KNOWLES, J. R., ROLLER, S., MURRAY, D. B., NAIDU, A. S. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied environmental microbiology*, 71, 797-803
- 88) KOSTIĆ, A. 2005. *Komparativni prikaz antibiotezistencije Staphylococcus species izolovanih iz patološkog materijala i namirnica životinjskog porekla*. Specijalistički rad, Univerzitet u Beogradu.
- 89) KRNJAIC, D., MISIC, D., ASANIN, R. 2005. Investigation of sensitivity and resistance to antibiotics and chemotherapeutics in *E. coli* strains isolated from animals bred in intensive farming conditions *Acta veterinaria*, 55, 501-509.
- 90) KRNJAIC, D. 2000. *Ispitivanje rezistencije bakterija izolovanih od domaćih životinja prema hemioterapijskim sredstvima*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- 91) LAZAREVIĆ, J. 2011. *Hemotaksonomski značaj konstituenata etarskih ulja: hemometrijski pristup*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu.
- 92) LERICHE, V., CARPENTIER, B. 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of applied microbiology*, 88, 594-605.
- 93) LEWIS, C. H., MØLBAK, K., REESE, C., AARESTRUP, F. M., SELCHAU, M., SØRUM, M., SKOV, R. L. 2008. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerging infectious diseases* 14, 1383-1389.
- 94) LOWY, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine*, 339, 520-532.
- 95) LUINI, M., CREMONESI, P., MAGRO, G., BIANCHINI, V., MINOZZI, G., CASTIGLIONI, B., PICCININI, R. 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. *Veterinary microbiology*, 178, 270-274.

- 96) LUND, V. 2002. *Ethics and animal welfare in organic animal husbandry*. Doctoral thesis Swedish University of agricultural sciences
- 97) MAGAŠ, V., VAKANJAC, S., PAVLOVIĆ, V., VELEBIT, B., MIRILOVIĆ, M., MALETIĆ, M., ĐURIĆ, M., NEDIĆ, S. 2013. Efficiency evaluation of a bivalent vaccine in the prophylaxis of mastitis in cows. *Acta veterinaria*, 63, 525-536.
- 98) MAHAKITTIKUN, V., SOONTHORNCHAREONNON, N., FOONGLADDA, S., BOITANO, J. J., WANGAPAI, T., NINSANIT, P. 2014. A preliminary study of the acaricidal activity of clove oil, *Eugenia caryophyllus*. *Asian pacific journal of allergy and immunology*, 32, 46-52.
- 99) MANIAN, F. A. 2003. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of america*, 36, e26-28.
- 100) MANIE, T., KHAN, S., BROZEL, V. S., VEITH, W. J., GOUWS, P. A. 1998. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *Letters in applied microbiology*, 26, 253-258.
- 101) MCDOUGALL, S., PARKER, K. I., HEUER, C., COMPTON, C. W. 2009. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary microbiology*, 134, 177-185.
- 102) MCLANDBOROUGH, L., RODRIGUEZ, A., PE´REZ-CONESA, D., WEISS, J. 2006. Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. *Food biophysics*, 217-226.
- 103) MELCHIOR, B., PUNTAMBEKAR, S. S., CARSON, M. J. 2006. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *International journal of neurochemistry*, 49, 145-153.
- 104) MELCHIOR, B. M. 2011. Bovine Mastitis and Biofilms. In: PERCIVAL, S. L., KNOTTENBELT, D. C., COCHRANE, C. A. (eds.) *Biofilms and veterinary Medicine*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- 105) MERCHAN ARENAS, D. R., ACEVEDO, A. M., VARGAS MENDEZ, L. Y., KOUZNETSOV, V. V. 2011. Scavenger activity evaluation of the clove bud essential oil (*Eugenia caryophyllus*) and eugenol derivatives employing abts decolorization. *Scientia pharmaceutica*, 79, 779-791.
- 106) MILANOV, D., ASANIN, R., MISIC, D., VIDIC, B., RATAJAC, R. 2007. Investigation of biofilm formation in vitro ability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from animals. *Acta veterinaria* 57, 429-440.
- 107) MILANOV, D., LAZIC, S., VIDIC, B., PETROVIC, J., BUGARSKI D., SEGULJEV, Z., 2010. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates, *Acta veterinaria* 60, (2-3), 217-226.
- 108) MOELLERING, R. C., JR. 2012. MRSA: the first half century. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67, 4-11.
- 109) MONECKE, S., KUHNERT, P., HOTZEL, H., SLICKERS, P., EHRICHT, R. 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Veterinary microbiology*, 125, 128-140.
- 110) MOODY, J. A. 1991. Synergism testing. Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: ISENBERG, H. D. (ed.) *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington, D.C: American society for microbiology.
- 111) MOON, J. S., LEE, A. R., KANG, H. M., LEE, E. S., JOO, Y. S., PARK, Y. H., KIM, M. N., KOO, H. C. 2007. Antibiofilm and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of dairy science* 90, 1716-1724.

