**Veterinarski fakultet**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Karla Milošević**

**Mihael Galović**

Primjena propolisa u tretmanu mastitisa kod mliječnih krava

**Zagreb, 2017.**

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Jelene Šuran te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017. Rad je izrađen u sklopu projekta „Intramamarna formulacija propolisa za prevenciju i tretman mastitisa kod mliječnih preživača (RC.2.2.08-0003)“, STRIP projekti, Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije.

**Popis kratica**

BSS - broj somatskih stanica

DAD – detektor s diodnim nizom (engl.  *diode array detector*)

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European medicines agency*)

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

MIK – minimalna inhibicijska koncentracija

MIK50 – minimalna inhibicijska koncentracija na 50% testiranih sojeva

MIK90 – minimalna inhibicijska koncentracija na 90% testiranih sojeva

TLR - Toll-like receptori

VMP - veterinarsko-medicinski proizvod

**Sadržaj**

Uvod...........................................................................................................................................1

Hipoteza......................................................................................................................................3

Opći i specifični ciljevi rada.......................................................................................................3

Materijali i metode...................................................................................................................3

Rezultati...................................................................................................................................6

Rasprava .................................................................................................................................10

Zaključak.................................................................................................................................12

Zahvale...................................................................................................................................13

Popis literature........................................................................................................................14

Sažetak...................................................................................................................................16

Summary.................................................................................................................................17

**Uvod**

Upala mliječne žlijezde ili mastitis, najčešći je zdravstveni problem zbog kojeg se u stočarstvu prekomjerno koriste antibiotici. Osobitu važnost ima u visokoproizvodnim mliječnim stadima gdje uzrokuje značajne ekonomske gubitke na farmama i u cjelokupnoj mliječnoj industriji (ERSKINE i sur., 2003.; MCDOUGALL i sur., 2009.; NIELSEN i sur., 2010.).

Stupanj izloženosti infekciji, prirodna otpornost pojedine životinje, dob, stadij laktacije te produljeno trajanje mužnje, čimbenici su koji utječu na pojavnost infekcije vimena. Strojna mužnja, osobito ona dugotrajna te primjena korištenih ili loše dizajniranih muznih čašica, povećava stopu pojavnosti mastitisa u zaraženim četvrtima vimena (BAČIĆ, 2009.). Liječenje i kontrola mastitisa uključuje primjenu intramamarnih antibiotskih pripravaka tijekom laktacije ili za vrijeme suhog razdoblja (BAČIĆ, 2009.; ERSKINE i sur., 2003.; MCDOUGALL i sur., 2009.). Međutim, ta primjena često ne daje zadovoljavajuće rezultate, a kada je riječ o subkliničkom obliku bolesti ona često predstavlja veći trošak nego korist (SANDGREN, 2008.).

Uzrokujući velike gubitke na farmama, subklinički mastitis je glavna bolest današnjih mliječnih stada, a u nekom stadu ga može biti od 2 do 20 puta više nego kliničkog mastitisa (BAČIĆ, 2009.) Otkrivanje subkliničkog mastitisa je teško jer klinički znakovi nisu vidljivi pa se u dijagnostici koriste broj somatskih stannica (BSS) i prisutnost bakterijskih uzročnika u mlijeku (BAČIĆ, 2009.; RUEGG, 2009.). Subklinički mastitis često ostaje neotkriven i dovodi do velikih ekonomskih gubitaka zbog dugoročnih učinaka na prinose mlijeka (RUEGG, 2013.). Broj somatskih stanica (BSS) važan je pokazatelj upravljanja mliječnim stadima i omogućava praćenje, kako zdravlja vimena, tako i subkliničkog mastitisa te eliminaciju kroničnog mastitisa (BAČIĆ, 2009.; RUEGG, 2013.). Najveći dio tih stanica čine leukociti (BAČIĆ, 2009.). Četvrt kod koje BSS prelazi 200.000 stanica/ml smatra se inficiranom ili u oporavku od infekcije (BAČIĆ, 2009.).

Neki od najčešćih mikroorganizama koji uzrokuju subklinički mastitis su gram-pozitivne bakterije, streptokoki iz okoliša ili kontagiozni stafilokoki. *Streptococcus uberis* je okolišni mikroorganizam koji se obično nalazi u gnojivima i stelji. To je gram-pozitivna bakterija sa staničnom stijenkom strukturno sličnom *Staphylococcus* spp. *S. uberis* je najčešće izolirana vrsta *Streptococcus* spp. u slučajevima mastitisa. Loša čistoća vimena, neadekvatno upravljanje stadom i korištenje oštećenih muznih čašica povećavaju rizik širenja *S. uberis* na neinficirane krave. Kontrola *S. uberis* uključuje održavanje čistog i suhog stambenog prostora i primjenu odgovarajućih postupaka mužnje. Najveći rizik za infekciju sa *S. uberis* je zabilježen tijekom ranog sušnog razdoblja, zato je smanjenje kontakta sa *S. uberis* posebno važno u tom razdoblju (BAČIĆ, 2009.).

Antimikrobna terapija usmjerena na liječnje subkliničkog mastitisa izazvanog sa *S. uberis* najčešće nije zadovoljavajuća, odnosno, kratkoročno je sa agresivnim režimom doziranja intramamarnim antibioticima moguće postići značajno bakteriološko izlječenje, ali ono ne daje dugoročnu korist u vidu smanjenja učestalosti novih infekcija, očuvane proizvodnje mlijeka i preživljenja životinja (SANDGREN i sur., 2008.). Produžena terapija antibioticima koja dovodi do bakterijskog izlječenja problematična je zbog pojave rezidua antibiotika u mlijeku tijekom duljeg vremena, tj. zbog produžene karencije. Karencija intramamarnih pripravaka podrazumjeva propisano vrijeme čekanja od posljednje primjene veterinarsko-medicinskog proizvoda (VMP) do stavljanja mlijeka na tržište. Kod intramamarnih pripravaka registriranih za primjenu u vrijeme laktacije ta karencija najčešće traje od 5 do 7 dana. Dok to vrijeme ne prođe, mlijeko se ne smije ni u kakvom obliku korisiti za prehranu ljudi i životinja. Karencija je glavni razlog zbog kojeg se uglavnom ne pristupa liječenju subkliničkog mastitisa. Međutim, ukoliko se subklinički mastitis prepusti slučaju, velika je vjerojatnost prelaska u klinički, agresivniji oblik i još veće gubitke u proizvodnji (RUEGG, 2009.). Osim toga, prekomjerna upotreba antibiotika u stočarstvu doprinosi razvoju rezistencije na antibiotike, najvećoj globalnoj prijetnji za zdravlje ljudi i životinja. Upravo su problemi sa neučinkovitošću i povećanjem broja rezistentnih bakterija u stočarstvu stimulirali istraživanja novih strategija za kontrolu mastitisa (VARELLA COELHO i sur., 2007.; WU i sur., 2007.).

Učinkovit i siguran intramamarni pripravak koji bi se mogao koristiti u liječenju subkliničkog mastitisa, a za koji nema propisane karencije predstavljao bi značajnu inovaciju u veterinarskoj medicini. Prirodne tvari već dokazanog antimikrobnog učinka, a za koje prema Europskoj agenciji za lijekove (EMA, 2017.a) nije potrebno određivati najveću dopuštenu količinu rezidua u mlijeku i karenciju, vrlo su zanimljivi kandidati za intramamarne VMP.