- 112) MULLEN, K. A., ANDERSON, K. L., WASHBURN, S. P. 2014. Effect of 2 herbal intramammary products on milk quantity and quality compared with conventional and no dry cow therapy. *Journal of dairy science*, 97, 3509-3522.
- 113) MUSZANSKA, A. K., NEJADNIK, M. R., CHEN, Y., VAN DEN HEUVEL, E. R., BUSSCHER, H. J., VAN DER MEI, H. C., NORDE, W. 2012. Bacterial adhesion forces with substratum surfaces and the susceptibility of biofilms to antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56, 4961-4964.
- 114) NASR, R. A., ABUSHADY, H. M., HUSSEIN, H. S. 2012. Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian journal of medical human genetics*, 13, 269-274.
- 115) NAZER, A. I., KOBILINSKY, A., THOLOZAN, J.-L., DUBOIS-BRISSONNET, F. 2005. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food microbiology*, 22, 391-398.
- 116) NCCLS, N. C. F. C. L. S. 1999. *M26-A, Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial activitys; approved guideline* [Online]. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne, Pennsylvania 19087 USA
- 117) NIELSEN, C. 2009. *Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows*. Doctoral Thesis, Agrocultural university Uppsala.
- 118) NIKOLIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., FERREIRA, I. C. F. R., CALHELHA, R. C., FERNANDES, Â., MARKOVIĆ, T., MARKOVIĆ, D., GIWELI, A., SOKOVIĆ, M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial crops and products*, 52, 183-190.
- 119) NIKOLIĆ, M., MARKOVIĆ, T., MOJOVIĆ, M., PEJIN, B., SAVIĆ, A., PERIĆ, T., MARKOVIĆ, D., STEVIĆ, T., SOKOVIĆ, M. 2013. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Industrial crops and products*, 49, 561-567.
- 120) NORDHAUG, M. L., NESSE, L. L., NORCROSS, N. L., GUDDING, R. 1994. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *Journal of dairy science*, 77, 1267-1275.
- 121) NOSTRO, A., CELLINI, L., ZIMBALATTI, V., BLANCO, A. R., MARINO, A., PIZZIMENTI, F., GIULIO, M. D., BISIGNANO, G. 2012. Enhanced activity of carvacrol against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an acidic environment. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 120, 967-973.
- 122) NOSTRO, A., SUDANO ROCCARO, A., BISIGNANO, G., MARINO, A., CANNATELLI, M. A., PIZZIMENTI, F. C., CIONI, P. L., PROCOPIO, F., BLANCO, A. R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of medical microbiology*, 56, 519-523.
- 123) NUNAN, C., YOUNG, R. 2007. MRSA in farm animals and meat A new threat to human health UK: Soil association.
- 124) O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*, 54, 49-79.
- 125) OKESOLA, A. O. 2011. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--a review of literature. *African journal of medicine and medical sciences*, 40, 97-107.
- 126) OLDE RIEKERINK, R. G., BARKEMA, H. W., SCHOLL, D. T., POOLE, D. E., KELTON, D. F. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Prev Vet Med*, 97, 20-28.
- 127) PATERSON, G. K., MORGAN, F. J., HARRISON, E. M., PEACOCK, S. J., PARKHILL, J., ZADOKS, R. N., HOLMES, M. A. 2014. Prevalence and properties of

- mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69, 598-602.
- 128) PATRICIA, J. M. 1961. "Celbenin" - resistant Staphylococci. *British medical journal*, 14, b124-125.
- 129) PEETERS, E., NELIS, H. J., COENYE, T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods*, 72, 157-165.
- 130) PETERSEN, A., STEGGER, M., HELTBERG, O., CHRISTENSEN, J., ZEUTHEN, A., KNUDSEN, L. K., URTH, T., SORUM, M., SCHOULS, L., LARSEN, J., SKOV, R., LARSEN, A. R. 2013. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clinical microbiology and infection* 19, E16-22.
- 131) PETROVSKI, K. R., GRINBERG, A., WILLIAMSON, N. B., ABDALLA, M. E., LOPEZ-VILLALOBOS, N., PARKINSON, T. J., TUCKER, I. G., RAPNICKI, P. 2015. Susceptibility to antimicrobials of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Str. dysgalactiae* from New Zealand and the USA as assessed by the disk diffusion test. *Australian veterinary journal*, 93, 227-233.
- 132) PHILPOT, W. N. 1979. Control of mastitis by hygiene and therapy. *Journal of dairy science*, 62, 168-176.
- 133) PINEDO, P., KARREMAN, H., BOTHE, H., VELEZ, J., RISCO, C. 2013. Efficacy of a botanical preparation for the intramammary treatment of clinical mastitis on an organic dairy farm. *The Canadian veterinary journal*, 54, 479-484.
- 134) POGANY SIMONOVA, M., LAUKOVA, A., HAVIAROVA, M. 2010. Pseudomonads from rabbits and their sensitivity to antibiotics and natural antimicrobials. *Research in veterinary science*, 88, 203-207.
- 135) POTTUMARTHY, S., SCHAPIRO, J. M., PRENTICE, J. L., HOUZE, Y. B., SWANZY, S. R., FANG, F. C., COOKSON, B. T. 2004. Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 42, 5881-5884.
- 136) PRENAFETA, A., MARCH, R., FOIX, A., CASALS, I., COSTA, L. 2010. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 134, 208-17.
- 137) PRESCOTT, J. F., HANNA, W. J., REID-SMITH, R., DROST, K. 2002. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *The Canadian veterinary journal*, 43, 107-116.
- 138) QUINN, P. J., MARKEY, B. K., LEONARD, F. C., FITZPATRICK, E. S., FANNING, S., HARTIGAN, P. J. 2011. *Staphylococcus* species. *Veterinary microbiology and microbial disease*. Chichester West Sussex UK: Wiley-Blackwell.
- 139) RAAD, I., MOHAMED, J. A., REITZEL, R. A., JIANG, Y., DVORAK, T. L., GHANNOUM, M. A., HACHEM, R. Y., CHAFTARI, A. M. 2011. The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. *Biomaterials*, 32, 2689-2694.
- 140) RAJIC SAVIC, N., KATIC, V., VELEBIT, B. 2014. Characteristics of coagulase positive staphylococci isolated from milk in cases of subclinical mastitis. *Acta veterinaria*, 64, 115-123.
- 141) RAJIĆ SAVIĆ, N. 2014. *Fenotipske i genotipske karakteristike koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz vimena krava* Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.

- 142) RATAJAC, R. 2013. *Procena antimikrobnog i citotoksičnog potencijala etarskih ulja na endometrijum krava u uslovima in vitro*. Doktorska disertacija, Univerzitet u novom Sadu.
- 143) RATAJAC, R., STOJANOVIC, D., JEZDIMIROVIC, M., LAKO, B., ORLIC, D., STOJANOV, I. 2008. Osetljivost Salmonella Enteritidis na odabrane aktivne sastojke etericnih ulja u uslovima in vitro. *Arhiv veterinarske medicine*, 1, 52-58.
- 144) RAZA, A., MUHAMMAD, G., SHARIF, S., ATTA, A. 2013. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: A Review. *Molecular microbiology research*, 3, 1-8.
- 145) RODRIGUES, L. B., SANTOS, L. R. D., TAGLIARI, V. Z., RIZZO, N. N., TRENHAGO, G., OLIVEIRA, A. P. D., GOETZ, F., NASCIMENTO, V. P. D. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by Listeria, Escherichia coli and *Staphylococcus Aureus* Isolated From A Poultry Slaughterhouse. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 1082-1085.
- 146) ROHANI, R., MORADI, S. M., MEHDIZADEH, M., SAEI-DEHKORDI, T., SIAVASH, S., GRIFFITHS, M. W. 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of Listeria monocytogenes. *LWT - Food science and technology*, 44, 2260-2265.
- 147) Rojas A.L., Hernandez R., Pereda-Miranda R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 1992; 35: 275-283
- 148) ROPKINS, K., FERGUSON, A., BECK, A. J. 2003. Development of hazard analysis by critical control points (HACCP) procedures to control organic chemical hazards in the agricultural production of raw food commodities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43, 287-316.
- 149) RUPP, C. J., FUX, C. A., STOODLEY, P. 2005. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Applied and environmental microbiology*, 71, 2175-2178.
- 150) SAISING, J., DUBE, L., ZIEBANDT, A. K., VORAVUTHIKUNCHAI, S. P., NEGA, M., GOTZ, F. 2012. Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56, 5804-5810.
- 151) SALLE, A. J. 1967. Bakterijske bolesti čoveka. *Osnovni principi bakteriologije*. Beograd-Zagreb: Mladinska Knjiga.
- 152) SASAKI, T., KIKUCHI, K., TANAKA, Y., TAKAHASHI, N., KAMATA, S., HIRAMATSU, K. 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of clinical microbiology*, 45, 2770-2778.
- 153) SASAKI, T., TSUBAKISHITA, S., TANAKA, Y., SAKUSABE, A., OHTSUKA, M., HIROTAKI, S., KAWAKAMI, T., FUKATA, T., HIRAMATSU, K. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of clinical microbiology*, 48, 765-769.
- 154) SAVIĆ RADOVANOVIĆ, R. R. 2015. *Procena rizika od nalaza enterotoksina stafilokoka u mekim sirevima*. doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu Fakultet veterinarske medicine
- 155) SCALI, F., CAMUSSONE, C., CALVINHO, L. F., CIPOLLA, M., ZECCONI, A. 2015. Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Research in veterinary science*, 100, 88-99.
- 156) SCHWARZ, S., ROBERTS, M. C., WERCKENTHIN, C., PANG, Y., LANGE, C. 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Veterinary microbiology*, 63, 217-227.
- 157) SEED, G. 2016. *Organsko mleko* [Online]. Global Seed, Čurug. Available: <http://www.globalseed.info/o-nama.php> [Accessed 28.02.2016. 2016].