Jedna od takvih tvari je propolis. Propolis je zapravo mješavina velikog broja tvari biljnog porijekla i sline medonosne pčele (*Apis mellifera*). Ovaj pčelinji proizvod je smeđe – zelene boje i smolaste konzistencije. Korišten je u narodnoj medicini za liječenje infekcija (SANTOS i sur., 2002.). Kemijski sastav, boja i aroma varira od žućkasto – zelene do tamno smeđe, ovisno o izvoru i dobi (GHISALBERTI, 1979.). Propolis pokazuje antibakterijsko i protuupalno djelovanje (BOSIO i sur., 2000.) te je kao takav vrlo snažan prirodni antibiotik (MIORIN i sur., 2003.) i izrazito je koristan u borbi protiv infekcija gornjih dišnih puteva (FOCHT i sur., 1993.). Sastavljen je od 50% balzama i smole, 30% pčelinjeg voska, 5% peludi, 10% eteričnih ulja i 5% ostalih organskih komponenata (SHIMIZU i sur., 2004.). Glavne bioaktivne komponente propolisa su aromatske kiseline, esteri i flavonoidi (BANKOVA i sur., 1992.; 2005a, b). Sadrži mnogo različitih moćnih polifenola koji pojačavaju antibakterijsku aktivnost farmaceutskih antibiotika, uključujući i streptomicin (QIAO i CHEN, 1991.). Dokumentirana je vrlo dobra antimikrobna aktivnost propolisa na različite bakterije (SFORCIN i sur., 2000.), gljivice (SFORCIN i sur., 2001.), viruse (GEKKER i sur., 2005.) i parazite (FREITAS i sur., 2006.), pa i na uobičajene uzročnike mastitisa kod krava (FIORDALISI i sur., 2016.; SANTANA i sur., 2012.). Mehanizam antimikrobnog djelovanja propolisa vrlo je složen, a može se pripisati sinergističkom djelovanju fenolnih spojeva i drugih tvari prisutnih u propolisu (BANKOVA i sur., 2011.) te raznim mehanizmima djelovanja poput inhibicije bakterijskih RNK polimeraza i restrikcijskih endonukleaza (SIMUTH i sur., 1986.). Do sada nije zabilježena rezistencija bakterija na propolis, a njen razvoj se smatra malo vjerojatnim jer je riječ o multikomponentnoj mješavini složenog mehanizma djelovanja.

*In vitro,* propolis djeluje direktno na mikroorganizam, dok u *in vivo* uvjetima djeluje putem stimulacije imunološkog sustava aktivacijom mehanizama koji ubijaju mikroorganizam (SFORCIN i BANKOVA, 2011.). Zbog navedenog, *in vitro* postupci su korisni za pripremu istraživanja mogućeg potencijala prirodnog proizvoda, te ukoliko oni pokažu pozitivan rezultat, daljnji se postupci usmjeravaju na *in vivo* istraživanja koja bi trebala polučiti klinički značajne rezultate (HEINRICH i sur., 2008.). Na taj način se pristupilo razvoju i istraživanju inovativne intramamarne bezalkoholne otopine propolisa koja bi se koristila u liječenju subkliničkih mastitisa goveda.

**Hipoteza**

Inovativna bezalkoholna otopina propolisa siguran je i učinkovit pripravak kojim se može liječiti subklinički mastitis goveda.

**Opći i specifični ciljevi rada**

Opći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sigurnost i učinkovitost 1% i 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa u liječenju subkliničkog mastitisa krava.

Specifični ciljevi bili su:

1. Analizirati sastav bezalkoholne otopine propolisa kako bi se preliminarno utvrdila koncentracija 8 biomarkera propolisa, a u svrhu razvoja standardizirane otopine.
2. Odrediti osjetljivost uobičajenih uzročnika subkliničkog mastitisa na bezalkoholnu otopinu propolisa, na sojevima bakterija iz arhive i izoliranima iz sekreta vimena krava u pokusu.
3. Odrediti podnošljivost bezalkoholne otopine propolisa nakon intramamarne aplikacije kravama.
4. Odrediti učinkovitost, odnosno bakteriološko izlječenje nakon i.mam. primjene bezalkoholne otopine propolisa kod subkliničkog mastitisa kod krava.

**Materijali i metode**

1. *Izrada i analiza bezalkoholne otopine propolisa*

*Bezalkoholna otopina propolisa*

Propolis je usitnjen i otopljen u bezalkoholnom otapalu u koncentraciji od 1, 3 i 5%. Metoda ekstrakcije je u vlasništvu tvrtke Hedera d.o.o. (Split).

*Analiza bezalkoholne otopine propolisa*

Uzorak 5%-tne bezalkoholne otopine propolisa za analizu se pripremao metodom mikrovalne ekstrakcije prema prethodno opisanom postupku (PELLATI i sur,, 2013.). Analiza sastava se provela na Zavodu za prehranu i dijetetiku domaćih životinja Veterinarskog fakulteta metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-Vis detektorom (Shimadzu, Kyoto, Japan) kako bi se ustanovila zastupljenost polifenola i ostalih biomarkera u otopini (PELLATI i sur., 2013.). Korištena je kolona Ascentis Express C18 (Supelco, SAD), dimenzija 15 cm x 3 mm i čestica punjenja promjera 2,7 µm. Baš kao i u metodi za HPLC-DAD opisanoj u radu PELLATI i sur. (2013.), mobilna faza se sastojala od 0,1% mravlje kiseline i acetonitrila, a udio acetnitrila se se mijenjao sa gradijentom; 0-3 min 20% acetonitrila, 3-10 min od 20 do 30 % acetonitrila, 10-40 min od 30 do 40%, 40-50 min od 40 do 60%, 50-60 min od 60 do 80%, 60-65 min od 80 do 50%. Protok mobilne faze bio je 0,25 ml/min. Temperatura kolone bila je 30 °C, a volumen injekcije 2 µl. Detekcija se odvojila na valnim duljinama u rasponu od 190 do 450 nm, i bila je 265 nm za krizin, 290 nm za cinamičnu kiselinu, 320 nm za kafeičnu, kumarinsku i feruličnu kiselinu, 338 za apigenin i 370 nm za kvercetin i kaempferol.

1. *In vitro istraživanje antimikrobne aktivnosti bezalkoholne otopine propolisa*

*In vitro* antimikrobna aktivnost propolisa testirana je agar-dilucijskim postupkom u skladu s općenitim preporukama CLSI-a. Bezalkoholna otopina propolisa je dodana u otopljenu hranjivu podlogu (Müller-Hinton ili Columbia agar) temperature 45°C te su pripremljena dvostruka serijska razrjeđenja. Inokulumi su pripremljeni suspendiranjem kolonija u 0,9% otopini NaCl-a. Podloge su inokulirane elektroničkom pipetom točkastim nanošenjem 2 µl suspenzije testiranog soja (104 CFU). Minimalne inhibicijske koncentracije su očitane nakon inkubacije od 24h pri 37°C na Müller-Hinton agaru (stafilokoki, *E. coli* i *P. aeruginosa*). MIK-ovi za izolate vrsta *Treuperella pyogenes* i *Streptococcus* spp. očitani su nakon inkubacije od 48 h pri at 37°C na Columbia agaru (inkubacija u atmosferi s 5% CO2). *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 korišteni su kao kontrolni sojevi.

Testirani sojevi porijeklom su iz sekreta vimena krava s mastitisom uključenih u projektno istraživanje te pojedini sojevi odabrani i zbirke duboko smrznutih sojeva Veterinarskog fakulteta i HVI-a.

1. *Kliničko istraživanje sigurnosti i učinkovitosti bezalkoholne otopine propolisa*

*Životinje*

Istraživanje je provedeno na pet farmi mliječnih goveda pasmine Holstein: Grube d.o.o. (Đakovo), AGRO BOVIS d.o.o. (Đakovo), PG Điđo (Đakovo), SNK - MILK (Đakovo) i Krndija d.o.o. (u vlasništvu tvrtke Žito d.o.o., Osijek). U istraživanje je uključeno 86 mliječnih krava, odnosno 339 četvrti (četvrt vimena je korištena kao statistička jedinica). Životinje su držane slobodno na dubokoj stelji, a hranjene su standardnom smjesom za muzne krave bez dodatka antibiotika. Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu.

U studiju su uključene životinje, odnosno četvrti bez kliničkih simtpoma mastitisa, dakle zdrave, neinficirane četvrti, sa BSS ispod 200.000/ml te inficirane četvrti sa brojem BSS većim od 200.000/ml.

*Pokusni protokol*

Provedena je randomizirana ukrižena (engl. *crossover*) klinička studija sigurnosti i učinkovitosti primjene i.mam. otopine propolisa na kravama u terenskim uvjetima (ENGSTROM i sur., 2010.). Paralelno su praćena podnošljivost i bakteriološko izlječenje četvrti nakon i.mam. aplikacije 1 i 3%-tne otopine propolisa (Slika 1.), a četvrti su naknadno razvrstavane u skupine ovisno o vrijednostima BSS i rezultatima bakteriološkog nalaza prije aplikacije.