- 158) SIKKEMA, J., DE BONT, J. A., POOLMAN, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of biological chemistry*, 269, 8022-8028.
- 159) SILVA, N. C., GUIMARAES, F. F., MANZI, M. P., JUNIOR, A. F., GOMEZ-SANZ, E., GOMEZ, P., LANGONI, H., RALL, V. L., TORRES, C. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. *Letters in applied microbiology*, 59, 665-669.
- 160) SLAMENOVA, D., HORVATHOVA, E., WSOLOVA, L., SRAMKOVA, M., NAVAROVA, J. 2009. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation research*, 677, 46-52.
- 161) SLUŽBENI GLASNIK REPUBLIKE SRBIJE BROJ 30/10 107/12 Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima. 30/2010 107/2012. Službeni glasnik Republike Srbije.
- 162) SLUŽBENI GLASNIK REPUBLIKE SRBIJE BROJ 30/10 Zakon o organskoj proizvodnji. Beograd.
- 163) SLUŽBENI GLASNIK REPUBLIKE SRBIJE BROJ 24/11 Pravilnik o utvrđivanju Programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2011. godinu. Beograd
- 164) SLUŽBENI GLASNIK REPUBLIKE SRBIJE BROJ 48/11 Pravilnik o kontroli i sertifikaciji u organskoj proizvodnji i metodama organske proizvodnje. Beograd.
- 165) SMELTZER, M. S., BEENKEN, K. E. 2013. *Staphylococcus*. In: MCVEY, D. S., KENNEDY, M., CHENGAPPA, M. M. (eds.) *Veterinary microbiology*. 3 ed. Ames, Iowa, US: Blackwell Publishi.
- 166) SOKOVIC, M., GLAMOCLIIJA, J., MARIN, P. D., BRKIC, D., VAN GRIENSVEN, L. J. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15, 7532-7546.
- 167) SOMMERHÄUSER, J., KLOPPERT, B., WOLTER, W., ZSCHÖCK, M., SOBIRAJ, A., FAILING, K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary microbiology*, 96, 91-102.
- 168) STEPANOVIC, S., CIRKOVIC, I., RANIN, L., SVABIC-VLAHOVIC, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters of applied microbiology*, 38, 428-432.
- 169) STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-VLAHOVIC, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40, 175-179.
- 170) STEWART, E. J., GANESAN, M., YOUNGER, J. G., SOLOMON, M. J. 2015. Artificial biofilms establish the role of matrix interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly. *Scientific reports*, 5, 13081.
- 171) SUTHERLAND, I. W. 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9, 222-227.
- 172) SZWEDA, P., SCHIELMANN, M., MILEWSKI, S., FRANKOWSKA, A., JAKUBCZAK, A. 2012. Biofilm Production and presence of ica and bap Genes in *Staphylococcus aureus*. *Polish journal of microbiology*, 61, 65-69.
- 173) TEUBER, M. 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and molecular life sciences (CMLS)*, 56, 755-763.
- 174) THORMAR, H., ASTANI, A., BERGSSON, G., BRATT, C. L., BROGDEN, K. A., CARSON, C. F., DAWSON, D. V., DRAKE, D., HAMMER, K. A., HILMARSSON, H., ISAACS, C. E., KRISTMUNSDOTTIR, T., QUINN, P. J., REICHLING, J., SCHNITZLER, P., SKULASON, S., WERTZ, P. 2011. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*, New Delhi, India., John Wiley, Sons, Ltd.
- 175) THRUSFIELD, M. 2007. *Veterinary epidemiology*, Oxford, UK, Blackwell Science

- 176) TIEZZI, F., PARKER-GADDIS, K. L., COLE, J. B., CLAY, J. S., MALTECCA, C. 2015. A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS One*, 10, e0114919.
- 177) TRAILOVIC, S. M., MARJANOVIC, D. S., NEDELJKOVIC TRAILOVIC, J., ROBERTSON, A. P., MARTIN, R. J. 2015. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitology research*, 114, 3059-3068.
- 178) TSE, H., CHAN, E., LAM, C. W., LEUNG, K. F., CHOW, P., LEE, K. C., SZE, K. H., CHEUNG, S. K., TSE, M. K., HO, P. L., LEUNG, S. P., LAU, S. K., WOO, P. C., YUEN, K. Y. 2012. Production of 2-aminophenoxazin-3-one by *Staphylococcus aureus* causes false-positive results in beta-galactosidase assays. *Journal of clinical microbiology*, 50, 3780-3782.
- 179) TURKEZ, H., AYDIN, E. 2013. Investigation of cytotoxic, genotoxic and oxidative properties of carvacrol in human blood cells. *Toxicology and industrial Health*.
- 180) TURLEJ, A., HRYNIEWICZ, W., EMPEL, J. 2011. Staphylococcal cassette chromosome mec (Scmec) classification and typing methods: an overview. *Polish journal of microbiology*, 60, 95-103.
- 181) TURUTOGLU, H., ERCELIK, S., OZTURK, A. 2006. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *The Bulletin of the veterinary institute in Pulawy*, 41-45.
- 182) TURUTOGLU, H., HASOKSUZ, M., OZTURK, D., YILDIRIM, M., SAGNAK, S. 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their mecA genes. *Veterinary research communications*, 33, 945-956.
- 183) ULTEE, A., KETS, E. P., SMID, E. J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65, 4606-4610.
- 184) VAKANJAC, S., PAVLOVIĆ, M., PAVLOVIĆ, V. 2010. Testing the efficiency of different treatments of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in cows during the dry period. *Acta veterinaria*, 60, 227-239.
- 185) VAKANJAC, S., PAVLOVIĆ, M., PAVLOVIĆ, V., OBRENOVIĆ, S. 2008. Immunoprophylaxis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. *Acta veterinaria*, 58, 221-230.
- 186) VAN DER ZEE, A., HENDRIKS, W. D., ROORDA, L., OSSEWAARDE, J. M., BUITENWERF, J. 2013. Review of a major epidemic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the costs of screening and consequences of outbreak management. *American journal of infection control*, 41, 204-209.
- 187) VAN DUIJKEREN, E., BOX, A. T., HECK, M. E., WANNET, W. J., FLUIT, A. C. 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Veterinary microbiology*, 103, 91-97.
- 188) VANDERHAEGHEN, W., CERPENTIER, T., ADRIAENSEN, C., VICCA, J., HERMANS, K., BUTAYE, P. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary microbiology*, 144, 166-171.
- 189) VASUDEVAN, P., NAIR, M. K. M., ANNAMALAI, T., VENKITANARAYANAN, K. S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 179-185.
- 190) VERMA, P. 2007. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis in antimicrobial susceptibility testing protocols *In*: SCHWALBE, R., STEELE-MOORE,