Slika 1. Intramamarna aplikacija bezalkoholne otopine propolisa

*Testiranje podnošljivosti otopine propolisa*

Otopine propolisa (1 i 3%) aplicirane su trokratno u sve četiri četvrti vimena krava: prije jutarnje mužnje, prije večernje mužnje te sljedeći dan prije jutarnje mužnje. Pratile su se promjene u ponašanju krava te u makroskopskom izgledu vimena (oteklina i crvenilo) i mlijeka, kao i osjetljivost vimena na dodir (EMA, 1992.). Bilježila se promjena BSS u mlijeku (EMA, 1992.) od perioda prije prve i.mam. aplikacije otopine propolisa, pa sve do 7. dana od te prve aplikacije. Uzorci mlijeka, tj. četvrti su grupirane ovisno o tome je li u njima BSS bio viši ili niži od 200.000/ml te jesu li uzorci bili pozitivni ili negativni na bakteriološkoj pretrazi.

*Testiranje učinkovitosti (bakteriološkog izlječenja) otopine propolisa*

Prema smjernicama Europske agencije za lijekove (EMA, 2017.b), kao jedina mjera učinkovitosti i.mam. pripravaka u liječenju subkliničkog mastitisa uzima se bakteriološko izlječenje. Ono je definirano kao izostanak prethodno dokazanog uzročnika u uzorku mlijeka prikupljenom u određenom vremenskom periodu nakon aplikacije i.mam. pripravka (EMA, 2017.b).

*Uzorkovanje mlijeka*

Uzorci su uzeti prije prve aplikacije propolisa, 12 h nakon prve aplikacije propolisa, 12 h nakon druge aplikacije propolisa (2. dan) te 5. i 7. dan nakon prve aplikacije propolisa. Uzorke mlijeka iz svake pojedinačne četvrti uzimali smo u prethodno označene sterilne plastične epruvete tako da su nakon izmuzivanja prvih nekoliko mlazova mlijeka vrhovi sisa temeljito dezinficirani vatom namočenom 70%-tnim alkoholom. Epruvetu smo prije samog uzimanja uzorka držali okrenutu dnom prema gore odnosno poklopcem prema podu i u tom položaju je otvarali. Poklopac smo otvorili svinutim malim prstom i dlanom lijeve ruke. Prilikom samog uzimanja uzorka sekreta vimena epruvetu smo držali u kosom položaju što više nagnutu vrhom prema vodoravnoj osi kako bismo što više spriječili moguće zagađenje sadržaja stajskim zrakom. S jednim ili dva mlaza namuzli smo u epruvetu oko 10 ml sekreta vimena. Uzorci mlijeka su transportirani na ledu i držani su na 4°C do sljedećeg dana kada su analizirani u Laboratoriju za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka pri Hrvatskom veterinarskom institutu.

*Mastitis test*

Svaki uzorak testirali smo Zagrebačkim mastitis reagensom. Mastitis reagens, kao vodena otopina površinski aktivne tvari i indikatora pH, izaziva pucanje staničnih stijenki leukocita, čiji je broj povećan pri poremećenoj sekreciji mlijeka. Tom se prilikom iz leukocita oslobađa dezoksiribonukleinska kiselina koja se u toku reakcije polimerizira pri čemu nastaje gel čija je količina izravno razmjerna s brojem leukocita u mlijeku. Ovu reakciju prati i promjena pH vrijednosti na što upozorava promjena boje indikatora. Reakcijom se otkriva stupanj poremećenosti sekrecije na osnovi indirektnog dokazivanja broja somatskih stanica u sekretu mliječne žlijezde. S pomoću testatora, na kojem su ugrađene četiri plitice, odjednom se mogu ispitati sve četvrti vimena. Plitice su obilježene rimskim brojevima I, II, III i IV. Nakon što se izmuze mlijeko u određena udubljenja na plitici, nagibanjem testatora izlije se suvišno mlijeko i sadržaj mlijeka u pliticama količinski se izjednači (cca 2 ml). Mlijeku se tada dodaje otprilike jednaka količina reagensa (cca 2 ml) istiskivanjem iz plastične boce, a zatim se laganim kružnim pokretanjem testatora izaziva reakcija. Nastala reakcija približno odgovara označenom broju leukocita kao i pH vrijednosti pretraženog mlijeka. Mlijeko zdravog vimena ima u svim četvrtima (bilo u laktaciji ili suhostaju) istu pH reakciju. Preporučljivo je stoga testirati istovremeno sve četiri četvrti vimena, jer se tako mogu vrlo lako otkriti međusobne razlike u konzistenciji i boji mješavine što ovisi o broju somatskih stanica u mlijeku. Reakcija se procjenjuje prema graduiranoj skali opisanoj kod BAČIĆ (2009.).

*Broj somatskih stanica (BSS)*

Subklinički mastitis dijagnosticiran je na terenu mjerenjem broja somatskih stanica (BSS) u mlijeku na uređaju DeLaval (TetraLaval, Švedska) optičkim automatskim brojanjem somatskih stanica.

*Mikrobiološka pretraga*

Mikrobiološku pretragu proveli smo prema standardnim smjernicama (HOGAN, 1999.). Količina uzorka od 10 µl iz svake četvrti nacijepljena je sa mikrobiološkom jednokratnom ušicom (10 mm) na četvrtinu površine Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom eskulin-krvni agar. Tako pripremljene podloge su inkubirane 24 sata na + 37 ˚C, nakon čega je provedena kontrola porasta kolonija na površini hranjive podloge. Ostatak uzorka je čuvan u hladnjaku (4˚C) do kraja analize. Uzorci koji su mastitis testom reagirali pozitivno, a u kojima nije bilo porasta mikrobne kulture nakon 24-satne inkubacije, nacijepljeni su još jednom na polovicu površine Petrijeve zdjelice u količini od 100 µl, a kontrola porasta je obavljana u istim vremenskim razmacima. Nakon inkubiranja nacijepljene hranjive podloge provedena je determinacija poraslih bakterijskih kolonija prema morfološkim (oblik, veličinu i strukturu kolonija) i fiziološkim osobinama (stvaranja pigmenta, izazivanje CAMP fenomena, razgradnja eskulina, sposobnost zgrušavanja kunićje plazme, bojanje po Grammu).

*Determinacija streptokoka - CAMP test*

Na bakterijskim kolonijama koje su porasle na krvnom agaru s eskulinom, a morfološkim osobinama su odgovarale streptokokima proveo se CAMP test na slijedeći način. Na površinu hranjive podloge eskulin krvni agar nacijepljen je cijelim promjerom Petrijeve ploče i u obliku pruge beta-hemolitični soj bakterije *Staphylococcus aureus*. Izdvojeni sojevi streptokoka nacijepljeni su okomito na prugu na udaljenosti 6-12 mm. Petrijeve ploče s nacijepljenim bakterijama inkubirane su na 37 ˚C tijekom 24 sata, nakon čega je provedena prosudba porasta bakterija i determinacija streptokoka kako je navedeno u Tablici 1.

Tablica 1. Prosudba CAMP testa

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Boja kolonija na EK podlozi** | **Hemoliza** | **Boja kolonija na CAMP podlozi** | **Polumje-sečasta hemoliza** | **Bakterija** |
| Plavičasta | + ili - | Plavičasta | + | *Streptococcus agalactiae* |
| Plavičasta | + ili - | Plavičasta | - | *Streptococcus dysgalactiae* |
| Zelenkaste ili smeđe |  | Zelenkasta ili smeđa | + | *Streptococcus uberis* |
| Zelenkaste ili smeđe |  | Zelenkasta ili smeđa | - | Skupina D po Lancefieldovoj |

*Determinacija stafilokoka*

Kolonije porasle na krvnom agaru s eskulinom koje su morfološkim osobinama odgovarale stafilokokima precijepljene su na Baird Parker agar. Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata pri 37 ˚C provjerene su morfološke (sposobnost rasta te veličinu i oblik kolonija) i fiziološke osobine rasta stafilokoka (boju kolonija, prozirnost podloge oko poraslih kolonija) te sposobnost tvorbe koagulaze. U tu svrhu je u 0,5 ml sterilne kunićje plazme suspendirana puna mikrobiološka ušica kolonija poraslih na Baird Parker agaru. Pojava zgrušavanja ove suspenzije provjerena je nakon 4 i 24 sata inkubiranja pri 37 ˚C. Izdvojene sojeve koji su stvarali žućkasti pigment te izazvali zgrušavanje kunićje plazme proglašeni su vrstom *Staphylococcus aureus*. Sojevi koji nisu tvorili koagulazu svrstani su u skupinu koagulaza-negativnih stafilokoka (*Staphylococcus* spp.).