- L., GOODWIN, A. C. (eds.) *Antimicrobial susceptibility testing protocols* Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- 191) VUCINIC, M., NEDELJKOVIC-TRAILOVIC, J., TRAILOVIC, S., IVANOVIC, S., MILOVANOVIC, M., KRnjaIC, D. 2012. Possibility for use essential oils in veterinary medicine and animal husbandry with special emphasis on oregano oil. *Veterinarski glasnik*, 66, 407-416.
 - 192) WATSON, D. L., DAVIES, H. I. 1993. Influence of adjuvants on the immune response of sheep to a novel *Staphylococcus aureus* vaccine. *Veterinary microbiology*, 34, 139-153.
 - 193) WERNER, E., ROE, F., BUGNICOURT, A., FRANKLIN, M. J., HEYDORN, A., MOLIN, S., PITTS, B., STEWART, P. S. 2004. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 70, 6188-6196.
 - 194) WILSON, S., HAMILTON, M. A., HAMILTON, G. C., SCHUMANN, M. R., STOODLEY, P. 2004. Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 70, 5847-5852.
 - 195) XU, M., PING, F. Q., CHEN, S. Y., LAI, S. J., LIU, Y. P. 2008. Study on the relationships between polymorphisms of CXCR2 gene and milk quality and mastitis of dairy cow. *Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, 30, 463-468.
 - 196) YAP, P. S., YIAP, B. C., PING, H. C., LIM, S. H. 2014. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The open microbiology journal*, 8, 6-14.
 - 197) YOSSA, N., PATEL, J., MACARISIN, D., MILLNER, P., MURPH, C. 2012. Antibacterial activity of cinnamaldehyde and sporan against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *Publications from USDA-ARS /UNL*.
 - 198) ZAGO, C. E., SILVA, S., SANITA, P. V., BARBUGLI, P. A., DIAS, C. M., LORDELLO, V. B., VERGANI, C. E. 2015. Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*, 10, 1-15.
 - 199) ZECCONI, A. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis what we need to control it. *Israel journal of veterinary medicine*, 65, 93-99.
 - 200) ZECCONI, A., CESARIS, L., LIANDRIS, E., DAPRA, V., PICCININI, R. 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial pathogenesis*, 40, 177-183.
 - 201) ZHANG, W., SILEIKA, T., PACKMAN, A. I. 2013. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. *FEMS microbiology ecology*, 84, 344-354.
 - 202) ZUTIC, M. 2012. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples from Serbian cows with subclinical mastitis. *African journal of microbiology research*, 6.

9. OBAVEZNI PRILOZI

9.1. Biografija autora

Nemanja Zdravković je završio osnovnu školu i gimnaziju u Smederevskoj Palanci. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu upisuje 2004. godine i završava isti 28.06.2010. godine sa srednjom ocenom 9,22 stičući zvanje doktora veterinarske medicine odbranom diplomskog rada: „Invaginacija creva – etiologija i terapija“. Doktorske akademske studije je upisao 2010.godine i položio planom i programom predviđene ispite sa čnom ocenom 9,22.

Kandidat Nemanja Zdravković je tokom studiranja bio korisnik stipendije Ministarstva prosvete Republike Srbije 2005/2006. godine, a od 2006/2007. godine pa do završetka školovanja stipendije Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Republike Srbije i stipendije „Coca-cola talenti“.

Od 2011. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik na Katedri za mikrobiologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživača saradnika izabran je u martu 2014.godine.

U dosadašnjem radu u Laboratoriji za bakteriologiju i mikologiju Katedre za mikrobiologiju kandidat Nemanja Zdravković se posvetio projektnim zadacima ispitivanja rezistencije bakterija prema antimikrobnim supstancama, kao i svakodnevnom sticanju znanja u izolaciji i identifikaciji infektivnih agenasa.

U toku novembra 2013. godine kandidat je boravio na Univerzitetu Ludvig – Maksimilijan u Minhenu u Nemačkoj gde je savladao tehnike izvođenja klasične PCR i real-time PCR metode i upoznao se sa metodama sekvencioniranja genoma mikroorganizama.

Kandidat Nemanja Zdravković na početku svoje naučno istraživačke karijere je objavio ili prezentovao radove u zemlji i inostranstvu, radova uključujući i jedan rad iz kategorije M22 i dva rada iz kategorije M23.

Prilog 1.

9.2. Izjava o autorstvu

Potpisani-a Nemanja Zdravković

broj upisa 15/19

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 2.

9.3. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora ____Nemanja Zdravković_____

Broj upisa _15/19_____

Studijski program _Doktorske akademske studije_____

Naslov rada __Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava_____

Mentor _Prof. Dr Dejan Krnjaić_____

Potpisani _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 3.

9.4. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.