*Determinacija gram-negativnih uzročnika*

Bakterijske kolonije koje prema morfološkim osobinama odgovaraju gram-negativnim uzročnicima mastitisa precjepljuju se na podlogu s trostrukim šećerom (Triple Sugar Iron -TSI) te na McConkey agar. Nakon nacjepljivanja i inkubiranja na 37 ˚C u trajanju od 24 sata pristupa se prosudbi porasta. Na TSI agaru ocjenjuje se boja dna, boja kosine i prisutnost plina, a na McConkey agaru sposobnost rasta, boja i izgled kolonija.

*Poluatomatizirani sustav identifikacije Micronaut*

Svi izdvojeni uzročnici su identificirani pomoću sustava Micronaut. Ovaj identifikacijski sustav temelji se na spektrofotometrijskom mjerenju sposobnosti izdvojene bakterijske kulture da mijenja pojedine supstrate. Suspenzija izdvojene bakterije uzgojene u čistoj kulturi nacjepljuje se u jažice mikrotitracijske plitice s dodanim supstratima. Nakon inkubacije nacijepljenih mikrotitracijskih ploča, rezultat se očitava pomoću spektrofotometrijskog čitača. Očitane rezultate računalni program obrađuje i formira završno izvješće identifikacije. Inačica seta supstrata za gram-pozitivne uzročnike dolazi pod nazivom Micronaut RPO, dok se za identifikaciju gram-negativnih bakterija koristi inačica Micronaut E.

*Micronaut RPO*

Mikrotitracijske ploče koje služe za automatsku identifikaciju gram-pozitivnih bakterija. MICRONAUT-RPO je sustav identifikacije gram-pozitivnih vrsta bakterija pomoću standardnih biokemijskih reakcija. Provjeravaju se 44 biokemijske reakcije (peptidaze, glikozidaze/esteraze, dekarboksilaze i fermentacijske osobine).

*Micronaut-E*

Mikrotitracijske ploče koje služe za automatsku identifikaciju gram-negativnih bakterija. MICRONAUT-E je sustav identifikacije enterobakterija i drugih gram-negativnih vrsta bakterija pomoću standardnih biokemijskih reakcija. Provjerava se 21 biokemijska reakcija (kromogeni supstrati, dekarboksilaze, klasične reakcije i fermentacijske osobine).

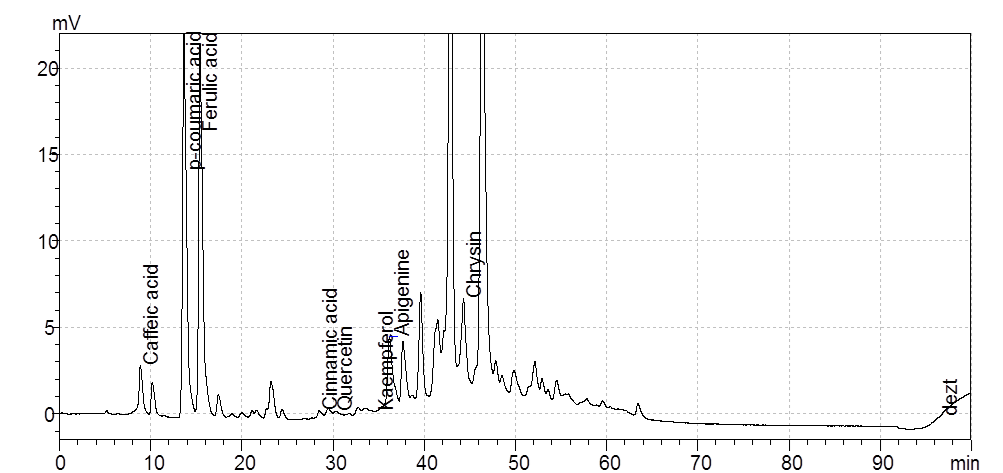
*Statistička analiza*

U statističkoj obradi posebno su grupirane četvrti čiji su rezultati mikrobiološke pretrage bili negativni na poznate uzročnike mastitisa (negativne četvrti), a posebno grupirane četvrti u kojima su mikrobiološkim analizama pronađeni neki od uzočnika mastitisa (pozitivne četvrti). Rezultati su obrađeni statistički korištenjem računalnog programa GraphPad Prism 6 i prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SV ± SD). Normalnost distribucije provjerena je  Shapiro-Wilks testom, a značajnost razlika ponovljenih mjerenja provjerena je Kruskall-Wallisovom analizom varijance ili jednosmjernom ANOVA-om. Razlike se smatraju statistički značajnim ako je P<0,05.

**Rezultati**

1. *Analiza bezalkoholne otopine propolisa HPLC-UV-Vis-om*

Na slici 2. je prikazan kromatogram bezalkoholne otopine propolisa. Na njemu su vidljivi pikovi 8 biomarkera propolisa: kafeične kiseline, p-kumarične kiseline, ferulične kiseline, cinamične kiseline, kvercetina, kaempferola, apigenina i krizina. Najzastupljenije su bile aromatske kiseline (p-kumarična i ferulična). U tablici 2. je vidljiv sastav 1 i 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa.



Slika 2. Reprezentativni kromatogram 8 spojeva utvrđenih u otopini propolisa na HPLC-UV-Visu.

Tablica 2. Sastav 1 i 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Biomarker | Koncentracija u 1% (µg/ml) | Koncentracija u 3% (µg/ml) |
| Kafeična kiselina | 6,19 | 18,57 |
| p-kumarinska kis. | 31,96 | 95,88 |
| Ferulična kiselina | 38,18 | 114,56 |
| Cinamična kiselina | 11,61 | 34,82 |
| Kvercetin | 1,96 | 5,89 |
| Kaempferol | 1,44 | 4,32 |
| Apigenin | 3,43 | 10,29 |
| Krizin | 20,58 | 61,75 |

1. *In vitro istraživanje antimikrobne aktivnosti bezalkoholne otopine propolisa*

U tablicama 3. i 4. su prikazane minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) bezalkoholne otopine propolisa. U tablici 4. vidljivi su MIK–ovi izmjereni testiranjem na sojevima izoliranima iz vimena tijekom terenskog kliničkog istraživanja.

Tablica 3. Minimalne inhibicijske koncentracije propolisa izmjerene testiranjem kontrolnih sojeva (agar – dilucijski postupak).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | *S. aureus*  ATCC 29213 | *S. epidermidis*  ATCC 12228 | *P. aeruginosa*  ATCC 27853 | *E. coli*  ATCC 25922 |
| MIK (µg/ml) | 32 | 32 | 10 000 | >10 000 |

Tablica 4. Minimalne inhibicijske koncentracije propolisa izmjerene agar – dilucijskim postupkom.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Testirani raspon  (µg/ml) | Određeni raspon MIK-ova (µg/ml) | MIK50  (µg/ml) | MIK90  (µg/ml) |
| *S. aureus* (n = 34) | 8 - 128 | 16 - 64 | 64 | 64 |
| *Staphylococcus* sp. (n = 20) | 8 - 128 | 32 - 64 | 32 | 64 |
| *S. uberis* (n=6) | 4 - 128 | 16 - 32 | 32 | 32 |
| *T. pyogenes* (n = 8) | 4 - 128 | ≤4 - 8 | 8 | 8 |
| *P. aeruginosa* (n = 15) | 250 - 10 000 | 500 -10 000 | >10 000 | >10 000 |
| *S. dysgalactiae* (n = 1) | 4 - 128 | 16 | - | - |
| *S. agalactiae* (n = 2) | 4 - 128 | 32 | - | - |

MIK50 – minimalna inhibicijska koncentracija na 50% testiranih sojeva, MIK90 – minimalna inhibicijska koncentracija na 90% testiranih sojeva

1. *Kliničko istraživanje sigurnosti i učinkovitosti bezalkoholne otopine propolisa*
   1. *Testiranje podnošljivosti*

Prilikom testiranja podnošljivosti bezalkoholnih 1 i 3%-tnih otopina propolisa kod niti jedne krave nisu uočene promjene u ponašanju te u makroskopskom izgledu vimena (oteklina i crvenilo) i mlijeka, kao niti osjetljivost vimena na dodir.

Slike 3.-6. su grafovi na kojima su prikazane srednje vrijednosti BSS-a nakon aplikacije 1%- tne i 3% - tne intramamarne otopine propolisa.

Na slici 3. su prikazane vrijednosti BSS-a kod četvrti koje su prije i.mam. aplikacije (0. dan) bile ispod 200.000/ml. Njihov broj raste nakon 1. (1. dan) i 2. aplikacije (2. dan), a vraća se blizu početnih vrijednosti već 5. dan od prve i.mam. aplikacije.



\*

\*

\* - statistički značajna razlika u odnosu na 0. dan (prije aplikacije)

Slika 3. Vrijednosti BSS-a nakon aplikacije 1%-tne bezalkoholne otopine propolisa, uz početni BSS <200.000/ml.

Na slici 4. su prikazane vrijednosti BSS-a kod četvrti koje su prije i.mam. aplikacije (0. dan) bile iznad 200.000/ml. Njihov je porast nešto blaži i značajan tek nakon 2. aplikacije (2. dan), a također se vraća blizu početnih vrijednosti već 5. dan od prve i.mam. aplikacije.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na 0. dan (prije aplikacije)

\*

Slika 4. Vrijednosti BSS-a nakon aplikacije 1%-tne bezalkoholne otopine propolisa, uz početni BSS <200.000/ml.

\* - statistički značajna razlika u odnosu na 0. dan (prije aplikacije)

Na slici 5. su prikazane vrijednosti BSS-a kod četvrti koje su prije i.mam. aplikacije (0. dan) bile ispod 200.000/ml. Njihov broj raste nakon 1. (1. dan) i 2. aplikacije (2. dan), te ostaje povišen i 7 dana nakon prve i.mam. aplikacije, ali razlika u odnosu na vrijednosti prije aplikacije nije značajna.



\*

\*

\* - statistički značajna razlika u odnosu na 0. dan (prije aplikacije)

Slika 5. Vrijednosti BSS-a nakon aplikacije 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa, uz početni BSS <200.000/ml.

Na slici 6. su prikazane vrijednosti BSS-a kod četvrti koje su prije i.mam. aplikacije (0. dan) bile iznad 200.000/ml. Njihov je porast nakon i.mam. aplikacije 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa nešto blaži i značajan tek nakon 2. aplikacije (2. dan), a također se vraća blizu početnih vrijednosti već 5. dan od prve i.mam. aplikacije. Vrijednosti BSS-a iz četvrti iz tzv. neinficiranih četvrti (prije i.mam. aplikacije otopine nije izdvojen niti jedan uzročnik) su bile niže od onih izmjerenih prije aplikacije, ali ta razlika nije bila statistički značajna.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na 0. dan (prije aplikacije)

\*

Slika 6. Vrijednosti BSS-a nakon aplikacije 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa, uz početni BSS <200.000/ml.

*3.2. Testiranje učinkovitosti 1 i 3% bezalkoholnih otopina propolisa - bakteriološko izlječenje*

U tablici 5. je prikazano bakteriološko izlječenje nakon primjene 1 i 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa za svakog uzročnika koji je identificiran u određenom broju četvrti prije prve i.mam. aplikacije.

Na slici 7. je grafički prikazana prevalencija subkliničkog mastitisa tijekom 7 dana, od razdoblja prije i.mam. primjene (0. dan), do 7. dana od prve i.mam. aplikacije bezalkoholne otopine propolisa. Prevalencija subkliničkog mastitisa izražena je postotcima (%), kao udio četvrti u kojima je 0. dana identificiran neki uzročnik u donosu na ukupan broj četvrti tretiranih odgovarajućom koncentracijom bezalkoholne otopine propolisa. Iz prikaza je vidljivo da prevalencija drastično opada prema kraju studije, kod četvrti tretiranih sa 1%-tnom otopinom propolisa pada od početnih 17,34% do 2,55%, a kod 3%-tne otopine pada od početnih 20,47% do 0%.

Što se tiče novih infekcija, tj. onih koje su se javljale nakon aplikacije otopine propolisa, od svih četvrti u koje je aplicirana 1%-tna otopina propolisa kod samo 10,2% je izdvojen neki novi uzročnik, a kod onih u koje je aplicirana 3%-tna otopina novi uzročnik je izdvojen iz samo 4,72%.

Tablica 5. Bakteriološko izlječenje nakon primjene 1 i 3%-tne bezalkoholne otopine propolisa.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Uzročnik | 1 % -tna otopina propolisa | | | 3% -tna otopina propolisa | | |
| Broj tretiranih poz. četvrti (N) | Broj bakt. izlječenih četvrti | % izlječenja | Broj tretiranih četvrti (N) | Broj bakt. izlječenih četvrti | % izlječenja |
| *Streptococcus uberis* | 22 | 19 | 86 | 9 | 9 | 100 |
| *Streptococcus spp.* | 4 | 4 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| *CNS* | 3 | 1 | 33 | 1 | 1 | 100 |
| *Enterococcus sp.* | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| *E. coli* | - | - | - | 3 | 3 | 100 |
| *Corynebacterium spp.* | 3 | 3 | 100 | 4 | 4 | 100 |
| *Pasteurella spp.* | - | - | - | 2 | 2 | 100 |
| *Citrobacter spp.* | - | - | - | 1 | 1 | 100 |
| *Serratia* |  |  |  | 1 | 1 | 100 |
| *Bacillus* |  |  |  | 1 | 1 | 100 |
| Ukupno | 34 | 29 | 85 | 26 | 26 | 100 |



Slika 7. Prevalencija subkliničkog mastitisa (%) tijekom 7 dana od i.mam. aplikacije 1 i 3%-tnih bezalkoholnih otopina propolisa.

**Rasprava**

Prvi korak u procesu istraživanja i razvoja novih veterinarsko - medicinskih proizvoda (VMP) njihova je standardizacija. Kada je riječ o prirodnim mješavinama poput propolisa, to je pravi izazov. Riječ je o sirovini sa više od 200 aktivnih spojeva, čiji sastav varira ovisnoj o geografskom području i dobu godine (SFORCIN i BANKOVA, 2011.). BANKOVA (2005.) predlaže da se standardizaciji propolisa pristupi drugačije, tako da se definira tip propolisa s obzirom na zastupljenost biljnih vrsta u njemu. U ovom istraživanju smo samo preliminarno odredili 8 osnovnih biomarkera, aromatskih kiselina i polifenola, kako bi postavili temelje za mnogo opsežniju, dugotrajniju standardizaciju koja bi podrazumijevala i provjeru odstupanja u sastavu ovih biomarkera ovisno o dobu godine. Drugi su autori pripravke propolisa standardizirali na sličan način, određujući koncentraciju po nekoliko biomarkera i antimikrobnu aktivnost (BERRETTA i sur., 2012.) ili samo razinu artepilina C, biomarkera karakterističnog za brazilski propolis (NOBUSHI i sur., 2012.). Budući da se propolis kao sirovina nabavlja uvijek od istih dobavljača iz Hrvatske, odstupanje u sastavu zbog geografskog područja bilo bi zanemarivo. Propolis iz Hrvatske pripada europskom, tzv. *poplar* tipu propolisa, što znači da je u njemu zastupljena smola topole (engl. *poplar* = topola). U odnosu na druge vrste propolisa, kao što su brazilski (*Baccharis*) ili kubanski, poplar propolis je bogat polifenolima flavanonima i flavonima te fenolnim kiselinama i njihovim esterima koji su odgovorni za antibakterijski i antioksidativni učinak (BANKOVA i sur., 2005.).

Iako sastav propolisa varira ovisno o geografskom podrijetlu, važno je istaknuti da su njegova antibakterijska, antimikotička i antivirusna svojstva vrlo konzistentna bez obzira na kemijski sastav (KUJUMGIEV i sur., 1999.). Farmakološka svojstva propolisa proizlaze iz složenih učinaka mješavine, a ne njenih pojedinih sastojaka. Ti se učinci potvrđuju u *in vitro*, a zatim i u *in vivo* modelima kako bi se mogao donijeti zaključak o medicinskoj opravdanosti primjene pripravaka propolisa.

*In vitro* antimikrobni učinak otopine propolisa bio je dobar, međutim u odnosu na antibiotike koji se standardno koriste u liječenju kliničkog mastitisa ili se u nekim slučajevima predlažu za liječenje subkliničkog mastitisa, taj je antimikrobni učinak relativno slab. Primjerice, dok vrijednosti MIK90 ceftiofurakod *S. aureus* iznose 1 µg/ml, a kod *S. uberis* 2 µg/ml (CORTINHAS i sur., 2013.), ove vrijednosti su za istraživani ekstrakt propolisa iznose 64 i 32 µg/ml. Međutim, poznato je da ljekoviti učinak propolisa potječe od sinergije antimikrobnih i imunomodulatornih učinaka (SFORCIN i BANKOVA, 2013.). Primjerice, dokazano je da propolis stimulira *Toll-like* receptore (TLR) na makrofazima u slezeni i jetri u uvjetima imunosupresije (ORSATTI i sur., 2010.) i akutnog stresa (PAGLIARONE i sur., 2009.) te da inhibira apoptozu makrofaga putem učinaka na glutation (GSH) i čimbenika nekroze tumora/nuklearnog čimbenika kappa B (TNF/NF-κB) (DALEPRANE i ADBALLA, 2013.). Osim toga, *in vitro* istraživanja antimikrobnih učinaka ne mogu predvidjeti djelovanje istraživane tvari na biofim koji se stvara *in vivo*, a koji npr. tvore uobičajeni gram-pozitivni uzročnici mastitisa u samoj mliječnoj cisterni te na taj način postaju rezistentni na terapiju. Propolis uništava kemijski i strukturni integritet biofilma sojeva *S. aureus* i *E. coli* rezistentnih na antibiotike, te se njegovo djelovanje na ove sojeve zaštićene biofilmom može usporediti sa kationskim antimikrobnim peptidima (BRYAN i sur., 2016.).

Mliječna žlijezda krava tkivo je koje je osjetljivo na aplikaciju bilo kakvih pripravaka, pa se stoga prilikom istraživanja svakog i.mam. pripravka mora prije svega odrediti podnošljivost, a ona podrazumijeva promjene u ponašanju krava, makroskopskom izgledu vimena, osjetljivošću vimena na dodir i porast u BSS-u (EMA, 1992.). U našem se istraživanju pokazalo da bezalkoholna otopina propolisa nakon 2. aplikacije značajno kod svih skupina krava diže BSS, što je očekivano, međutim taj broj se već nakon nekoliko dana vraća blizu vrijednosti kakve su bile prije aplikacije. Ostaje pitanje da li bi se nakon dužeg vremenskog perioda, od npr. 28 ili više dana, kod četvrti kod kojih je u samom početku BSS bio veći od 200.000/ml, taj broj smanjio još više, do normalnih vrijednosti.

Dugotrajni periodi praćenja BSS i bakteriološkog izlječenja, od 28 dana do 2 mjeseca, navedeni u smjernicama i kod raznih autora (SANDGREN, 2008.) često ne djeluju logično i relevantno za liječenje subkliničkog mastitisa, već proizvoljno, odnosno odabrano tako da potvrde sigurnost i učinkovitost pojedinih pripravaka za i.mam. primjenu.

Trokratnom (dvodnevnom) primjenom bezalkoholnih otopina propolisa je samo u 7 dana postignuto bakteriološko izlječenje u ukupno 92,53% inficiranih četvrti, odnosno u 85% četvrti nakon aplikacije 1%-tne otopine, te u 100% četvrti nakon aplikacije 3%-tne otopine propolisa. Za usporedbu, cefalosporinskim antibiotikom ceftiofurom se postiže 66% bakteriološkog izlječenja, ali samo nakon svakodnevne i.mam. terapije u trajanju od 8 dana, dok se nakon 5 dana svakodnevne aplikacije postiže izlječenje u samo 54% slučajeva (OLIVER i sur., 2004.). Kod subkliničkog mastitisa izazvanog sa *S. uberis* dvodnevna terapija pirlimicinom dovela je do izlječenja u 58,1% slučajeva, dok su terapije u trajanju od 5 i 8 dana dovele do izlječenja u 68,8 % i 80 % slučajeva (OLIVER i sur., 2003.). Nakon svakodnevne intramamarne aplikacije 0,3 g (300.00 I.J.) pentamat hidrojodida tijekom 5 dana, bakterijsko izlječenje je postignuto u 52% slučajeva i to 42 do 58 dana nakon posljednje aplikacije (SANDGREN i sur., 2008.). Samoizlječenje se kod subkliničkog mastitisa postiže u 11% slučajeva (OLIVER i sur., 2004.) ili 21% slučajeva (SANDGREN i sur., 2008.).

Najčešći uzročnik izdvojen iz četvrti bio je okolišni uzročnik mastitisa *S. uberis*. U proteklih 25 godina standardne mjere implementacije pet točaka značajno su smanjile prevalenciju mastitisa uzrokovanih kontagioznim uzročnicima, međutim ne i oblika uzorokovanih sa *S. uberis* (LEIGH, 1999.). 1%- tna otopina propolisa bila je učinkovita u 86% (19 od 22), a 3%-tna u 100% (9 od 9) slučajeva infekcije sa *S. uberis*. Za usporedbu, nakon intramamarne aplikacije pentamata hidrojodida postignuto je bakteriološko izlječenje u 68% četvrti Holstein krava inficiranih sa *S. uberis,* a da su bile u prvoj laktaciji, dok je kod četvrti u 2., 3. ili višoj laktaciji taj udio bio značajno niži (SANDGREN i sur., 2008.). Ceftiofur je nakon dvodnevne aplikacije bio učinkovit kod 17%, nakon petodnevne kod 56%, a nakon osmodnevne kod 67% slučajeva infekcije sa *S. uberis* (OLIVER i sur., 2004.).

Može se zaključiti da je antimikrobna učinkovitost bezalkoholne otopine propolisa u odnosu na antibiotike iz literature veća u *in vivo*, nego u *in vitro* uvjetima. Dakle, na propolis se ne može gledati kao na jednostavni antibiotik, već i kao na imunomodulator.

Imunomodulatorni učinci propolisa su usko povezani s antioksidativnim učincima, a oksidacijski stres je sastavni dio patogeneze mastitisa (ATAKISI i sur., 2010.; JÓŹWIK i sur., 2012.). Propolis ima snažan antioksidativni učinak, neutralizira H2O2 i ostale slobodne reaktivne kisikove spojeve u različitim stanicama (PASCUAL i sur., 1994.; SILVA-CARVALHO i sur., 2015.), a u odvojenom istraživanju intramamarne bezalkoholne otopine propolisa dokazan je antioksidativni učinak ekstrakta propolisa u mlijeku nakon intramamarne aplikacije (MAMIĆ, 2016.) pa se pretpostavlja da takav učinak ima i u samom tkivu mliječne žlijezde. Tako bi se mehanizam djelovanja ove bezalkoholne otopina propolisa kod subkliničkog mastitisa mogao objasniti sinergizmom antimikrobnih i antioksidativnih, iz kojih potom proizlaze imunomodulatorni učinci. Ovo je sasvim nov, i nedovoljno prepoznat pristup terapiji subkliničkog mastitisa, a mogao bi ju značajno unaprijediti. Već je ranije spomenuto da korištenje intramamarnih antibiotika u liječenju subkliničkog mastitisa daje polovične rezultate, a zbog cijene i propisane karencije predstavlja veliki trošak za uzgajivače. Intramamarni pripravak bez propisane karencije, koji nije antibiotik već primarno imunomodulator kojim bi se mogao uspješno liječiti subklinički mastitis, bio bi vrlo korisna inovacija u stočarstvu. Upotrebom takvog pripravka liječio bi se subklinički, a spriječavao klinički mastitis, te bi se na taj način smanjila upotreba intramamarnih antibiotika. Budući da je riječ o mješavini složenog sastava i mehanizma djelovanja, pretpostavka je da se na nju ni nakon dugotrajne primjene kod bakterija neće razviti rezistencija. Međutim, koncept prirodne mješavine odstupa od klasičnog farmaceutskog pristupa u regulativi VMP-a, te se postavlja pitanje na koji je način moguće registrirati ovakav pripravak kao VMP za liječenje subkliničkog mastitisa? Iako je riječ o sigurnom i učinkovitom pripravku te u javnosti postoji konsenzus regulatora i farmaceutskih tvrtki oko važnosti reduciranja primjene antibiotika, čini se da je taj konsenzus tek deklarativan, a regulativa po tom pitanju vrlo nefleksibilna. Kako bi se ovaj slučaj istraživane intramamrne bezalkoholne otopine propolisa pred regulatornim tijelima učvrstio potrebna su daljnja klinička istraživanja učinkovitosti na većem broju životinja te direktan dokaz imunomodulatornog učinka propolisa u mliječnoj žlijezdi krava. Jednom registrirana kao VMP, ova intramamarna formulacija propolisa će doprinijeti razvoju održivijeg, ekološkog stočarstva i sigurnijoj i ekonomičnoj proizvodnji mlijeka.

**Zaključci:**

1. Bezalkoholna intramamarna otopina propolisa sadrži 8 biomarkera koji se mogu koristiti u svrhu standardizacije: kafeičnu kiselinu, p-kumaričnu kiselinu, feruličnu kiselinu, cinamičnu kiselinu, kverceti, kaempferol, apigenin i krizin.
2. *In vitro* antimikrobni učinak otopine propolisa na uobičajene uzročnike mastitisa je dobar, međutim u odnosu na standardne antibiotike on je relativno slab.
3. Bezalkoholna otopina propolisa nakon 2. aplikacije očekivano diže BSS, a taj broj se već nakon nekoliko dana vraća blizu vrijednosti prije aplikacije.
4. Trokratnom (dvodnevnom) primjenom bezalkoholnih otopina propolisa je samo u 7 dana postignuto bakteriološko izlječenje u ukupno 92,53% inficiranih četvrti, odnosno u 85% četvrti nakon aplikacije 1%-tne otopine te u 100% četvrti nakon aplikacije 3%-tne otopine propolisa.
5. Antimikrobna učinkovitost bezalkoholne otopine propolisa u odnosu na antibiotike iz literature veća je u *in vivo*, nego u *in vitro* uvjetima. Dakle, na propolis se ne može gledati kao na jednostavni antibiotik, već i kao na imunomodulator, što potvrđuju prijašnja istraživanja antioksidativnih učinaka intramamarno primjenjene bezalkoholne otopine propolisa.

**Popis literature**

ATAKISI, O., H. ORAL, E. ATAKISI, O. MERHAN, S. METIN PANCARCI, A. OZCAN, S. MARASLI, B. POLAT, A. COLAK, S. KAYA (2010): Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. Res. Vet. Sci. 89, 10-13.

BAČIĆ, G. (2009): Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

BANKOVA, V. (1992): Immunomodulatory action of propolis: IV. Propholylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. Vaccine. 10, 817-823.

BANKOVA, V. (2005a): Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J. of Ethnopharmacol. 100, 114–117.

# BANKOVA, V. (2005b): Recent trends and important developments in propolis research. Evid. Based Complement Alternat. Med. 2, 29–32.

# BERRETTA, A. A., A. PIACEZZI NASCIMENTO, P. C. PIRES BUENO, M. M. VAZ, J. M. MARCHETTI (2012): Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. Int. J. Biol. Sci. 8, 512-521.

# BOSIO, K. C. AVANZINI, A. D'AVOLIO, O. OZINO, D. SAVOIA (2000): In vitro activity of propolis against *Staphylococcus pyogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 31, 174-177.

[BRYAN, J](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bryan%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=26643709)., P. REDDEN, C. TRABA (2016): The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 62, 192-198.

CORTINHAS, C. S., L. OLIVEIRA, C. A. HULLAND, M. V. SANTOS, P. L. RUEGG (2013): Minimum inhibitory concentrations of cephalosporin compounds and their active metabolites for selected mastitis pathogens. Am. J. Vet. Res. 74, 683-690.

DALEPRANE, J. B., D. S. ABDALLA (2013): Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. eCAM. http://dx.doi.org/10.1155/2013/175135

ENGSTROM, M., W. SANCHEZ, W. STONE, N. R. ST-PIERRE (2010): Applications of population data analysis in on-farm dairy trials. J. Anim. Sci. 88, E25–E31.

ERSKINE, R. J., S. WAGNER, F. J. DEGRAVES (2003): Mastitis therapy and pharmacology. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 19, 109–138.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (1992): Local Tolerance of Intramammary Preparations in Cows. Directive 81/852/EEC.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2017a): Substances considered as not falling within the scope of Regulation (EC) No. 470/20091, with regard to residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. EMA/CVMP/519714/2009–Rev.35

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2017b): Guideline on the conduct of efficacy studies for intramammary products for use in cattle. CVMP. EMA/CVMP/344/1999-Rev.2.

FIORDALISI, S. A. L., L. A. HONORATO, M. R. LOIKO, C. A. M. AVANCINI, M. B. R. VELEIRINHO, L. C. P. M. FILHO, S. KUHNEN (2016): The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. J. Dairy Sci. 99, 2308–2318.

FOCHT, J. (1993): Bactericidal effect of propolis in vitro agents causing upper respiratory tract infections. Arztneimttelforschung. 43, 921-923.

FREITAS, S.F., L. SHINOHARA, J. M. SFORCIN, S. GUIMARÃES (2006): *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. Phytomedicine 13, 170–175.

GEKKER, G., S. HU, M. SPIVAK, J. R. LOKENSGARD, P. K. PETERSON (2005) Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. J. Ethnopharmacol. 102, 158–163.

GHISALBERTI, E.L. (1979): Propolis: A review. Bee World 60, 59–84.

HEINRICH, M., M. MODARAI, A. KORTENKAMP (2008): Herbal extracts used for upper respiratory tract infections: are there clinically relevant interactions with the cytochrome P450 enzyme system? Planta Medica 74, 657-660.

HOGAN, J. W. (1999): Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, Wisconsin, SAD.

JÓŹWIK A., J. KRZYŻEWSKI, N. STRZAŁKOWSKA (2012): Relations between the oxidative status, mastitis, milk quality and disorders of reproductive functions in dairy cows - a review. Anim. Sci. Paper. Reports. 30, 297-307.

KUJUMGIEVA, A., I. TSVETKOVA, YU. SERKEDJIEVA, V. BANKOVA, R. CHRISTOV, S. POPOV (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology. 64, 235–240.

LEIGH, J. A. (1999): *Streptococcus uberis*: A Permanent Barrier to the Control of Bovine Mastitis? The Vet. J. 157, 225–238.

MAMIĆ, M. (2016): Oksidacijski status mliječne žlijezde goveda nakon intramamarne aplikacije otopine propolisa. Studentski rad. Veterinarski fakultet, Zagreb.

MCDOUGALL, S. M. A. BRYAN, R. M. TIDDY (2009): Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. J. Dairy Sci. 92, 4421-4431.

MIORIN, P. L., N. C. LEVY JUNIOR, A. R. CUSTODIO, W. A. BRETZ, M. C. MARCUCCI (2003): Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 95, 913-920.

NIELSEN, C., S. OSTERGAARD, U. EMANUELSON, H. ANDERSSON, B. BERGLUND, E. STRANDBERG (2010): Economic consequences of mastitis and withdrawal of milk with high somatic cell count in Swedish dairy herds. Animal. 4, 1758-1770.

NOBUSHI, Y., N. OIKAWA, Y. OKAZAKI, S. TSUTSUMI, Y. K. PARK, M. KUROKAWA, K. YASUKAWA (2012): Determination of Artepillin-C in Brazilian Propolis by HPLC with Photodiode Array Detector. J. Pharm. Nutrit. Sci. 2, 127-131.

OLIVER, S., R. A. ALMEIDA, B. E. GILLESPIE, S. J. IVEY, H. MOOREHEAD, P. LUNN, H. H. DOWLEN, D. L. JOHNSON, K. C. LAMAR (2003): Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced Streptococus uberis intramammary infections in lactating dairy cattle. Vet. Ther. 4, 299-308.

OLIVER, S. P., B. E. GILLESPIE, S. J. HEADRICK, H. MOOREHEAD, P. LUNN, H. H. DOWLEN, D. J. JOHNSON, K. C. LAMAR, S. T. CHESTER, W. M. MOSELEY (2004b): Efficacy of extended Ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. J.Dairy Sci. 87, 2393-2400.

ORSATTI, C. L., F. MISSIMA, A. C. PAGLIARONE (2010): Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. Phytother. Res. 8, 1141-1146.

PAGLIARONE, A. C., C. L. ORSATTI, M. C. BÚFALO, F. MISSIMA, T. F. BACHIEGA, J. P. JR. ARAÚJO, J. M. SFORCIN (2009b): Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice. International Immunopharmacology. 9, 1352–1356.

PASCUAL, C., R. GONZALEZ, R. G. TORRICELLA (1994): Scavenging action of propolis extract agains toxygen radicals. J. Ethnopharmacol. 41, 9-13.

PELLATI, F., F. P. PRENCIPE, D. BERTELLI, S. BENVENUTI (2013): An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis bymicrowave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. J. Pharm. Biomed. 81– 82, 126–132.

RUEGG, P. L.(2009.): Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. J. Anim. Sci. 87, 43-55.

RUEGG, P. L. (2013): Improving Treatments of Subclinical Mastitis. Izvor: http://milkquality.wisc.edu/whats-new/treatment-of-subclinical-mastitis/

SANDGREN, C. M. (2008): Therapeutic effect of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. The Vet. J. 175, 108-117.

SANDGREN, C. H., K. PERSSON WALLER, U. EMANUELSON (2008): Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. The Vet. J. 175, 108–117.

SANTANA, T. H. (2012): Bactericidial activity of ethanolic exstracts of propolis against Staphylococcus aureus isolated from mastitic cows. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 485-491.

SANTOS, M. V. (2002): Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. J. Ethnopharmacol. 80, 1-7.

SHIMITZU, K. (2004): Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. Arch. Biochem. Biophys. 424, 181-188.

# SFORCIN, J.M., A. FERNANDES JR., C.A.M. LOPES, V. BANKOVA, S.R.C. FUNARI, (2000): Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J. Ethnopharmacol. 73, 243–249.

# SFORCIN, J.M., A. FERNANDES JR., C.A.M. LOPES, S.R.C. FUNARI, V. BANKOVA (2001): Seasonal effect of Brazilian propolis on Candida albicans and Candida tropicalis. J.Venom. Anim. Toxins 7, 139–144.

# SFORCIN, J.M., V. BANKOVA (2011): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? J. Ethnopharmacol. 133, 253, 260.

SILVA-CARVALHO, R., F. BALTAZAR, C. ALMEIDA-AGUIAR (2015): Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. Evid. Based. Complement. Alternat. Med.10, 1155.

SIMUTH, J., J. TRNOVSKY, J. JELOKOVÁ (1986): Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonuclease by UV- absorbing components from propolis. Pharmazie, 41, 131-2.

VARELLA COELHO, M. L. (2007): Activity of staphylococcal bacteriocins against Staphylococcus aureus and Staphylococcus agalactiae involved in bovine mastitis. Res Microbiol. 158, 625-630.

WU, J. (2007): Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3131-3135.

QIAO I CHEN (1991): Isolation and identification of antibiotic constituents of propolis from Henan. Zhongguo Yao Za Zhi. 16, 481-482.

**Sažetak**

**Karla Milošević**

**Mihael Galović**

Studenti 5. godine Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Primjena propolisa u tretmanu mastitisa kod mliječnih krava**

Ciljevi ovog istraživanja bili su: analizirati sastav bezalkoholne otopine propolisa kako bi se preliminarno utvrdila koncentracija 8 biomarkera propolisa, a u svrhu razvoja standardizirane otopine; odrediti osjetljivost uobičajenih uzročnika subkliničkog mastitisa na bezalkoholnu otopinu propolisa, na sojevima bakterija iz arhive i izoliranima iz sekreta vimena krava u pokusu; odrediti podnošljivost bezalkoholne otopine propolisa nakon intramamarne aplikacije kravama; odrediti učinkovitost, odnosno bakteriološko izlječenje nakon i.mam. primjene bezalkoholne otopine propolisa kod subkliničkog mastitisa kod krava. Istraživanje je provedeno na pet farmi mliječnih goveda pasmine Holstein, a u njega je uključeno 86 mliječnih krava, odnosno 339 četvrti. Paralelno su praćena podnošljivost i bakteriološko izlječenje četvrti nakon i.mam. aplikacije 1 i 3%-tne otopine propolisa, a četvrti su naknadno razvrstavane u skupine ovisno o vrijednostima BSS i rezultatima bakteriološkog nalaza prije aplikacije. Dobiveni rezultati pokazuju da je in vitro učinak otopine propolisa bio dobar, međutim u odnosu na antibiotike koji se standardno koriste u liječenju kliničkog mastitisa ili se u nekim slučajevima predlažu za liječenje subkliničkog mastitisa (benzilpencilin, ceftiofur), taj je antimikrobni učinak relativno slab. Nadalje, u našem se istraživanju pokazalo da bezalkoholna otopina propolisa nakon 2. aplikacije značajno kod svih skupina krava očekivano diže BSS, međutim taj broj se već nakon nekoliko dana vraća blizu vrijednosti kakve su bile prije aplikacije. Osim toga, trokratnom (dvodnevnom) primjenom bezalkoholnih otopina propolisa je za samo 7 dana postignuto bakteriološko izlječenje u ukupno 92,53% slučajeva. Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako bi intramamarni pripravak bez propisane karencije, koji nije antibiotik već primarno imunomodulator kojim bi se mogao uspješno liječiti subklinički mastitis, bio vrlo korisna inovacija u stočarstvu.

**Ključne riječi:** *liječenje, intramamarni pripravak, propolis, subklinički mastitis*

**Summary**

**Karla Milošević**

**Mihael Galović**

5th year students of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb

**Application of Propolis in Treatment of Mastitis in Dairy Cows**

The aims of this research were to analyze the composition of the non-alcoholic propolis solution to determine the concentration of 8 biomarkers of propolis in order to standardize the solution; to determine the sensitivity of the common cause of subclinical mastitis to the non-alcoholic propolis solution, bacterial strains from the archives and isolated from the cow's mammary gland secretion in the experiment; to determine the tolerance of the non-alcoholic solution of propolis after intramammary application to cows; to determine efficiency ie bacteriological healing after i.mam. application of non-alcoholic propolis solution to cows suffering from subclinical mastitis. This research was conducted on five dairy farms of Holstein's cattle and included all together 86 dairy cows or 339 quarters. Partial exposure to susceptibility and bacterial healing was observed after i.mam. applications of 1 and 3% propolis solutions, and the quarters were subsequently classified into groups depending on the BSS values and the results of the bacteriological finding prior to the application. The results have shown that the *in vitro* effect of the propolis solution was good. On the other hand, compared to the antibiotics that are commonly used in the treatment of clinical mastitis or in some cases recommend for the treatment of subclinical mastitis (benzylpencilin, ceftiofur), this antimicrobial effect is relatively weak. Furthermore, our research has shown that non-alcoholic solution of propolis has significantly increased the values of BSS in all cattle groups after the second application, which was also expected. After a few days, the number has returned close to the values prior to the application. Additionally, triple application within two days of non-alcoholic propolis solution, has achieved bacteriological healing in total of 92,53% of cases in only 7 days. The results of this study have shown, how can an intramammary preparation without withdrawal period, that is actually not antibiotic but primarily immunomodulator and which could be used to treat efficiently subclinical mastitis, would be very useful innovation in cattle breeding.

**Keywords:** *treatment, intramammary preparation, propolis, subclinical mastitis*

**ŽIVOTOPISI**

**Karla Milošević**

Zovem se Karla Milošević. Rođena sam u Grazu (Austrija), 07. rujna 1992. godine. Pohađala sam Osnovnu školu Dubovac u Karlovcu te je završila školske godine 2006./2007. Paralelno sam završila i Osnovnu glazbenu školu u Karlovcu, instrument flauta. Nakon osnovne škole upisala sam Gimnaziju Karlovac u Karlovcu, te sam maturirala školske godine 2010./2011. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam akademske godine 2011./2012., te sam trenutno studentica 5. godine. Aktivno se bavim veslanjem te sam kategorizirana sportašica od strane Hrvatskog olimpijskog odbora. Volonter sam na Klinici za porodništvo i reprodukciju na Veterinarskom fakultetu. Kao članica Veterinarskog zbora i orkestra „Ab ovo“, dodijeljena mi je Posebna Rektorova nagrada za nastup povodom ulaska Republike Hrvatske u Europsku Uniju u dvorcu Spielfeld u Austriji.

**Mihael Galović**

Zovem se Mihael Galović. Rođen sam u Karlovcu, 20. kolovoza 1993. godine. Pohađao sam Osnovnu školu „Ivan Goran Kovačić“ Duga Resa u Dugoj Resi te je završio školske godine 2007./2008. Paralelno sam završio i Osnovnu glazbenu školu u Karlovcu. Nakon osnovne škole, upisao sam Prirodoslovnu školu Karlovac u Karlovcu, gdje sam pohađao smjer veterinarski tehničar od 2008. do 2012. kada sam maturirao. Iste sam godine maturirao i u Srednjoj glazbenoj školi u Karlovcu, smjer teorija glazbe. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam akademske godine 2012./2013, te sam trenutno student 5. godine. U trajanju studija bio sam demonstrator na Zavodu za fiziku Veterinarskog fakulteta, na kolegiju „Fizika i biofizika“, te demonstrator na Zavodu za patološku fiziologiju Veterinarskog fakulteta na kolegiju „Patološka fiziologija II“. Aktivni sam član Veterinarskog zbora i orkestra „Ab ovo“ u kojem sviram violinu. Akademske godine 2012./2013. dodijeljena nam je Posebna Rektorova nagrada za nastup povodom ulaska Republike Hrvatske u Europsku Uniju u dvorcu Spielfeld u Austriji.